

BUKTI KORESPONDENSI

ARTIKEL NASIONAL TERAKREDITASI

Judul Artikel : **Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay**
Jurnal : Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology
Penulis : **Ni Putu Ermi Hikmawanti***, Agustin Yumita, Muhammad Rafiq, Lusiana Lusiana

No.	Perihal	Tanggal
1.	Bukti <i>submit</i> dan artikel yang di- <i>submit</i>	22 September 2021
2.	Bukti hasil <i>review</i> dan file komentar <i>reviewer</i>	12 November 2021
3.	Bukti hasil revisi dan artikel yang direvisi	7 Januari 2022
4.	Bukti artikel diterima	14 Januari 2022
5.	Bukti artikel proses <i>galley proof</i> dan artikel yang dikoreksi <i>galley proof</i>	20 Februari 2022
6.	Bukti artikel telah terbit <i>online</i> pada website Jurnal	20 Februari 2022

**1. Bukti *submit* dan artikel yang di-*submit*
(22 September 2021)**



✕ 𠄎

Labels

Forward

Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fraction of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether > water > ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis *Micro-plate*

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada micro-plate. Serapan diukur menggunakan *microplate reader*. Skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukkan ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0,85 pada fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Kata kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi¹, penyembuh luka pada mencit diabetes², anti radikal bebas³ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁴. Dandekar (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁵. Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi sumber antioksidan alami. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dibandingkan ekstrak airnya³.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri UV-Vis⁶. Fraksi dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan skrining untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber* KLT (Duran), dan alat-alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Lieberman Burchard, $FeCl_3$ 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF254 (Merck).

2.3. Prosedur

a. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia diblender dan diayak dengan ayakan no.40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi⁷.

b. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi⁷.

c. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, fase air dimasukan kembali dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fraksi eter dan etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi air dipekatkan langsung diwaterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

d. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)⁸.

e. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 25 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 µL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 µL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

f. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125-125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

g. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Skrining aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (1:9). Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam chamber yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹⁰.

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 1**. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 2**. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**. Skrining aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan **Gambar 1**, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹¹. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Polaritas eter mirip dengan *n*-heksana dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹¹. Berdasarkan penelitian Dandekar et al., (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-; 4-Hydroxy-2-methylacetophenone; Megastigmatrienone; Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; 2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one; n-Hexadecanoic acid; Octadecanoic acid; Phytol; 6-octen-1-ol,3,7-dimethyl; Stigmasterol; Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4-dimethyl; 22-stigmasten-3-one⁵. Klorofil pada batas tertentu dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter¹¹. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter. Polifenol terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan

polaritas yang lebih tinggi seperti etanol-air¹¹. Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metode lain seperti Folin-Denis, titrasi permanganate maupun kolorimetri dengan garam besi¹². Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹³. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{4-}$) yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁴. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹³. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm¹⁵. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam⁸. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁶. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan¹⁶. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid¹² atau bahkan senyawa steroid¹⁷. Pengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang diskriminatif menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

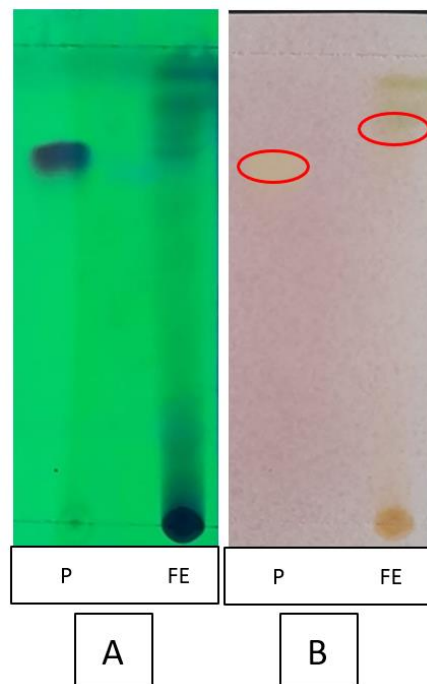
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada batch 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Dandekar, R., Fegade, B. & Naik, A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of Epiphyllum Oxypetalum Leaves. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 851–858 (2015).
2. Dwita, L. P. *et al.* Wound healing properties of Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med.* **26**, 1–5 (2019).
3. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of Epiphyllum oxypetalum. *World J. Pharm. Res.* **4**, 1301–1309 (2015).

4. Devi, K. R. S., Narayana, S. L., Menghani, P. & Georgekutty, J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 972–980 (2018).
5. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 149–154 (2015).
6. Bobo-García, G. *et al.* Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 204–209 (2015).
7. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).
8. Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. (Buku Kedokteran EGC, 2015).
9. Sembiring, E. N., Elya, B. & Sauriasari, R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* **10**, 123–127 (2018).
10. Irianti, T. *et al.* DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit. Med. J.* **21**, 38–47 (2016).
11. Houghton, P. J. & Raman, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Springer-Science+Business Media, B.V., 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.
12. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
13. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. in *Methods in Enzymology* vol. 229 152–178 (Elsevier Inc., 1999).
14. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **91**, 107–110 (2009).
15. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
16. Sethiya, N. K., Raja, M. K. M. M. & Mishra, S. H. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (A Medhya Rasayana): A preliminary assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **4**, 25–30 (2013).
17. Mooradian, A. D. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* . **45**, 509–511 (1993).

GAMBAR



Keterangan:

P = pembanding asam galat

FE = fraksi eter

Fase gerak = *n*-heksana:etil asetat (1:9)

Fase diam = plat silika gel GF254

A = Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm sebelum disemprot DPPH

B = Pengamatan pada sinar tampak setelah disemprot DPPH

Gambar 1 Hasil skrining aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

TABEL

Tabel 1 Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2 Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	—	√	√	√	—	√
Ekstrak etanol 96%	—	√	√	√	—	√
Fraksi eter	—	√	√	—	—	√
Fraksi etil asetat	—	√	√	—	—	—
Fraksi air	—	√	√	√	—	—

Keterangan: (√) = terdeteksi; (—) = tidak terdeteksi

Tabel 3 Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

**2. Bukti hasil *review* dan file komentar *reviewer*
(12 November 2021)**



Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

[ijpst] Keputusan Editor

2 messages

Prof. apt. Muchtaridi Muchtaridi <jurnal@unpad.ac.id>
To: Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Fri, Nov 12, 2021 at 7:29 AM

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Kami telah mengambil keputusan mengenai naskah Anda untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology, "Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate".

Keputusan kami adalah :

Mohon perbaikan artikel disubmit ulang ke akun Bapak/Ibu di jurnal.unpad.ac.id/ijpst. Terima Kasih atas kepercayaan Bapak/Ibu mempublikasikan hasil penelitian di Jurnal IJPST

Prof. apt. Muchtaridi Muchtaridi
Department of Pharmaceutical Analysis and Medicinal Chemistry Faculty of
Pharmacy Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Jatinangor KM 21.5 Bandung-Sumedang, 45363, Ph. 022-84288888
ext.3210
HP / Telepon 087827707157
muchtaridi@unpad.ac.id

Reviewer B:

Artikel ini perlu direvisi sesuai dengan komentar yang ada di artikel.

Kualitas riset sudah cukup baik tapi perlu banyak penjelasan dan perbaikan.

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology
<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>

2 attachments

35828-126278-1-RV.docx
256K



35828-128678-1-RV.docx
268K

Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>
To: "Prof. apt. Muchtaridi Muchtaridi" <jurnal@unpad.ac.id>

Fri, Jan 7, 2022 at 6:21 AM

Dear Editor,

Mohon maaf atas keterlambatan revisi dari kami.
Kami telah mengunggah ulang hasil perbaikan naskah kami melalui akun.
Mohon informasi untuk tahapan selanjutnya.
Terimakasih.

Salam
Ermi
[Quoted text hidden]

--

Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm.



Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fraction of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether>water>ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an Rf value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis *Micro-plate*

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada *micro-plate*. Serapan diukur menggunakan *microplate reader*. Skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukkan ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter>air>etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai Rf 0,85 pada fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Commented [M1]: Please write the botanical (Latin) name in this part

Commented [M2]: This sentence have to rearrange.

Commented [M3]: Please kindly provide the conclusions in this part.

Kata kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi¹, penyembuh luka pada mencit diabetes², anti radikal bebas³ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁴. Dandekar (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁵. Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi sumber antioksidan alami. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dibandingkan ekstrak airnya³.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri UV-Vis⁶. Fraksi dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan skrining untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber KLT* (Duran), dan alat-alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Lieberman Burchard, $FeCl_3$ 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF254 (Merck).

2.3. Prosedur

a. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia

Commented [M4]: 1. Penulis harus memberikan tinjauan literatur secara lengkap dan jelas.
2. Penulis harus meningkatkan tinjauan literatur dengan mengutip artikel dari jurnal tentang studi terbaru terkait topik yang diangkat.

Commented [M5]: Penulis perlu menuliskan tentang kesenjangan (gap) penelitian dalam pendahuluan dengan jelas, sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan.

Commented [M6]: No. Sertifikat Taksonomi atau Voucher spesimen tanaman perlu di tulis atau diinformasikan.

diblender dan diayak dengan ayakan no.40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi⁷.

b. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi⁷.

c. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, fase air dimasukan kembali dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fraksi eter dan etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi air dipekatkan langsung diwaterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

Commented [M7]: Harus terukur

Commented [M8]: Prosedur untuk mendapatkan fraksi air ini harus jelas.

d. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)⁸.

e. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 25 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 µL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 µL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

f. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125-125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

g. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Skrining aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (1:9). Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam chamber yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹⁰.

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 1**. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 2**. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**. Skrining aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan **Gambar 1**, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹¹. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Polaritas eter mirip dengan *n*-heksana dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹¹. Berdasarkan penelitian Dandekar et al., (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-; 4-Hydroxy-2-methylacetophenone; Megastigmatrienone; Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,8,8,-hexamethyl; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; 2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one; n-Hexadecanoic acid; Octadecanoic acid; Phytol; 6-octen-1-ol,3,7-dimethyl; Stigmasterol; Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4- dimethyl; 22-stigmasten-3-one⁵. Klorofil pada batas tertentu dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter¹¹. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter. Polifenol terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada

Commented [M9]: Di metode penelitian harus jelas untuk mendapatkan fraksi air ini.

Commented [M10]: Penjelasan ini kurang tepat. Aspek temuan apa yang mau dijelaskan dengan ini. Posisi penjelasan bisa diatur ulang atau ditinjau lagi.

Commented [M11]: Apakah semua metabolit sekunder ditentukan kadarnya?? Sehingga bisa disimpulkan seperti ini.

Commented [M12]: Hanya fenolik yang tinggi di eter, flavonoid kadarnya tinggi di etanol dari tabel 3.

strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi seperti etanol-air¹¹. Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan ~~metode~~metode lain seperti Folin-Denis, titrasi permanganate maupun kolorimetri dengan garam besi¹². Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹³. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{4-}$) yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁴. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹³. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm¹⁵. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam⁸. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁶. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan¹⁶. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid¹² atau bahkan senyawa steroid¹⁷. Pengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang diskriminasi menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada batch 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Dandekar, R., Fegade, B. & Naik, A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of Epiphyllum Oxypetalum Leaves. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 851–858 (2015).
2. Dwita, L. P. *et al.* Wound healing properties of Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med.* **26**, 1–5

Commented [M13]: Butuh penjelasan yang lebih jelas lagi terkait mengapa kandungan fenol dan flavonoid seperti yang di dapat, baik proses metabolisme di dalam tanaman maupun terkait metode yang digunakan.

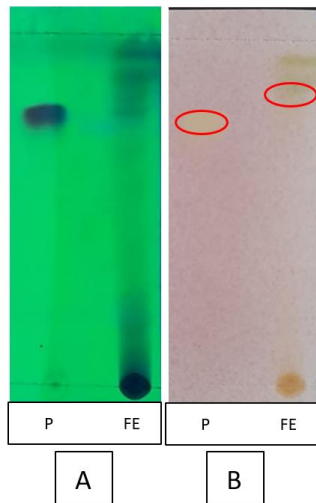
Commented [M14]: ????

Commented [M15]: Ikuti pedoman penulisan jurnal yang dituju. Mohon berikan lebih banyak referensi terkini.

(2019).

3. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Epiphyllum oxypetalum*. *World J. Pharm. Res.* **4**, 1301–1309 (2015).
4. Devi, K. R. S., Narayana, S. L., Menghani, P. & Georgekutty, J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 972–980 (2018).
5. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 149–154 (2015).
6. Bobo-García, G. *et al.* Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 204–209 (2015).
7. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).
8. Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. (Buku Kedokteran EGC, 2015).
9. Sembiring, E. N., Elya, B. & Sauriasari, R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* **10**, 123–127 (2018).
10. Irianti, T. *et al.* DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit. Med. J.* **21**, 38–47 (2016).
11. Houghton, P. J. & Raman, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Springer-Science+Business Media, B.V., 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.
12. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
13. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. in *Methods in Enzymology* vol. 229 152–178 (Elsevier Inc., 1999).
14. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **91**, 107–110 (2009).
15. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
16. Sethiya, N. K., Raja, M. K. M. M. & Mishra, S. H. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (*A Medhya Rasayana*): A preliminary assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **4**, 25–30 (2013).
17. Mooradian, A. D. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* . **45**, 509–511 (1993).

GAMBAR



Keterangan:

P = pembanding asam galat

FE = fraksi eter

Fase gerak = *n*-heksana:etil asetat (1:9)

Fase diam = plat silika gel GF254

A = Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm
sebelum disemprom DPPH

B = Pengamatan pada sinar tampak setelah
disemprom DPPH

Gambar 1 Hasil skrining aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

TABEL

Tabel 1 Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2 Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	–	√	√	√	–	√
Ekstrak etanol 96%	–	√	√	√	–	√
Fraksi eter	–	√	√	–	–	√
Fraksi etil asetat	–	√	√	–	–	–
Fraksi air	–	√	√	√	–	–

Keterangan: (√) = terdeteksi; (–) = tidak terdeteksi

Tabel 3 Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007



Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fraction of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether>water>ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an Rf value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada *micro-plate*. Serapan diukur menggunakan *microplate reader*. Skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukkan ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter>air>etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai Rf 0,85 pada fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Commented [MOU1]: Apakah perlu menggunakan strip? Sudah umum microplate saja

Commented [MOU2]:

Commented [MOU3]:

Kata kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi¹, penyembuh luka pada mencit diabetes², anti radikal bebas³ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁴. Dandekar (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁵. Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi sumber antioksidan alami. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dibandingkan ekstrak airnya³.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri UV-Vis⁶. Fraksi dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan skrining untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber KLT* (Duran), dan alat-alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Lieberman Burchard, $FeCl_3$ 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF254 (Merck).

2.3. Prosedur

a. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia diblender dan diayak dengan ayakan no.40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi⁷.

Commented [MOU4]: Di pendahuluan telah disebutkan bahwa metabolit sekunder tanaman ini banyak, tp penulis belum memperdalam mengapa flavonoid dan fenolik yg menjadi diuji (baru membahas satu sumber, tambahkan sumber lainnya).

Commented [MOU5]: Penulis belum memaparkan latar belakang penggunaan microplate, pustaka2 yg berkaitan dengan kelebihan microplate sebaiknya lebih digali

b. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi⁷.

c. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, fase air dimasukan kembali dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fraksi eter dan etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi air dipekatkan langsung diwaterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

d. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)⁸.

e. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 25 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 µL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 µL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

f. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)⁹. Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125-125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

g. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Commented [MOU6]: Tuliskan dengan detail tiap konsentrasinya

Commented [MOU7]: Tuliskan detail konsentrasinya

Skrining aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (1:9). Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam chamber yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹⁰.

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 1**. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 2**. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**. Skrining aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan **Gambar 1**, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹¹. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Polaritas eter mirip dengan *n*-heksana dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹¹. Berdasarkan penelitian Dandekar et al., (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-; 4-Hydroxy-2-methylacetophenone; Megastigmatrienone; Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; 2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one; n-Hexadecanoic acid; Octadecanoic acid; Phytol; 6-octen-1-ol,3,7-dimethyl; Stigmasterol; Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4-dimethyl; 22-stigmasten-3-one⁵. Klorofil pada batas tertentu dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter¹¹. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter. Polifenol terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan

polaritas yang lebih tinggi seperti etanol-air¹¹. Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metode lain seperti Folin-Denis, titrasi permanganate maupun kolorimetri dengan garam besi¹². Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹³. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{4-}$) yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁴. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹³. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm¹⁵. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam⁸. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁶. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan¹⁶. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid¹² atau bahkan senyawa steroid¹⁷. Pengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang diskriminasi menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada batch 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

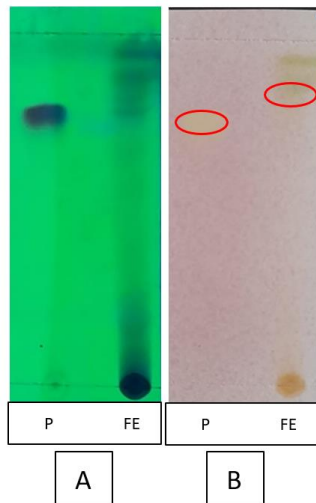
Daftar Pustaka

1. Dandekar, R., Fegade, B. & Naik, A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of *Epiphyllum Oxypetalum* Leaves. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 851–858 (2015).
2. Dwita, L. P. *et al.* Wound healing properties of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med.* **26**, 1–5 (2019).
3. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Epiphyllum oxypetalum*. *World J. Pharm. Res.* **4**, 1301–1309 (2015).

Formatted: Indonesian

4. Devi, K. R. S., Narayana, S. L., Menghani, P. & Georgekutty, J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 972–980 (2018).
5. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 149–154 (2015).
6. Bobo-García, G. *et al.* Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 204–209 (2015).
7. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017).
8. Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. (Buku Kedokteran EGC, 2015).
9. Sembiring, E. N., Elya, B. & Sauriasari, R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* **10**, 123–127 (2018).
10. Irianti, T. *et al.* DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit. Med. J.* **21**, 38–47 (2016).
11. Houghton, P. J. & Raman, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Springer-Science+Business Media, B.V., 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.
12. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
13. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. in *Methods in Enzymology* vol. 229 152–178 (Elsevier Inc., 1999).
14. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **91**, 107–110 (2009).
15. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
16. Sethiya, N. K., Raja, M. K. M. M. & Mishra, S. H. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (*A. Medhya Rasayana*): A preliminary assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **4**, 25–30 (2013).
17. Mooradian, A. D. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **45**, 509–511 (1993).

GAMBAR



Keterangan:

P = pembanding asam galat

FE = fraksi eter

Fase gerak = *n*-heksana:etil asetat (1:9)

Fase diam = plat silika gel GF254

A = Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm
sebelum disemprom DPPH

B = Pengamatan pada sinar tampak setelah
disemprom DPPH

Gambar 1 Hasil skrining aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

TABEL

Tabel 1 Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2 Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	–	√	√	√	–	√
Ekstrak etanol 96%	–	√	√	√	–	√
Fraksi eter	–	√	√	–	–	√
Fraksi etil asetat	–	√	√	–	–	–
Fraksi air	–	√	√	√	–	–

Keterangan: (√) = terdeteksi; (–) = tidak terdeteksi

Tabel 3 Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

**3. Bukti hasil revisi dan artikel yang direvisi
(7 Januari 2022)**

RINGKASAN **TINJAUAN** PENGEDITAN

Naskah

Penulis Ni Putu Ermi Hikmawanti, Agustin Yumita, Muhammad Rafiq, Lusiana Lusiana 
Judul Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay
Bagian Artikel Penelitian
Editor Sandra Megantara, M.Farm. 
Muchtaridi, Ph.D. 

Peer Review

Tahapan 1

Versi Review [35828-125638-2-RV.DOCX](#) 2021-09-28
Dimulai 2021-10-01
Terakhir Dimodifikasi 2021-11-03
File yang diunggah Reviewer B [35828-128678-1-RV.DOCX](#) 2021-11-03
Reviewer A [35828-126278-1-RV.DOCX](#) 2021-10-01

Keputusan Editor

Keputusan Terima Langganan 2022-01-14
Beritahu Editor  Rekam Email Editor/Penulis  2021-11-12
Versi Editor [35828-125992-1-ED.DOCX](#) 2021-09-28
[35828-125992-2-ED.DOCX](#) 2022-01-14
Versi Penulis [35828-134174-1-ED.DOCX](#) 2022-01-07 [HAPUS](#)
Unggah Versi Penulis Version No file chosen

[Switch to English](#)

[Back to Top](#)

[View My Stats](#)

Penerbit Universitas Padjadjaran



Jurnal ini terindeks di :



Creative Commons Attribution :



Phenolics and Flavonoids Content of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) or *Wijaya Kusuma* (Cactaceae) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of *Wijaya Kusuma* leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract were obtained from the maceration of *Wijaya Kusuma* powder leaves. The extract was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using liquid-liquid extraction method. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of *Wijaya Kusuma* leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fractions of the leaves of *Wijaya Kusuma* contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether > water > ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. The ether fraction of *Wijaya Kusuma* leaves has potential as a source of polyphenols with antioxidant activity. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of *Wijaya Kusuma* leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) atau *Wijaya Kusuma* (Cactaceae) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun *Wijaya Kusuma* menggunakan pengujian berbasis micro-plate. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun *Wijaya Kusuma*. Ekstrak selanjutnya, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada micro-plate. Serapan diukur menggunakan microplate reader. Penapisan aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukan ekstrak dan fraksi semua fraksi -daun *Wijaya Kusuma* mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0,85 pada

Formatted: Font: Italic

fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. [Fraksi eter daun Wijaya Kusuma berpotensi sebagai sumber polifenol dengan aktivitas antioksidan](#). Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Kata kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi¹, penyembuh luka pada mencit diabetes², anti radikal bebas³ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁴. Dandekar *et al.* (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁵. ~~Kandungan senyawa f~~Fenolik ~~dan~~ flavonoid ~~dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi~~ merupakan sumber antioksidan alami ~~yang dapat diperoleh dari tanaman~~^{6,7} termasuk Wijaya Kusuma. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H₂O₂) dibandingkan ekstrak airnya³.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. ~~sementara bentuk fraksinya belum banyak diteliti~~. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan ~~pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma~~ dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri UV-Vis⁷. ~~Penapisan cepat dengan jumlah sampel yang banyak untuk memperoleh kadar senyawa menggunakan metode sederhana dengan hasil yang akurat tentu sangat diperlukan untuk menghemat waktu dan biaya penelitian~~^{8,9}. Melalui penelitian ini, ~~f~~Fraksi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan ~~penapisan~~ *skriming* untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber KLT* (Duran), dan alat-alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor ~~dengan nomor surat: B-246/IV/DI.01/2/2021~~. Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol

Formatted: Font: Italic

Formatted: Superscript

Formatted: Not Superscript/ Subscript

Formatted: Superscript

p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Lieberman Burchard, FeCl_3 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, AlCl_3 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF254 (Merck).

2.3. Prosedur

a. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia di blender dan diayak dengan ayakan no.40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi¹⁰.

b. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi¹⁰.

c. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan 15 mL etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, kedua lapisan ditampung di wadah terpisah. Fase air (lapisan bawah) dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan proses fraksinasi diulang sebanyak 5 kali dengan pelarut eter baru. Setelah itu, fraksinasi fase air dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fase eter dan etil asetat yang telah diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi eter dan fraksi etil asetat kental hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi Fase air sisanya, dipekatkan langsung di waterbath pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi air kental. Masing-masing fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

d. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)¹¹.

e. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹². Masing-masing sebanyak 25 μL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 μL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 μL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorpsi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5; 125; 250; dan

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

Formatted: Font: (Default) Times New Roman, 12 pt

-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

f. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹². Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; dan 125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekuivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

g. PenapisanSkriming aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

PenapisanSkriming aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (1:9), dan beberapa tetes asam formiat. Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielus dalam chamber yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹³.

Formatted: Not Highlight

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Not Highlight

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi [daun Wijaya Kusuma](#) dapat dilihat pada **Tabel 1**. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil [penapisanskriming](#) fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 2**. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter [daun Wijaya Kusuma](#) dibanding fraksi lainnya (fraksi eter>[fraksi](#) air>[fraksi](#) etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**. [PenapisanSkriming](#) aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan **Gambar 1**, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai Rf 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai Rf 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹⁴. [Proses fraksinasi pada penelitian ini menggunakan pelarut eter \(nonpolar\), etil asetat \(semi polar\), dan air \(polar\)](#). ~~Hasil penelitian yang diperoleh menunjukan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat.~~ Polaritas eter mirip dengan *n*-heksana dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹⁴. Berdasarkan penelitian Dandekar *et al.*, (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-; 4-Hydroxy-2-methylacetophenone; Megastigmatrienone; Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol; 2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one; n-Hexadecanoic acid; Octadecanoic acid; Phytol; 6-octen-1-ol,3,7-dimethyl; Stigmasterol; Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4-dimethyl; 22-stigmasten-3-one⁵. Klorofil pada batas tertentu juga dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter¹⁴. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter diduga berkaitan dengan kandungan klorofil dan steroid dalam daun Wijaya Kusuma yang banyak tersari dalam eter. Namun, demikian, perlu studi lebih lanjut untuk memastikan hal ini.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter daun Wijaya Kusuma dibandingkan dengan fraksi lainnya (fraksi eter > fraksi air > fraksi etil asetat). Polifenol pada tanaman terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida. Polifenol pada tanaman disintesis dari jalur sikimat¹⁵. Stabilitas polifenol bervariasi karena distribusinya yang tidak seragam pada tumbuhan. Beberapa fenolik merupakan senyawa stabil, sedangkan lainnya lebih rentan terhadap oksidasi maupun suhu. Sifat kelarutan dan pemisahan polifenol dipengaruhi oleh perbedaan struktur kimianya¹⁶. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi¹⁶ seperti etanol-air¹⁴. Namun, pada studi ini, justru fenolik dan flavonoid dalam fraksi nonpolar berada pada kadar yang tinggi. Nawaz *et al.*, (2020) melaporkan bahwa ekstrak yang diperoleh dengan pelarut polar memberikan hasil rendemen yang tinggi dari biji *Phaseolus vulgaris*. Namun demikian, kadar fenolik dan flavonoid total lebih rendah pada ekstrak tersebut dibandingkan dengan ekstrak yang diperoleh dari pelarut nonpolar (heksana dan petroleum eter). Hal ini mengindikasikan bahwa biji tanaman tersebut mengandung senyawa fenolik yang dominan bersifat non-polar¹⁷. Studi literatur membuktikan bahwa tidak ada pelarut yang secara umum dapat diterima sebagai pelarut terbaik untuk ekstraksi dan pemisahan polifenol pada tanaman. Pengaruh besar pada proses deteksi dan kuantifikasi polifenol dalam tanaman sebagai zat terlarut mengacu pada jenis senyawa polifenol didalamnya¹⁶.

Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metode lain seperti Folin-Denis, titrasi permanganat, permanganat, e maupun kolorimetri dengan garam besi⁷. Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹⁸. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻ yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁹. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹⁸. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl₃ yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm²⁰. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam¹¹. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

Formatted: Font color: Auto

pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁸. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan²¹. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid⁷ atau bahkan senyawa steroid²². Meskipun kandungan fenolik dan flavonoid tinggi pada ekstrak dalam pelarut nonpolar, ternyata aktivitas antioksidannya belum tentu lebih baik dibanding ekstrak dalam pelarut polar. Sebagian besar aktivitas antioksidan yang tinggi ditunjukkan pada ekstrak atau fraksi yang diperoleh dari pelarut polar seperti etanol maupun metanol¹⁷. Dengan demikian, pPengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter>fraksi air>fraksi etil asetat). Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang ditapis skrin menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada batch 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Dandekar, R., Fegade, B. & Naik, A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of Epiphyllum Oxypetalum Leaves. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 851–858 (2015).
2. Dwita, L. P. *et al.* Wound healing properties of Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med.* **26**, 1–5 (2019).
3. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of Epiphyllum oxypetalum. *World J. Pharm. Res.* **4**, 1301–1309 (2015).
4. Devi, K. R. S., Narayana, S. L., Menghani, P. & Georgekutty, J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of Epiphyllum oxypetalum (dc) haw leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 972–980 (2018).
5. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of Epiphyllum oxypetalum leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 149–154 (2015).
6. Moharram, H. A. & Youssef, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J. Food Sci. Technol.* **11**, 31–42 (2014).
7. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
8. Bobo-García, G. *et al.* Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional

Formatted: Indonesian

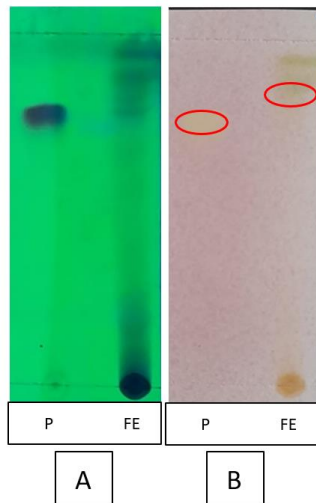
Formatted: Font color: Auto

Formatted: Justified

- spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 204–209 (2015).
9. Herald, T. J., Gadgil, P., Perumal, R., Bean, S. R. & Wilson, J. D. High-throughput micro-plate HCl-vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 2133–2136 (2014).
10. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. (Kementerian Kesehatan RI, 2017).
11. Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. (Buku Kedokteran EGC, 2015).
12. Sembiring, E. N., Elya, B. & Sauriasari, R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* **10**, 123–127 (2018).
13. Irianti, T. *et al.* DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit. Med. J.* **21**, 38–47 (2016).
14. Houghton, P. J. & Raman, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Springer-Science+Business Media, B.V., 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.
15. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouysøgu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 586–621 (2011).
16. Alara, O. R., Abdurahman, N. H. & Ukaegbu, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr. Res. Food Sci.* **4**, 200–214 (2021).
17. Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H. & Ullah, N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **56**, e17129 (2020).
18. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. in *Methods in Enzymology* vol. 229 152–178 (Elsevier Inc., 1999).
19. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **91**, 107–110 (2009).
20. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
21. Sethiya, N. K., Raja, M. K. M. M. & Mishra, S. H. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (*A Medhya Rasayana*): A preliminary assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **4**, 25–30 (2013).
22. Mooradian, A. D. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **45**, 509–511 (1993).

Formatted: Indent: Left: 0 cm, Hanging: 0,75 cm

GAMBAR



Keterangan:

P = pembanding asam galat

FE = fraksi eter

Fase gerak = *n*-heksana:etil asetat (1:9) [dan beberapa tetes asam formiat](#)

Fase diam = plat silika gel GF254

A = Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm sebelum disemprot DPPH

B = Pengamatan pada sinar tampak setelah

Gambar 1 Hasil [penapisan](#) aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

TABEL

Tabel 1 Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2 Hasil [penapisan skrining](#) fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	–	√	√	√	–	√
Ekstrak etanol 96%	–	√	√	√	–	√
Fraksi eter	–	√	√	–	–	√
Fraksi etil asetat	–	√	√	–	–	–
Fraksi air	–	√	√	√	–	–

Keterangan: (√) = terdeteksi; (–) = tidak terdeteksi

Tabel 3 Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

4. Bukti artikel diterima (14 Januari 2022)



Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

[ijpst] Permintaan Review Copyediting

1 message

IJPST Editor <ijpst.farmasi@unpad.ac.id>

Tue, Feb 21, 2023 at 8:49 PM

To: Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Naskah Anda "Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate" untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology telah melewati langkah pertama copyediting, dan tersedia untuk Anda untuk mereview dengan langkah-langkah berikut ini.

1. Klik URL Penyerahan di bawah ini.
2. Login ke jurnal dan klik di File yang ditampilkan di langkah 1.
3. Buka naskah yang telah diunduh.
4. Review teks ini, termasuk proposal copyedit dan Pertanyaan Penulis.
5. Buatlah perubahan copyediting apapun yang selanjutnya akan meningkatkan teks.
6. Saat selesai, upload file tersebut di Langkah 2.
7. Klik di METADATA untuk mengecek informasi pengindeksan untuk kelengkapan dan keakuratan.
8. Kirim email LENGKAP kepada editor dan copyeditor.

URL Penyerahan:

<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/author/submissionEditing/35828>

Nama pengguna Penulis: ermi_hikmawanti

Ini adalah kesempatan terbaik untuk membuat perubahan copyediting besar ke naskah. Tahap proofreading, yang mengikuti persiapa galley, terlarang untuk mengoreksi kesalahan layout dan tipografi.

Jika Anda tidak dapat bertanggung jawab atas pekerjaan ini saat ini atau mempunyai pertanyaan apapun, silakan hubungi saya. Terima kasih untuk kontribusi Anda kepada jurnal ini.

IJPST Editor

Fakultas Farmasi Unpad

ijpst.farmasi@unpad.ac.id

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>

**5. Bukti artikel proses *galley proof* dan artikel
yang dikoreksi *galley proof*
(20 Februari 2022)**



Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

[ijpst] Permintaan Proofreading (Penulis)

2 messages

IJPST Editor <ijpst.farmasi@unpad.ac.id>

Tue, Feb 21, 2023 at 8:50 PM

To: Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Ermi Ni Putu Ermi Hikmawanti:

Naskah Anda "Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate" untuk Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology sekarang perlu di-proofread dengan mengikuti langkah-langkah berikut ini.

1. Klik di URL Penyerahan berikut ini.
2. Login ke jurnal dan lihat INSTRUKSI PROOFING .
3. Klik di LIHAT PROOF di Layout dan galley proof di satu atau lebih format yang digunakan.
4. Masukkan koreksi (tipografi dan format) dalam koreksi proofreading.
5. Simpan dan kirimkan email tentang koreksi ke Editor Layout dan Proofreader.
6. Kirim email LENGKAP kepada editor dalam 48 jam.

URL Penyerahan:

<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/author/submissionEditing/35828>

Nama pengguna Penulis: ermi_hikmawanti

IJPST Editor

Fakultas Farmasi Unpad

ijpst.farmasi@unpad.ac.id

Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology

<http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst>**35828 (UNCORRECTED PROOF).pdf**

661K

Ni Putu Ermi Hikmawanti <ermy0907@uhamka.ac.id>

Tue, Feb 21, 2023 at 11:23 PM

To: IJPST Editor <ijpst.farmasi@unpad.ac.id>

Dear Editor,
Berikut terlampir naskah hasil koreksi dari tim penulis.
Terimakasih.

Salam,

Ermi

[Quoted text hidden]

--

Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm.

Office:

Department of Pharmaceutical Biology

Faculty of Pharmacy and Sciences

Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

Jl. Delima II/IV Klender, East Jakarta, Indonesia

Post code 13460

Phone: +62 852 5087 4147

Email: ermy0907@uhamka.ac.id**35828-134697-1-CE-koreksi penulis.docx**

290K



Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Ni P.E. Hikmawanti*, Agustin Yumita, Muhammad Rafiq, Lusiana

Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA,
DKI Jakarta 13460, Indonesia

Submitted 22 September 2021; Revised 7 January 2022; Accepted 14 January 2022; Published 20 February 2023

*Corresponding author: ermy0907@uhamka.ac.id

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using $AlCl_3$ on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fraction of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether > water > ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. Further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics.

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis *Micro-plate*

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan $AlCl_3$ pada *micro-plate*. Serapan diukur menggunakan *microplate reader*. Skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukkan ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0,85 pada fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Kata Kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma¹. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi², penyembuh luka pada mencit diabetes³, anti radikal bebas⁴ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁵. Dandekar (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁶. Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi sumber antioksidan alami. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dibandingkan ekstrak airnya⁴.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri *UV-Vis*⁷. Fraksi dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan skrining untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), iMark™ *Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber KLT* (Duran), dan alat-

alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Perbandingan yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi *Dragendorff*, *Mayer*, *Bouchardat*, *Lieberman Burchard*, $FeCl_3$ 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF₂₅₄ (Merck).

2.3. Prosedur

2.3.1. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia di blender dan diayak dengan ayakan no 40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi⁸.

2.3.2. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada *waterbath* pada suhu 50°C hingga

diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi⁹.

2.3.3. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, fase air dimasukan kembali dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fraksi eter dan etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi air dipekatkan langsung di *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

2.3.4. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)¹⁰.

2.3.5. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018) (11). Masing-masing sebanyak 25 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 µL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam

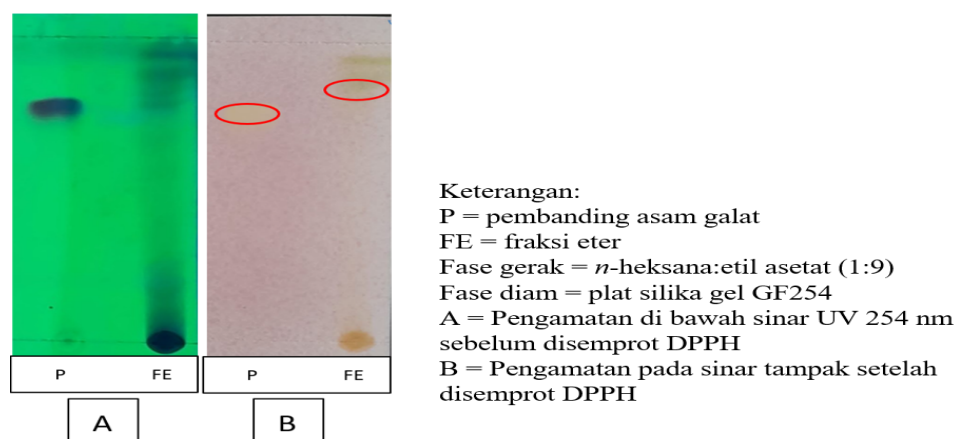
kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 µL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

2.3.6. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹¹. Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125-125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

2.3.7. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Skrining aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat (1:9). Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam *chamber* yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹².



Gambar 1. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 1. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada Tabel 2. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan

flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 3. Skrining aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan Gambar 1, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹³. Hasil penelitian yang diperoleh

Tabel 1. Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	-	+	+	+	-	+
Ekstrak etanol 96%	-	+	+	+	-	+
Fraksi eter	-	+	+	-	-	+
Fraksi etil asetat	-	+	+	-	-	-
Fraksi air	-	+	+	+	-	-

Keterangan: (+) = terdeteksi; (-) = tidak terdeteksi

Tabel 3. Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Polaritas eter (indeks polaritas = 0.117) mirip dengan n-heksana (indeks polaritas 0.009)¹⁴ dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹³. Berdasarkan penelitian Dandekar et al., (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, *1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-4-Hydroxy-2-methylacetophenone*; *Megastigmatrienone*; *Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl*; *4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol*; *2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one*; *n-Hexadecanoic acid*; *Octadecanoic acid*; *Phytol*; *6-octen-1-ol,3,7-dimethyl*; *Stigmasterol*; *Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4,-dimethyl*; *22-stigmasten-3-one*⁶. Klorofil pada batas tertentu dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti n-heksana dan eter¹³. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter. Polifenol terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida¹⁵. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi seperti etanol-air¹³. Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-

ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metodelain seperti Folin-Denis, titrasi permanganate maupun kolorimetri dengan garam besi¹⁶. Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹⁷. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40}^{4-}$) yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁸. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹⁷. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm¹⁹. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam¹⁰. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁷. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan²⁰. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid¹⁶ atau bahkan senyawa steroid²¹. Pengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang diskriminasi menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada *batch* 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Lesmana CA, Hikmawanti NPE, Yumita A. Pharmacognosy, Phytochemical, and Pharmacology of Wijaya Kusuma (*Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw.) – An Update Review. *Borneo J Pharm*. 2022;5(2):115–25.
2. Dandekar R, Fegade B, Naik A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of *Epiphyllum Oxypetalum* Leaves. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015;4(07):851–8.
3. Dwita LP, Hasanah F, Srirustami R, Repi, Purnomo R, Harsodjo S. Wound healing properties of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med*. 2019;26(1):1–5.
4. Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Epiphyllum oxypetalum*. *World J Pharm Res*. 2015;4(07):1301–9.
5. Devi KRS, Narayana SL, Menghani P, Georgekutty J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2018;7(6):972–80.
6. Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2015;4(1):149–54.
7. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95(1):204–9.
8. Ministry of Health Republic of Indonesia, Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan; 2017. 5–6 p.
9. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2008.
10. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
11. Sembiring EN, Elya B, Sauriasari R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn J*. 2018;10(1):123–7.
12. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
13. Houghton PJ, Raman A. Laboratory

- Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
14. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(1):1–10.
 15. Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants : A Review. *Nat Prod Commun.* 2013;8(12):1821–9.
 16. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.
 17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 1999. p. 152–78.
 18. Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J.* 2009;91(1):107–10.
 19. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.
 20. Sethiya NK, Raja MKMM, Mishra SH. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (A Medhya Rasayana): A preliminary assessment. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013;4(1):25–30.
 21. Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol .* 1993;45(6):509–11.

Phenolics and Flavonoids Content of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.)Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) or Wijaya Kusuma (Cactaceae) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract were obtained from the maceration of Wijaya Kusuma powder leaves. The extract was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using liquid-liquid extraction method. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fractions of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether > water > ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. The ether fraction of Wijaya Kusuma leaves has potential as a source of polyphenols with antioxidant activity. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun *Epiphyllum oxypetalum* (DC.)Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis Micro-plate

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) atau Wijaya Kusuma (Cactaceae) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis micro-plate. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma. Ekstrak selanjutnya, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada micro-plate. Serapan diukur menggunakan microplate reader. Penapisan skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukan ekstrak dan fraksi semua fraksi -daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0,85 pada

fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. [Fraksi eter daun Wijaya Kusuma berpotensi sebagai sumber polifenol dengan aktivitas antioksidan](#). Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Kata kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi¹, penyembuh luka pada mencit diabetes², anti radikal bebas³, dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol, dan saponin⁴. Dandekar *et al.* (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁵. ~~Kandungan senyawa f~~Fenolik ~~dan,~~ flavonoid ~~dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi merupakan~~ sumber antioksidan alami [yang dapat diperoleh dari tanaman](#)^{6,7}, [termasuk Wijaya Kusuma](#). Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H₂O₂) dibandingkan ekstrak airnya³.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstrakanya, [sementara bentuk fraksinya belum banyak diteliti](#). Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan [pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma](#) dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri UV-Vis⁷. [Penapisan cepat dengan jumlah sampel yang banyak untuk memperoleh kadar senyawa menggunakan metode sederhana dengan hasil yang akurat tentu sangat diperlukan untuk menghemat waktu dan biaya penelitian](#)^{8,9}. Melalui penelitian ini, ~~f~~Fraksi [dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma](#) dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan [penapisan-skrining](#) untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber* KLT (Duran), dan alat-alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor [dengan nomor surat: B-246/IV/DI.01/2/2021](#). Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol

p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi Dragendorff, Mayer, Bouchardat, Lieberman Burchard, FeCl_3 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, AlCl_3 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF254 (Merck).

2.3. Prosedur

a. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia diblender dan diayak dengan ayakan no.40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi¹⁰.

b. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi¹⁰.

c. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan 15 mL etanol ~~sedikit~~ lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, kedua lapisan ditampung di wadah terpisah. Fase air (lapisan bawah) dimasukan kembali ke dalam corong pisah, dan Proses fraksinasi diulang sebanyak 5 kali dengan pelarut eter baru. ~~di~~ Setelah itu, fraksinasi fase air dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. ~~Fase~~ eraksi eter dan etil asetat yang telah diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi eter dan fraksi etil asetat kental ~~hingga diperoleh fraksi kental.~~ Fraksi Fase air sisanya, dipekatkan langsung di waterbath pada suhu 50 °C hingga diperoleh fraksi air kental. Masing-masing fraksi ~~Fraksi~~ kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

d. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)¹¹.

e. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹². Masing-masing sebanyak 25 μL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 μL Folin-ciocalteu (1:4), goyang dengankocok pelan selama 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 μL natrium karbonat (100 g/L), kocok-goyang dengan pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, dilakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam

galat yang digunakan adalah 62,5; 125; 250; dan -500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

f. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹². Masing-masing sebanyak 50 μ L larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 μ L AlCl_3 10%. Campuran ditambahkan 150 μ L metanol, 10 μ L natrium asetat 1M, dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, dilakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125; 15,625; 31,25; 62,5; dan -125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat, dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

g. Penapisan~~Skrining~~ aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Penapisan~~Skrining~~ aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat (1:9) dan beberapa tetes asam formiat. Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam chamber yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹³.

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 1**. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil penapisanskrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada **Tabel 2**. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol, dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol, dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm, diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), ~~sedangkan k~~ Kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm, diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter daun Wijaya Kusuma dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > fraksi air > fraksi etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**. Penapisan~~Skrining~~ aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan **Gambar 1**, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹⁴. Proses fraksinasi pada penelitian ini menggunakan pelarut eter (nonpolar), etil asetat (semi polar), dan air (polar). Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan

~~fraksi etil asetat.~~ Polaritas eter mirip dengan *n*-heksana dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon, dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹⁴. Berdasarkan penelitian Dandekar *et al.*, (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-; 4-Hydroxy-2-methylacetophenone; Megastigmatrienone; Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl; 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2- methoxyphenol; 2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one; *n*-Hexadecanoic acid; Octadecanoic acid; Phytol; 6-octen-1-ol,3,7-dimethyl; Stigmasterol; Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4- dimethyl; 22-stigmasten-3-one⁵. Klorofil pada batas tertentu juga dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti *n*-heksana dan eter¹⁴. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter, diduga berkaitan dengan kandungan klorofil dan steroid dalam daun Wijaya Kusuma yang banyak tersari dalam eter. Namun, demikian, perlu studi lebih lanjut untuk memastikan hal ini.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter daun Wijaya Kusuma dibandingkan dengan fraksi lainnya (fraksi eter>fraksi air>fraksi etil asetat). Polifenol pada tanaman terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida. Polifenol pada tanaman disintesis dari jalur sikimat¹⁵. Stabilitas polifenol bervariasi karena distribusinya yang tidak seragam pada tumbuhan. Beberapa fenolik merupakan senyawa stabil, sedangkan lainnya lebih rentan terhadap oksidasi maupun suhu. Sifat kelarutan dan pemisahan polifenol dipengaruhi oleh perbedaan struktur kimianya¹⁶. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi¹⁶ seperti etanol-air¹⁴. Namun, pada studi ini, justru fenolik dan flavonoid dalam fraksi nonpolar berada pada kadar yang tinggi. Nawaz et al., (2020) melaporkan bahwa ekstrak yang diperoleh dengan pelarut polar memberikan hasil rendemen yang tinggi dari biji *Phaseolus vulgaris*. Namun demikian, kadar fenolik dan flavonoid total lebih rendah pada ekstrak tersebut dibandingkan dengan ekstrak yang diperoleh dari pelarut nonpolar (heksana dan petroleum eter). Hal ini mengindikasikan bahwa biji tanaman tersebut mengandung senyawa fenolik yang dominan bersifat non-polar¹⁷. Studi literatur membuktikan bahwa tidak ada pelarut yang secara umum dapat diterima sebagai pelarut terbaik untuk ekstraksi dan pemisahan polifenol pada tanaman. Pengaruh besar pada proses deteksi dan kuantifikasi polifenol dalam tanaman sebagai zat terlarut mengacu pada jenis senyawa polifenol didalamnya¹⁶.

Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metode lain seperti Folin-Denis, titrasi ~~permanganat~~^{permanganat},^e maupun kolorimetri dengan garam besi⁷. Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹⁸. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru (PMoW₁₁O₄₀)⁴⁻ yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁹. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹⁸. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl₃ yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm²⁰. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini

untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam¹¹. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁸. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan²¹. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid⁷ atau bahkan senyawa steroid²². Meskipun kandungan fenolik dan flavonoid tinggi pada ekstrak dalam pelarut nonpolar, ternyata aktivitas antioksidannya belum tentu lebih baik dibanding ekstrak dalam pelarut polar. Sebagian besar aktivitas antioksidan yang tinggi ditunjukkan pada ekstrak atau fraksi yang diperoleh dari pelarut polar seperti etanol maupun metanol¹⁷. Dengan demikian, pPengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan. Penelitian yang dilakukan Artini dan Aryasa dinyatakan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak bunga wijaya kusuma pada lapisan petroleum eter adalah alkaloid, triterpenoid, dan saponin sehingga hal ini menguatkan kebaruan dari penelitian ini bahwa kandungan flavonoid yang sebelum belum ditetapkan dalam daun Wijaya Kusuma memiliki peran dalam aktivitas antioksidan²³.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter>fraksi air>fraksi etil asetat). Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang ditapis skrining-menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

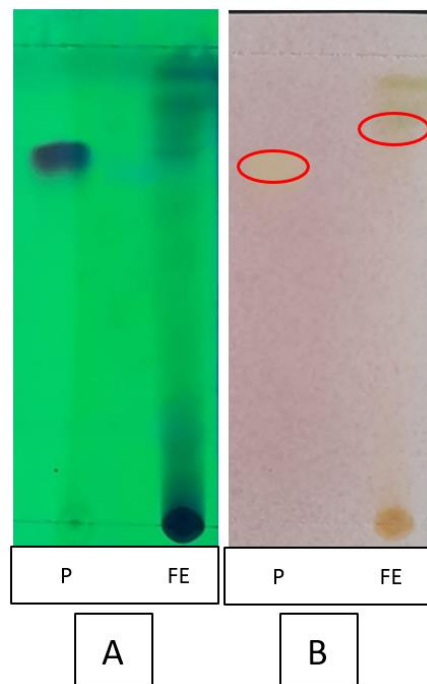
Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada batch 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Dandekar, R., Fegade, B. & Naik, A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of Epiphyllum Oxypetalum Leaves. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **4**, 851–858 (2015).
2. Dwita, L. P. *et al.* Wound healing properties of Epiphyllum oxypetalum (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med.* **26**, 1–5 (2019).
3. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of Epiphyllum oxypetalum. *World J. Pharm. Res.* **4**, 1301–1309 (2015).
4. Devi, K. R. S., Narayana, S. L., Menghani, P. & Georgekutty, J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of Epiphyllum oxypetalum (dc) haw leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **7**, 972–980 (2018).
5. Dandekar, R., Fegade, B. & Bhaskar, V. H. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol

- extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **4**, 149–154 (2015).
6. Moharram, H. A. & Youssef, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J. Food Sci. Technol.* **11**, 31–42 (2014).
 7. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
 8. Bobo-García, G. *et al.* Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 204–209 (2015).
 9. Herald, T. J., Gadgil, P., Perumal, R., Bean, S. R. & Wilson, J. D. High-throughput micro-plate HCl-vanillin assay for screening tannin content in sorghum grain. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 2133–2136 (2014).
 10. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. (Kementerian Kesehatan RI, 2017).
 11. Hanani, E. *Analisis Fitokimia*. (Buku Kedokteran EGC, 2015).
 12. Sembiring, E. N., Elya, B. & Sauriasari, R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* **10**, 123–127 (2018).
 13. Irianti, T. *et al.* DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit. Med. J.* **21**, 38–47 (2016).
 14. Houghton, P. J. & Raman, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* (Springer-Science+Business Media, B.V., 1998). doi:10.1007/978-1-4615-5809-5.
 15. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouysøgu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 586–621 (2011).
 16. Alara, O. R., Abdurahman, N. H. & Ukaegbu, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. *Curr. Res. Food Sci.* **4**, 200–214 (2021).
 17. Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H. & Ullah, N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **56**, e17129 (2020).
 18. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. in *Methods in Enzymology* vol. 229 152–178 (Elsevier Inc., 1999).
 19. Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M. & Lattanzio, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* **91**, 107–110 (2009).
 20. Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **18**, 2328–2375 (2013).
 21. Sethiya, N. K., Raja, M. K. M. M. & Mishra, S. H. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (A Medhya Rasayana): A preliminary assessment. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **4**, 25–30 (2013).
 22. Mooradian, A. D. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* . **45**, 509–511 (1993).
 23. [Artini, NPR., Aryasa IWT. Antioxidant properties of steroids. *Jurnal Ilmiah Medicamento.* **4**\(2\), 107-112 \(2018\).](#)

GAMBAR



Keterangan:

P = pembanding asam galat

FE = fraksi eter

Fase gerak = *n*-heksana:etil asetat (1:9) [dan beberapa tetes asam formiat](#)

Fase diam = plat silika gel GF254

A = Pengamatan di bawah sinar UV 254 nm sebelum disemprot DPPH

B = Pengamatan pada sinar tampak setelah

Gambar 1 Hasil [penapisan skrining](#) aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

TABEL

Tabel 1 Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2 Hasil [penapisan skrining](#) fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	—	√	√	√	—	√
Ekstrak etanol 96%	—	√	√	√	—	√
Fraksi eter	—	√	√	—	—	√
Fraksi etil asetat	—	√	√	—	—	—
Fraksi air	—	√	√	√	—	—

Keterangan: (√) = terdeteksi; (—) = tidak terdeteksi

Tabel 3 Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

**6. Bukti artikel telah terbit *online* pada website
Jurnal
(20 Februari 2022)**

Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Ni Putu Ermi Hikmawanti, Agustin Yumita, Muhammad Rafiq, Lusiana Lusiana

Sari

Epiphyllum oxypetalum (DC.) or Wijaya Kusuma (Cactaceae) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose to determine the levels of total phenolic and flavonoid compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fractions of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) and flavonoids ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) compared to other fractions (ether>water>ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0,85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. The ether fraction of Wijaya Kusuma leaves has potential as a source of polyphenols with antioxidant activity. However, further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics.

Kata Kunci

Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics.

Teks Lengkap:

[PDF](#)

Referensi

Lesmana CA, Hikmawanti NPE, Yumita

A. Pharmacognosy, Phytochemical, and Pharmacology of Wijaya Kusuma (*Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw.)

– An Update Review. *Borneo J Pharm*. 2022;5(2):115–25.

Dandekar R, Fegade B, Naik A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of *Epiphyllum Oxypetalum* Leaves. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015;4(07):851–8.

Dwita LP, Hasanah F, Srirustami R, Repi, Purnomo R, Harsodjo S. Wound healing properties of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin- induced diabetic mice by topical application. *Wound Med*. 2019;26(1):1– 5.

Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Epiphyllum oxypetalum*. *World J Pharm Res*. 2015;4(07):1301–9.

Devi KRS, Narayana SL, Menghani P, Georgekutty J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2018;7(6):972–80.

Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2015;4(1):149–54.

Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95(1):204–9.

Ministry of Health Republic of Indonesia, Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan; 2017. 5–6 p.

Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Herbal Indonesia (FHI). 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2008.

Hanani E. Analisis Fitokimia. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.

Sembiring EN, Elya B, Sauriasari

R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn J.* 2018;10(1):123–7.

Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J.* 2016;21(1):38–47.

Houghton PJ, Raman A. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(1):1–10.

Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants : A Review. *Nat Prod Commun.* 2013;8(12):1821–9.

Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela- Raventos RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 1999. p. 152–78.

Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J.* 2009;91(1):107–10.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.

Sethiya NK, Raja MKMM, Mishra SH. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankhpushpi (*A Medhya Rasayana*): A preliminary assessment. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013;4(1):25–30.

Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;45(6):509–11.

Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol*

Biol. 1993;45(6):509–11.

Artini NPR, Aryasa IWT. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Wijaya Kusuma (*Epiphyllum oxypetalum*). *J Ilm Medicam.* 2018;4(2):2356–4818.

DOI: <https://doi.org/10.24198/ijpst.v10i1.35828>

Reffbacks

- Saat ini tidak ada reffbacks.

[Switch to English](#)

[Back to Top](#)

[View My Stats](#)

Penerbit Universitas Padjadjaran



Jurnal ini terindeks di :



Creative Commons Attribution :



Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology by Universitas Padjadjaran is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License](#).

Based on a work at <http://jurnal.unpad.ac.id/ijpst/>



Phenolics and Flavonoids Content of Wijaya Kusuma Leaves Fractions using Micro-plate Based Assay

Ni P.E. Hikmawanti*, Agustin Yumita, Muhammad Rafiq, Lusiana

Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA,
DKI Jakarta 13460, Indonesia

Submitted 22 September 2021; Revised 7 January 2022; Accepted 14 January 2022; Published 20 February 2023

*Corresponding author: ermy0907@uhamka.ac.id

Abstract

Epiphyllum oxypetalum (DC.) is an ornamental plant which is known to contain polyphenol compounds. The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic and total flavonoids compounds in the fractions of Wijaya Kusuma leaves using microplate-based assay. The 96% ethanol extract, which was obtained from the maceration method of Wijaya Kusuma leaf powder, was fractionated using ether, ethyl acetate, and water using the liquid-liquid method. Each sample was determined phenolic content with Folin-ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl_3 on the microplate. Absorption was measured using a microplate reader. Screening of DPPH radical scavenging activity was identified using the TLC method. The results showed that the extract and fraction of the leaves of Wijaya Kusuma contained phenolic and flavonoid compounds. The ether fraction had the highest phenolic content (35.912 ± 0.54776 mgGAE/g) and flavonoids (0.773 ± 0.008 mgQE/g) compared to other fractions (ether > water > ethyl acetate fraction). There is one yellow spot with an R_f value of 0.85 in the ether fraction which is thought to be a compound capable of scavenging the DPPH radicals. Further research is needed to evaluate the antioxidant capacity in the ether fraction of Wijaya Kusuma leaves.

Keywords: Antioxidant, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Flavonoids, Fraction, High-throughput Microplate Assay, Phenolics.

Kadar Fenolik dan Flavonoid Fraksi Daun Wijaya Kusuma menggunakan Pengujian Berbasis *Micro-plate*

Abstrak

Epiphyllum oxypetalum (DC.) merupakan tanaman hias yang diketahui memiliki kandungan senyawa polifenol. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kadar senyawa fenolik dan flavonoid total pada fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Ekstrak etanol 96%, yang diperoleh dari metode maserasi serbuk daun Wijaya Kusuma, difraksinasi menggunakan pelarut eter, etil asetat, dan air menggunakan metode cair-cair. Masing-masing sampel ditentukan kadar fenolik dengan pereaksi Folin-ciocalteu dan kadar flavonoid menggunakan AlCl_3 pada *micro-plate*. Serapan diukur menggunakan *microplate reader*. Skrining aktivitas peredaman radikal DPPH diidentifikasi dengan menggunakan metode KLT. Hasil menunjukkan ekstrak dan fraksi daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Fraksi eter memiliki kadar fenolik ($35,912 \pm 0,54776$ mgGAE/g) dan flavonoid ($0,773 \pm 0,008$ mgQE/g) tertinggi dibandingkan fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Terdapat satu bercak berwarna kuning dengan nilai R_f 0,85 pada fraksi eter yang diduga merupakan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan dalam fraksi eter daun Wijaya Kusuma.

Kata Kunci: Antioksidan, *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw, Fenolik, Flavonoid, Fraksi, High-throughput Microplate Assay

1. Pendahuluan

Tanaman hias *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) merupakan kelompok kaktus yang di Indonesia dikenal dengan nama Wijaya Kusuma¹. Beberapa aktivitas farmakologi dari ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah berhasil dilaporkan, antara lain sebagai antiinflamasi², penyembuh luka pada mencit diabetes³, anti radikal bebas⁴ dan lain sebagainya. Daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, alkaloid, flavonoid, sterol dan saponin⁵. Dandekar (2015) melaporkan bahwa secara dominan daun Wijaya Kusuma mengandung senyawa steroid⁶. Kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan tanin pada daun Wijaya Kusuma juga berpotensi menjadi sumber antioksidan alami. Ekstrak etanol daun Wijaya Kusuma telah dilaporkan memiliki aktivitas peredaman radikal bebas DPPH dan penghambatan dari kapasitas penangkap Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dibandingkan ekstrak airnya⁴.

Potensi daun Wijaya Kusuma untuk dikembangkan dan dimanfaatkan sebagai tanaman obat belum banyak dikaji serta masih terbatas pada bentuk ekstraknya. Penelitian ini bertujuan menentukan kadar total fenolik dan flavonoid sebagai senyawa antioksidan dengan menggunakan pengujian berbasis *micro-plate*. Teknik ini mampu menganalisis kadar senyawa polifenolik dengan jumlah sampel yang banyak dalam sekali pengujian sehingga memperoleh hasil yang cepat dan akurat jika dibanding cara konvensional menggunakan spektrofotometri *UV-Vis*⁷. Fraksi dengan kadar fenolik dan flavonoid tertinggi kemudian dilakukan skrining untuk mengetahui kemampuannya dalam meredam radikal DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

2. Metode

2.1. Alat

Wadah maserasi berupa toples kaca, *vacuum rotary evaporator* (Eyela), timbangan analitik (Ohaus), *microplate* 96-sumuran (Iwaki), mikropipet (Eppendorf), iMark™ *Microplate Absorbance Reader* (BioRad), *Chamber KLT* (Duran), dan alat-

alat gelas (Pyrex) yang umum digunakan di laboratorium.

2.2. Bahan

Daun Wijaya Kusuma yang diperoleh dari Desa Ciapus, Kecamatan Ciomas, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. Daun dipanen pada bulan Januari 2021 saat musim penghujan. Tanaman kemudian dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor. Pembanding yang digunakan yaitu: asam galat (MarkHerb) dan kuersetin (Sigma-aldrich). Pelarut-pelarut yang digunakan antara lain: etanol 96% (Merck), metanol p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), eter p.a (Merck), n-heksana p.a (Merck) dan aquades. Bahan kimia yang digunakan antara lain: pereaksi *Dragendorff*, *Mayer*, *Bouchardat*, *Lieberman Burchard*, $FeCl_3$ 5%, gelatin 10%, H_2SO_4 pekat, HCl 2N, Folin-ciocalteu, $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1M, natrium karbonat (100 g/L) dan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich). Bahan lain seperti plat silika GF₂₅₄ (Merck).

2.3. Prosedur

2.3.1. Pembuatan serbuk simplisia daun Wijaya Kusuma

Daun Wijaya Kusuma yang telah disortasi basah dan dicuci bersih kemudian dirajang dan dikering-anginkan selama $\pm 6-7$ hari. Simplisia daun kemudian disortasi kering. Simplisia diblender dan diayak dengan ayakan no 40. Serbuk simplisia ditimbang dan siap untuk diekstraksi⁸.

2.3.2. Pembuatan ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Sebanyak 1500 g serbuk daun direndam dalam etanol 96% dengan perbandingan 1:10 bagian. Setelah 24 jam, filtrat dipisahkan dengan ampasnya dan diremaserasi kembali sebanyak 5 kali. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada *waterbath* pada suhu 50°C hingga

diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot serbuk daun yang diekstraksi⁹.

2.3.3. Pembuatan fraksi-fraksi dari ekstrak etanol 96% daun Wijaya Kusuma

Ekstrak etanol 96% sebanyak 25 g ditambahkan etanol sedikit lalu ditambahkan aquades dengan volume akhir adalah 100 mL. Selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam corong pisah 250 mL dan ditambahkan 100 mL eter, dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk 2 lapisan, fase air dimasukkan kembali dan dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama. Fraksi eter dan etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 500 rpm. Pemekatan dilanjutkan pada *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi air dipekatkan langsung di *waterbath* pada suhu 50°C hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental ditimbang bobotnya dan dihitung persentase rendemennya terhadap bobot ekstrak yang diekstraksi.

2.3.4. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi kandungan kimia simplisia, ekstrak, dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma mengikuti prosedur yang tertera pada Hanani (2016), meliputi pengujian keberadaan fenolik, flavonoid, tannin, saponin dan steroid. Hasil deteksi ditunjukkan dengan perubahan warna tertentu (uji fenolik, flavonoid), terbentuknya endapan (uji alkaloid dan tanin) serta buih yang stabil (uji saponin)¹⁰.

2.3.5. Penentuan kadar fenolik total

Penentuan kadar fenolik dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018) (11). Masing-masing sebanyak 25 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (asam galat) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 100 µL Folin-ciocalteu (1:4), kocok pelan 60 detik. Biarkan campuran selama 240 detik dalam

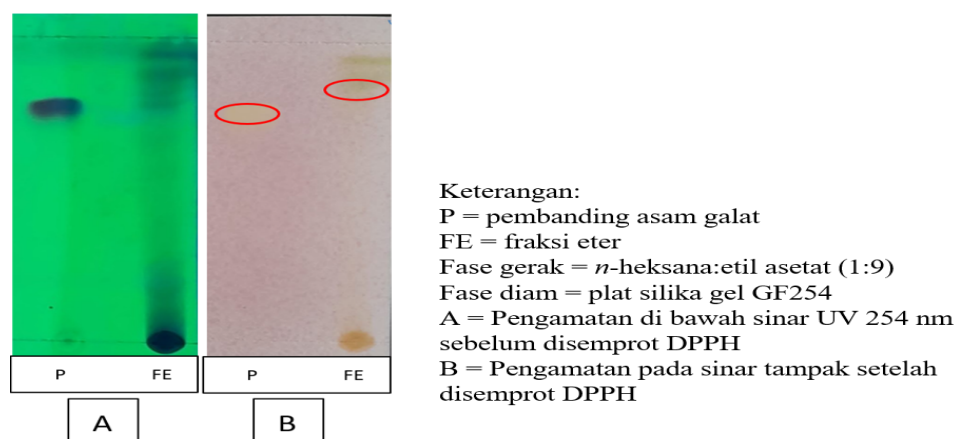
kondisi terlindung dari cahaya. Selanjutnya, tambahkan 75 µL natrium karbonat (100 g/L), kocok pelan selama 1 menit. Setelah inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar, lakukan pembacaan absorbansi pada 750 nm. Konsentrasi larutan asam galat yang digunakan adalah 62,5-500 ppm. Konsentrasi ekstrak dan fraksi diujikan adalah 10.000 ppm. Kadar fenolik total dinyatakan sebagai mgGAE per g ekstrak atau fraksi.

2.3.6. Penentuan kadar flavonoid total

Penentuan kadar flavonoid dilakukan pada *micro-plate* 96-sumuran yang diadaptasi dari Sembiring et al., (2018)¹¹. Masing-masing sebanyak 50 µL larutan uji (larutan ekstrak, fraksi eter, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan pembanding (kuersetin) pada konsentrasi tertentu ditambahkan dengan 10 µL AlCl₃ 10%. Campuran ditambahkan 150 µL metanol, 10 µL natrium asetat 1M dan selanjutnya diinkubasi dalam kondisi terlindung dari cahaya selama 40 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi selesai, lakukan pembacaan absorbansi pada 415 nm. Konsentrasi larutan kuersetin yang digunakan adalah 7,8125-125 ppm. Konsentrasi ekstrak, fraksi etil asetat dan air yang diujikan adalah 5000 ppm, sedangkan fraksi eter adalah 1250 ppm. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai mg ekivalen kuersetin (mgQE) per g ekstrak atau fraksi.

2.3.7. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter menggunakan metode KLT

Skrining aktivitas antioksidan pada fraksi eter dilakukan dengan menggunakan metode KLT. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat (1:9). Pembanding yang digunakan adalah asam galat. Larutan fraksi (1250 ppm) dan asam galat (10 ppm) ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dalam *chamber* yang sudah jenuh oleh uap fase gerak. Proses deteksi bercak dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot menggunakan larutan radikal DPPH. Keberadaan senyawa dengan aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning¹².



Gambar 1. Skrining aktivitas antioksidan fraksi eter terhadap radikal DPPH dengan metode KLT

3. Hasil

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 1. Fraksi air memiliki rendemen paling tinggi (25,36%) terhadap 25 g ekstrak yang difraksinasi. Sedangkan fraksi etil asetat memiliki rendemen yang paling rendah (3,76%) dibanding fraksi lainnya. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma dapat dilihat pada Tabel 2. Senyawa fenolik dan flavonoid terkandung di semua sampel. Tanin ditemukan pada simplisia, ekstrak etanol dan fraksi air. Steroid terdapat dalam simplisia, ekstrak etanol dan fraksi eter.

Berdasarkan kurva kalibrasi dari asam galat pada konsentrasi 62,5-500 ppm diperoleh persamaan yaitu $y = 0,002x + 0,1225$ ($R^2 = 0,9925$), sedangkan kurva kalibrasi dari kuersetin pada konsentrasi 7,8125-125 ppm diperoleh persamaan garis yaitu $y = 0,0056x + 0,1125$ ($R^2 = 0,9964$). Kadar fenolik dan

flavonoid tertinggi ditemukan pada fraksi eter dibanding fraksi lainnya (fraksi eter > air > etil asetat). Kadar fenolik dan flavonoid dari masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada Tabel 3. Skrining aktivitas antioksidan hanya dilakukan pada fraksi dengan kandungan fenolik tertinggi, yaitu fraksi eter. Berdasarkan Gambar 1, fraksi eter mengandung senyawa dengan aktivitas peredam radikal DPPH secara kualitatif yang ditunjukkan dengan bercak yang berwarna kuning pada plat KLT. Bercak asam galat sebagai peredam radikal DPPH berada pada nilai R_f 0,75, sedangkan bercak yang muncul pada fraksi eter ada pada nilai R_f 0,85.

4. Pembahasan

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan menggunakan teknik cair-cair berdasarkan polaritas pelarut yang digunakan¹³. Hasil penelitian yang diperoleh

Tabel 1. Hasil ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Bobot	Rendemen
Ekstrak etanol 96%	86,30 g	5,75 %
Fraksi eter	5,21 g	20,82 %
Fraksi etil asetat	0,94 g	3,76 %
Fraksi air	6,34 g	25,36 %

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia simplisia, ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kandungan kimia					
	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Tanin	Saponin	Steroid
Simplisia	-	+	+	+	-	+
Ekstrak etanol 96%	-	+	+	+	-	+
Fraksi eter	-	+	+	-	-	+
Fraksi etil asetat	-	+	+	-	-	-
Fraksi air	-	+	+	+	-	-

Keterangan: (+) = terdeteksi; (-) = tidak terdeteksi

Tabel 3. Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak dan fraksi-fraksi daun Wijaya Kusuma

Sampel	Kadar fenolik total (mgGAE/g)	Kadar flavonoid total (mgQE/g)
Ekstrak etanol 96%	18,383±1,36329	1,198±0,811
Fraksi eter	35,912±0,54776	0,773±0,008
Fraksi etil asetat	8,325±1,01765	0,066±0,036
Fraksi air	16,442±0,27423	0,106±0,007

menunjukkan fraksi eter yang merupakan fraksi kurang polar yang memiliki nilai rendemen yang cukup tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Polaritas eter (indeks polaritas = 0.117) mirip dengan n-heksana (indeks polaritas 0.009)¹⁴ dengan kemampuannya dalam menarik senyawa kurang polar seperti lemak, asam lemak, klorofil, fitosterol dan lainnya. Sedangkan pelarut etil asetat dengan polaritas medium mampu menarik beberapa alkaloid, aglikon dan beberapa glikosida dengan sedikit gula. Air memiliki polaritas paling tinggi dengan kemampuannya dalam menarik senyawa sakarida, asam amino, serta glikosida-glikosida dengan banyak gugus gula¹³. Berdasarkan penelitian Dandekar et al., (2015), ekstrak daun Wijaya Kusuma didominasi oleh senyawa steroid seperti ethanone, *1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-4-Hydroxy-2-methylacetophenone*; *Megastigmatrienone*; *Cycloocta-1,3,6-triene,2,3,5,5,8,8,-hexamethyl*; *4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol*; *2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one*; *n-Hexadecanoic acid*; *Octadecanoic acid*; *Phytol*; *6-octen-1-ol,3,7-dimethyl*; *Stigmasterol*; *Cholesta-22,24-dien-5-ol,4,4-dimethyl*; *22-stigmasten-3-one*⁶. Klorofil pada batas tertentu dapat terekstraksi dalam etanol dan dapat terpartisi dalam pelarut non polar seperti n-heksana dan eter¹³. Hal ini berkaitan erat dengan hasil penelitian yang menunjukkan rendemen yang tinggi pada fraksi eter.

Fenolik dan flavonoid juga ditemukan dengan kadar yang tinggi pada fraksi eter. Polifenol terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) dan glikosida¹⁵. Berkaitan dengan banyaknya hidroksil pada strukturnya, biasanya polifenol bersifat cenderung polar dan lebih suka larut dalam pelarut dengan polaritas yang lebih tinggi seperti etanol-air¹³. Penentuan kadar fenolik menggunakan Folin-

ciocalteu memiliki keunggulan dibanding dengan metodelain seperti Folin-Denis, titrasi permanganate maupun kolorimetri dengan garam besi¹⁶. Metode ini memiliki sensitivitas dan reproduksibilitas yang baik dan sangat mudah untuk dilakukan¹⁷. Pengujian Folin-ciocalteu bergantung pada transfer elektron dalam medium alkali dari senyawa fenolik untuk membentuk kompleks fosfomolibdat/asam fosfotungstat untuk membentuk kompleks biru ($\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$) yang serapannya dapat diukur sekitar 760 nm. Alkalinitas akibat reaksi dengan natrium karbonat menyebabkan proses oksidasi fenol menjadi lebih cepat¹⁸. Reaksi ini sangat dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan terbentuknya warna biru yang lebih cepat¹⁷. Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenolik. Senyawa ini memiliki sistem cincin aromatis terkonjugasi yang memiliki serapan pada sinar UV. Pengujian kadar flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi AlCl_3 yang dapat diukur pada rentang panjang gelombang 410-423 nm¹⁹. Gugus hidroksil pada C nomor 3 atau 5 serta keto pada C nomor 4 bereaksi dengan pereaksi ini untuk membentuk kompleks warna kuning cerah yang stabil dalam suasana asam¹⁰. Meskipun metode pengujian kadar polifenol dengan *micro-plate* ini cepat, hemat biaya karena penggunaan pelarut dan pereaksi yang minimal serta hasil yang akurat, namun penting untuk diperhatikan bahwa ada kemungkinan terbentuk gelembung maupun presipitasi selama seluruh pengujian yang menyebabkan pengukuran menjadi tidak stabil⁷. Selain itu, penggunaan sampel dengan jumlah yang sangat sedikit harus ditangani dengan segera selama proses pengujian untuk menghindari penguapan pelarut yang tinggi di dalam tiap sumuran yang dapat menyebabkan kendala dalam proses pembacaan absorbansi (serapan).

Peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan pada plat KLT dapat terdeteksi dengan munculnya bercak berwarna kuning yang stabil selama 30 menit setelah dilakukan penyemprotan²⁰. Hasil menunjukkan keberadaan senyawa yang mampu meredam radikal DPPH pada fraksi eter. Namun, diduga jenis fenoliknya bukanlah suatu asam galat karena bercak kuning yang muncul tidak sejajar dengan bercak asam galat ($R_f = 0,75$). Aktivitas antioksidan pada sampel dapat diperankan oleh fenolik, flavonoid¹⁶ atau bahkan senyawa steroid²¹. Pengujian antioksidan secara kuantitatif lebih lanjut dan penelusuran senyawa yang berperan terhadapnya pada fraksi daun Wijaya Kusuma masih perlu dilakukan.

5. Kesimpulan

Fraksi eter daun Wijaya Kusuma mengandung kadar fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Kandungan senyawa pada fraksi eter memiliki aktivitas peredaman terhadap radikal DPPH yang diskriminasi menggunakan metode KLT.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan UHAMKA yang telah mendukung penelitian pada *batch* 1 tahun 2020, dengan nomor: 159/F.03.07/2021.

Daftar Pustaka

1. Lesmana CA, Hikmawanti NPE, Yumita A. Pharmacognosy, Phytochemical, and Pharmacology of Wijaya Kusuma (*Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw.) – An Update Review. *Borneo J Pharm*. 2022;5(2):115–25.
2. Dandekar R, Fegade B, Naik A. Evaluation of Anti Inflammatory Activity of Alcohol and Aqueous Extract of *Epiphyllum Oxypetalum* Leaves. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015;4(07):851–8.
3. Dwita LP, Hasanah F, Srirustami R, Repi, Purnomo R, Harsodjo S. Wound healing properties of *Epiphyllum oxypetalum* (DC.) Haw. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic mice by topical application. *Wound Med*. 2019;26(1):1–5.
4. Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. In vitro evaluation of free radical scavenging activities of *Epiphyllum oxypetalum*. *World J Pharm Res*. 2015;4(07):1301–9.
5. Devi KRS, Narayana SL, Menghani P, Georgekutty J. Microscopic, pharmacognostic and phytochemical screening of *Epiphyllum oxypetalum* (dc) haw leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2018;7(6):972–80.
6. Dandekar R, Fegade B, Bhaskar VH. GC-MS analysis of phytoconstituents in alcohol extract of *Epiphyllum oxypetalum* leaves. *J Pharmacogn Phytochem*. 2015;4(1):149–54.
7. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95(1):204–9.
8. Ministry of Health Republic of Indonesia, Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II*. II. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan; 2017. 5–6 p.
9. Kementerian Kesehatan RI. *Farmakope Herbal Indonesia (FHI)*. 2nd ed. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2008.
10. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2015. 34–45 p.
11. Sembiring EN, Elya B, Sauriasari R. Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn J*. 2018;10(1):123–7.
12. Irianti T, Murti YB, Kanistri DN, Pratiwi DR, Kuswandi, Kusumaningtyas RA. DPPH Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*Muntingia calabura* L.). *Tradit Med J*. 2016;21(1):38–47.
13. Houghton PJ, Raman A. Laboratory

- Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. 1st ed. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts. Springer-Science+Business Media, B.V.; 1998. 14–16, 24–31, 39–52 p.
14. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(1):1–10.
 15. Arceusz A, Wesolowski M, Konieczynski P. Methods for Extraction and Determination of Phenolic Acids in Medicinal Plants : A Review. *Nat Prod Commun.* 2013;8(12):1821–9.
 16. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.* 2010;15:7313–52.
 17. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: *Methods in Enzymology.* Elsevier Inc.; 1999. p. 152–78.
 18. Cicco N, Lanorte MT, Paraggio M, Viggiano M, Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem J.* 2009;91(1):107–10.
 19. Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH, Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules.* 2013;18(2):2328–75.
 20. Sethiya NK, Raja MKMM, Mishra SH. Antioxidant markers based TLC-DPPH differentiation on four commercialized botanical sources of Shankpushpi (A Medhya Rasayana): A preliminary assessment. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013;4(1):25–30.
 21. Mooradian AD. Antioxidant properties of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol .* 1993;45(6):509–11.