



Potensi Antioksidan, Kadar Fenolat dan Flavonoid Total Ranting *Tetracera indica* serta Uji Toksisitas terhadap sel RAW 264,7

Vera Ladeska*, Siti Saudah, & Rosandea Ingrid

Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof.Dr.Hamka, Daerah Khusus Ibukota Jakarta

ABSTRACT: In ethnomedicine, *Tetracera indica* has many pharmacological properties, including the treatment of diabetes, hypercholesterolemia, fever, and gout. Since diseases caused by free radicals need to be counteracted with antioxidants, this research aimed to discover the active antioxidant extract using the FRAP method and toxicity test on RAW 264.7 cells. Extraction was performed by ultrasonic-assisted extraction with n-hexane, ethyl acetate, and 96% ethanol as solvents. Total phenol content was measured colourimetrically using Folin-Ciocalteu reagent and flavonoid content using AlCl₃. Toxicity test with MTT on RAW 264.7 macrophage cells. The highest total phenol content was 210,229 mg GAE/g found in the 96% ethanol extract. The ethyl acetate extract had the highest total flavonoid content, with a value 63,138 mgQE/g. The antioxidant activity of quercetin was found to be 13600 FeEAC mol/g, while the potential antioxidant activity of the ethanol extract in the test sample was 2227,926 FeEAC mol/g. Further, the IC₅₀ value for the ethyl acetate extract of *Tetracera indica* was 23,877 µg/mL. Based on the results, the *Tetracera indica* plant can be developed as an antioxidant and anti-cancer agent.

Keywords: *Tetracera indica*; antioxidant; TPC; TFC; MTT assay.

ABSTRAK: Tanaman *Tetracera indica* secara etnomedisina memiliki banyak khasiat farmakologi antara lain digunakan untuk pengobatan diabetes, hiperkolesterol, mengatasi demam, asam urat dll. Gejala penyakit bisa disebabkan oleh paparan radikal bebas yang perlu diantisipasi dengan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah pencarian ekstrak aktif antioksidan dengan metode FRAP dan uji toksisitas terhadap sel RAW 264,7. Ekstraksi dilakukan secara *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 96%. Pengukuran kadar fenol total dengan pereaksi *Folin-ciocalteu*, dan kadar flavonoid dengan metode kolorimetri. Uji Toksisitas dengan *MTT assay* terhadap sel makrofag RAW 264,7. Kadar total fenol tertinggi terdapat pada ekstrak etanol 96% sebesar 210,229 mg GAE/g. Kadar total flavonoid tertinggi pada ekstrak etil asetat dengan nilai sebesar 63,138 mgQE/g. Aktivitas antioksidan kuersetin didapatkan 13600 FeEAC (mol/g), sedangkan pada sampel uji aktivitas antioksidan potensial pada ekstrak etanol 96% dengan nilai 2227,926 FeEAC (mol/g). Sementara nilai IC₅₀ untuk ekstrak etil asetat ranting *Tetracera indica* adalah 23.877 µg/mL. Berdasarkan hasil yang diperoleh tanaman *Tetracera indica* bisa dikembangkan sebagai agen antioksidan dan antikanker.

Kata kunci: *Tetracera indica*; antioksidan; TPC; TFC; MTT assay.

Pendahuluan

Pola hidup yang tidak sehat akibat peningkatan konsumsi makanan instan, merokok dan polusi dapat menyebabkan munculnya radikal bebas. Radikal bebas adalah atom yang tidak stabil yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Elektron ini cenderung mengikat atom dari molekul lain, menghasilkan senyawa abnormal dan memulai reaksi berantai dalam tubuh. Efek negatif radikal bebas pada jaringan tubuh dapat diatasi dengan pemberian antioksidan. Jika radikal bebas tidak segera diatasi akan dapat melukai sel atau jaringan dan menstimulasi kerusakan organ. Kerusakan organ berpotensi memicu munculnya penyakit kronis. Antioksidan alami yang terkandung dalam tanaman antara

lain senyawa polifenol dan vitamin. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang termasuk kedalam kelompok besar polifenol yang mempunyai kemampuan sebagai penangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi lipid. Sejumlah tanaman yang mengandung flavonoid memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, anti radang, anti alergi, dan anti kanker [1].

Salah satu tanaman yang mengandung senyawa fenol dan flavonoid adalah tumbuhan mempelas (*Tetracera indica* (Christm. & Panz.) Merr) Tumbuhan ini mengandung senyawa flavonoid seperti kuersetin, kaemferol, apigenin, rhamnetin dan azaleatin [2].

Article history

Received: 10 Juli 2022
Accepted: 19 August 2022
Published: 24 Okt 2022

Access this article



*Corresponding Author: Vera Ladeska

Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof.Dr.Hamka, Jl. Delima II Malaka Sari, Kec. Duren Sawit, Kota Jakarta Timur, Daerah Khusus Ibukota Jakarta, 13460 | Email: vera_ladeska@uhamka.ac.id

Ekstrak etanol batang *T. indica* mengandung 4 mono flavonoid: wogonin, norwogonin, kuersetin dan tektokrisin [3]. Sedangkan ekstrak etanol daun *T. indica* dilaporkan mengandung 5,7-dihidroksiflavon-O-8-sulfat, tektokrisin, wogonin, norwogonin, kaemferol, dan kuersetin [4]. Isolasi dari ekstrak etil asetat batang *T. indica* dihasilkan asam betulinat dan 5,7-dihidroksil-8-metoksiflavon [5]. Ekstrak heksana dari kulit batang *T. indica* mengandung β -sitosterol dan asam betulinat [6]. Senyawa kimia lain yang dilaporkan dari daun *T. indica* mengandung 4 senyawa terpenoid yaitu betulina, asam betulinat, lupeol dan β -sitosterol [7]. Menurut riset yang dilakukan Dogarai tahun 2011 menemukan 6 senyawa flavonoid dari daun *T. indica* yaitu 5,7-dihidroksi 8- metoksiflavon (wogonin), 5,7,8-trihidroksi flavon, isocutellarein metil eter, kaempferol, kuersetin, tektokrisin dan 4 senyawa terpenoid yaitu β -sitosterol, lupeol, betulina dan asam betulinat [8]. Banyaknya senyawa turunan fenol dan flavonoid yang terkandung dalam *T. indica* menjadi target pengembangan senyawa antioksidan yang berasal dari bahan alam. Dan ini tentunya sebagai langkah awal dalam mengatasi penyakit kronis. Inilah yang menjadi pentingnya riset ini dilakukan.

Tanaman *T. indica* memiliki banyak khasiat dan sering digunakan oleh herbalis lokal untuk pencegahan dan pengobatan penyakit. diantaranya untuk menurunkan tekanan darah tinggi, antidiabetes dan antihiperurisemia [4]. Dilihat dari perkembangan pemakaian secara tradisional dan kandungan kimia tanaman ini kedepannya berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan. Belum banyak riset yang meneliti bioaktivitas ini, dan ini menjadi awal untuk mengatasi gejala penyakit kronis. Penelitian ini juga bertujuan menguji toksisitas ekstrak aktif dengan menggunakan sel makrofag RAW 264.7 secara in vitro.

Metode Penelitian

Bahan

Tumbuhan *Tetracera indica* (Christm. & Panz.) Merr. diperoleh dari Kebun Pendidikan Cikabayan, Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat Tripsin EDTA, sel RAW 264.7 (ATCC), Fetal Bovine Serum (FBS) (Biosera), DMSO, SDS, Penisillin-Streptomisin (Sigma, Jerman), 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Bio Basic), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, Jerman), metanol pro analisis (Merck, Jerman), asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, asam klorida, natrium asetat Merck (Darmstadt, Germany), natrium hidroksida, serbuk Mg, ammonia, gelatin, $AlCl_3$, $FeCl_3$, TPTZ (Sigma, Jerman), kuersetin

(Mark Herb), besi (II) sulfat heptahidrat (Sigma, Jerman), *folin-Ciocalteu* (Sigma Aldrich, Jerman), asam galat standar (Sigma Aldrich, Jerman), plat KLT (Merck, Jerman), silika gel GF 60 (Merck, Jerman), silika gel GF 254 (Merck, Jerman),

Alat

Peralatan yang digunakan terdiri dari *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE), *Universal Microplate Reader* (Bio-Tek® ELX 800™), Moisture Balance (Mettler Toledo HB43-S), *haemocytometer*, UV box (Camag), chamber (Camag), kromatografi kolom, hot plate, *vacuum rotary evaporator* (Eyela N-1100), bejana KLT 10x20, bejana KLT 20x20 (Camag), serta alat-alat gelas lain yang lazim digunakan dalam laboratorium.

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol 96 % ranting *Tetracera indica* dilakukan dengan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) dimana satu bagian serbuk simplisia dengan 10 bagian etanol 96%. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) bertingkat dengan pelarut berturut-turut n-heksana, etil asetat, dan etanol 96%. Waktu ekstraksi 50 menit pada suhu ruang dengan frekuensi 42 kHz. Ekstrak yang diperoleh disaring, dan filtrat dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50-60°C dan penangas air sampai didapatkan ekstrak kental. Pergantian pelarut dilakukan setelah ampas kering pada suhu ruang. Proses ekstraksi ini menghasilkan 3 ekstrak terpurifikasi yaitu ekstrak n-heksana (EH), ekstrak etil asetat (EA) dan ekstrak etanol 96% (ET). Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali (triplo) [9].

Identifikasi Fenolik, Flavonoid, dan Triterpenoid/ Steroid

Identifikasi kualitatif fenol, flavonoid dan triterpenoid/steroid dilakukan terhadap ekstrak n-Heksana, etil asetat dan etanol 96% dengan metode KLT menggunakan Silika Gel GF 254. Identifikasi dilakukan dengan prosedur berikut:

Uji Fenolik dengan pereaksi $FeCl_3$

Fase gerak yang digunakan kombinasi pelarut Heksana : etil asetat: (7:3) dengan pereaksi semprot menggunakan $FeCl_3$ 5%. Bercak positif berupa fenolik apabila berwarna hijau, merah ungu, biru atau hitam yang kuat [9].

Uji Flavonoid menggunakan pereaksi $AlCl_3$

Fase gerak yang digunakan kombinasi pelarut Heksana : etil asetat : metanol (5:2:1) dengan pereaksi semprot $AlCl_3$ 10%. Senyawa perbandingan yang digunakan

kuersetin dengan kadar 1% dan bercak positif berupa flavonoid apabila berfluoresensi kuning, hijau atau biru dibawah sinar UV 366. Plat disemprot menggunakan $AlCl_3$ lalu dipanaskan dalam oven selama 10 menit dengan suhu $105^\circ C$, bercak positif mengandung flavonoid bila berwarna kuning [9].

Uji Triterpenoid/Steroid dengan *Liebermann Burchard*

Fase gerak yang digunakan kombinasi pelarut heksan-etil asetat (8:2). Pereaksi semprot menggunakan *Liebermann Burchard*, hasil positif triterpenoid apabila berwarna merah bata dan steroid berwarna hijau [9].

Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenol diukur menggunakan *microplate reader 96 well* [10]. Sebanyak 10 mg EA/ET dilarutkan dengan metanol 10 mL hingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Dibuat pengenceran menjadi 500 ppm. EH sebanyak 20 mg dilarutkan dengan metanol 10 mL sehingga konsentrasi 2000 ppm. Dibuat pengenceran menjadi 1500 ppm. Dari konsentrasi sampel dipipet sebanyak 20 μL ditambahkan pereaksi 100 μL *Folin-Ciocaltean* (1:10) dan dishaker. Kemudian dibiarkan selama 4 menit, ditambahkan 80 μL larutan Na_2CO_3 7,5%, dishaker dan diinkubasi selama 2 jam ditempat gelap. Absorbansi larutan ekstrak diukur dengan pada panjang gelombang maksimum 750 nm, lakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Blanko dibuat dengan cara yang sama, dimana sampel digantikan dengan metanol pro analisa dengan volume yang sama. Kurva baku asam galat dibuat dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 $\mu g/mL$. Hasil dinyatakan sebagai GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/g ekstrak.

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri yang mengacu pada prosedur Farasat, et al 2014 [11] dengan kuersetin sebagai standar. Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan kedalam 10 mL metanol didalam labu ukur sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dipipet 20 μL ditambahkan berturut-turut 20 μL $AlCl_3$, 20 μL kalium asetat 1 M dan 180 μL aquadest. Campuran larutan dishaker 60 detik, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Intensitas warna larutan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm. Sebagai blanko $AlCl_3$ digantikan aquadest dengan volume yang sama. Larutan baku induk kuersetin dibuat dengan 5 seri konsentrasi yaitu 20, 40, 60, 100 dan 160 $\mu g/mL$. Kadar flavonoid total dihitung berdasarkan kesetaraan terhadap kuersetin. Hasil dinyatakan sebagai QE (*quercetin equivalent*)/g ekstrak.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Metode FRAP

Timbang seksama 10 mg ekstrak/kuersetin dilarutkan dengan metanol pro analisa 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Kemudian lakukan pengenceran untuk EA/ET/kuersetin hingga didapatkan konsentrasi 500 ppm. Konsentrasi EA/ET yang diuji 150 ppm, EH 700 ppm dan kuersetin sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 10 ppm. Pipet 30 μL larutan ekstrak/kuersetin dan ditambahkan 270 μL reagen FRAP. Dihomogenkan ± 60 detik dan inkubasi selama 30 menit pada suhu $37^\circ C$ pada tempat gelap. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Lakukan sebanyak 3 kali penimbangan pada ekstrak dengan setiap penimbangan dilakukan 3 replikasi. Blanko dibuat dengan cara yang sama dimana Ammonium Ferrous Sulfat (AFS) digantikan dengan metanol pro analisa dengan volume yang sama. *Plate blank* berisi metanol pro analisa 300 μL . Kurva kalibrasi AFS dibuat dengan 5 seri konsentrasi 75, 150, 300, 600, dan 1200 mM yang dilarutkan dengan aquadest [12,13]. Hitung aktivitas antioksidan dengan rumus sebagai berikut:

$$FeEAC = \frac{\Delta A}{GRAD} \times \frac{Av}{Spv} \times D \times \frac{1}{Cext} \times 10^5$$

Keterangan:

FeEAC : kesetaraan antara aktivitas antioksidan ($\mu mol/g$) dengan ion ferri

ΔA : abs sampel sesudah pengurangan dengan blanko

GRAD : gradien grafik kurva kalibrasi AFS

Av : total volume pengujian

Spv : total volume sampel pada pengujian

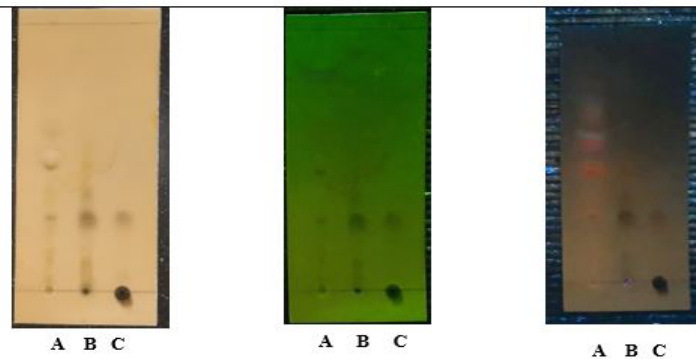
D : factor pengenceran sampel

$Cext$: konsentrasi stok sampel (g/L)

Uji Toksisitas Ekstrak Aktif

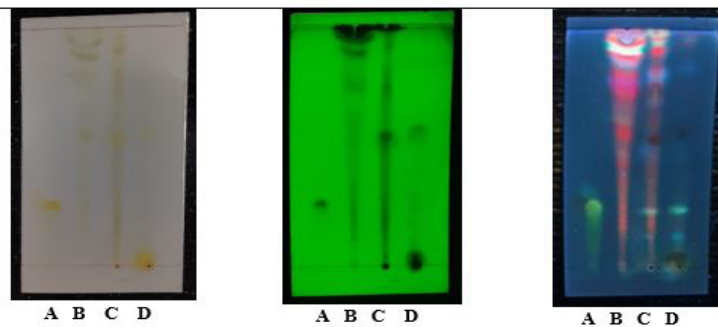
Uji toksisitas sel dilakukan dengan metode MTT *assay* terhadap sel RAW 264.7 (Zheng et al, 2017 dengan sedikit modifikasi) [14]. Diamati kondisi sel, sel dipanen saat telah mencapai konfluensi 80%. Media kultur dibuang secara perlahan, kemudian sel dicuci dengan PBS, tambahkan tripsin EDTA. Inkubasi dalam inkubator CO_2 5% $37^\circ C$ selama 3 menit. Ditambahkan media DMEM sebanyak 5 ml untuk inaktivasi tripsin. Sel diresuspensi menggunakan pipet, dan dipindahkan ke *conical tube* steril baru. Sel disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 1 mL media kultur pada pellet yang tersisa. Sel dihitung menggunakan *haemocytometer* dan *tripan blue* untuk mengetahui jumlah sel yang tersedia dalam 1 mL media. Sel diencerkan dengan

Identifikasi Fenol

**Sinar Tampak****UV 254****UV 366**

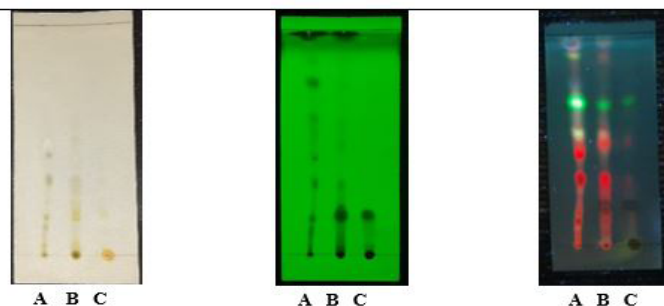
Keterangan: A: ekstrak *n*-heksan, B: ekstrak etil asetat, C: ekstrak etanol 96%

Identifikasi Flavonoid

**Sinar Tampak****UV 254****UV 366**

Keterangan: A: Kuersetin, B: ekstrak *n*-heksan, C: ekstrak etil asetat, D: ekstrak etanol 96%

Identifikasi Triterpenoid/Steroid

**Sinar Tampak****UV 254****UV 366**

Keterangan: A: ekstrak *n*-heksan, B: ekstrak etil asetat, C: ekstrak etanol 96%

Gambar 1. Pola kromatogram ekstrak *n*-heksan: ekstrak etil asetat: ekstrak etanol 96%

media kultur hingga mencapai jumlah sel yang diinginkan. Pindahkan sel pada *96 well plate* dengan volume 100 μL tiap sumuran. Sel diinkubasi pada inkubator CO_2 5% 37° C selama semalam (*overnight*).

Persiapan sampel uji dengan menimbang sampel 10 mg, ditambahkan DMSO sehingga konsentrasi stok sampel menjadi 50.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dibuat seri konsentrasi sampel menjadi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 15,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Setelah 24 jam, medium kultur pada sumuran dibuang. Dimasukkan sampel yang telah diencerkan dengan media kultur pada sumuran, masing-masing 100 μL (masing-masing konsentrasi dibuat triplo), dimasukkan medium kultur saja pada well untuk kontrol sel. Sel kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam dan didokumentasikan. Setelah 24 jam, media kembali dibuang, dan sel dicuci dengan menggunakan PBS. Ditambahkan reagen MTT yang sudah diencerkan medium sebanyak 100 μL pada sumuran, kemudian sel diinkubasi kembali pada inkubator selama 4 jam. Setelah 4 jam, ditambahkan SDS 10% sebanyak 100 μL , bungkus plate dengan aluminium foil, dan inkubasi sambil *dishake* pada inkubator pada suhu ruang semalaman (*overnight*). Setelah *overnight*, plate dibaca absorbansinya menggunakan *ELISA Reader* pada panjang gelombang 573 nm [14-17].

Hasil dan Diskusi

Determinasi merupakan tahap awal dalam penelitian untuk mengetahui identitas dan memastikan kebenaran jenis dari tanaman yang akan diteliti. Determinasi tanaman dilakukan di Organisasi Riset Ilmu Pengetahuan Hayati, Pusat Riset Biologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional

(BRIN) dengan no koleksi: B-689/V/DI.05.07/11/2021. menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tetracera indica* (Christm.& Panz) Merr dengan nama daerah mempelas dan suku *Dilleniaceae*.

Bagian tanaman yang digunakan adalah rantingnya. Sortasi basah digunakan untuk memisahkan ranting dari pengotor organik dan anorganik. Ranting dicuci bersih, ditiriskan, dikeringkan dengan sinar matahari hingga ranting mudah dipatahkan. Pengeringan bertujuan mengurangi kadar air sehingga dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme, mengurangi aktivitas enzim pengurai, mencegah perubahan fitokimia dan mempertahankan mutu simpleksia selama penyimpanan [21]. Metode ekstraksi yang digunakan adalah *Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) secara bertingkat dengan urutan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan etanol 96%. Perbedaan pelarut dan metode ekstraksi mempengaruhi rendemen ekstraksi, pelarut etanol 96% yang bersifat polar didapatkan rendemen ekstrak tertinggi yaitu 1,834%. Prinsip ekstraksi ultrasonik adalah perambatan gelombang ultrasonik dari sumber getaran sonikator dalam medium pelarut secara longitudinal.

Hasil skrining fitokimia metabolit sekunder *Tetracera indica* mengandung senyawa terpenoid, steroid, fenol dan flavonoid. Pengamatan dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dengan penampak bercak yang sesuai. Pada ekstrak heksan positif mengandung senyawa triterpenoid, sedangkan ekstrak etil asetat dan etanol positif mengandung fenolik dan flavonoid. Profil kromatogram terhadap ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol 96% dapat dilihat pada [Gambar 1](#).

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan metode *Folin Ciocalteu*. Pereaksi ini mengoksidasi fenolat

Tabel 1. Hasil kadar fenol total ekstrak ranting *Tetracera indica* (Christm. & Panz) Merr.

Sampel	Kadar Fenolik Total (mgGAE/gram) \pm SD
Ekstrak <i>n</i> -Heksan	19,756 \pm 0,081
Ekstrak Etil Asetat	65,254 \pm 1,062
Ekstrak Etanol 96%	210,229 \pm 1,202

Tabel 2. Hasil kadar flavonoid total ekstrak ranting *Tetracera indica* (Christm. & Panz) Merr.

Sampel	Kadar Flavonoid Total (mgGAE/gram) \pm SD
Ekstrak <i>n</i> -Heksan	46,409 \pm 1,156
Ekstrak Etil Asetat	63,138 \pm 0,388
Ekstrak Etanol 96%	39,742 \pm 0,541

Tabel 3. Hasil pengujian antioksidan metode FRAP ekstrak ranting *Tetracera indica* (Christm. & Panz) Merr.

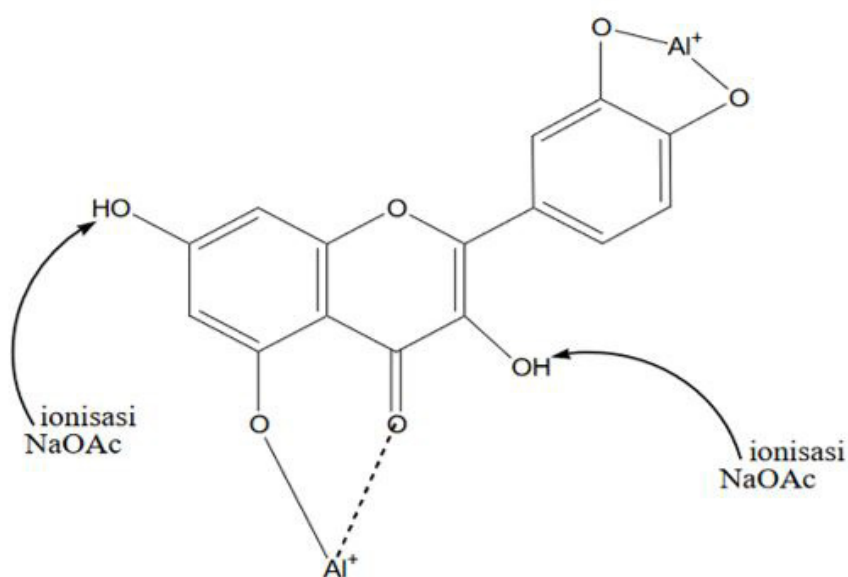
Sampel	FeEAC (mol/gram) ± SD
Ekstrak n-Heksan	228,322 ± 0,899
Ekstrak Etil Asetat	937,684 ± 26,165
Ekstrak Etanol 96%	2227,926 ± 2,096
Kuersetin	13600

(garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen *Folin Ciocalteu* hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat [18]. Untuk membuat kondisi basa digunakan Na_2CO_3 . Hasil penetapan kadar fenol total diperoleh persamaan regresi linier dari asam galat $y = 0,0067x + 0,0394$ dengan $R^2 = 0,9996$. Pada ekstrak heksan diperoleh data sebesar 19,756 mg GAE/g. Sementara ekstrak etil asetat nilai kadar fenol total adalah 65,254 mg GAE/g dan ekstrak etanol 210,229 mg GAE/g. Hasil penetapan kadar fenol total terdapat pada Tabel 1.

Penetapan kadar flavonoid total ditentukan dengan

metode Farasat et al (2014) dengan kuersetin sebagai standar [11]. Flavonoid yang mempunyai gugus hidroksi membentuk kompleks dengan logam aluminium. Kompleks ini menghasilkan pergeseran kearah panjang gelombang yang lebih panjang (batokromik). Penambahan natrium asetat untuk menstabilkan struktur tetap pada daerah visible [19]. Kuersetin sebagai pembanding karena memiliki gugus OH yang dapat bereaksi dengan Al^{3+} dan natrium asetat (Gambar 2). Hasil penelitian diperoleh kadar flavonoid total pada ekstrak heksan 46,409 mg QE/g, ekstrak etil asetat 63,138 mg QE/g dan ekstrak etanol 39,742 mg QE/g (Tabel 2).

Penetapan antioksidan dengan metode FRAP, aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan kesetaraan terhadap *Ferric Iron Equivalent Antioxidant Activity* (FeEAC). Standar yang dipakai adalah Ammonium Ferro Sulfat dan diperoleh kurva kalibrasi AFS dengan persamaan $y = 0,0015x + 0,0710$ dengan $R^2 = 0,9999$. Ekstrak yang memberikan aktivitas antioksidant yang paling aktif

**Gambar 2.** Ilustrasi kompleks kuersetin-aluminium dan ionisasi natrium asetat terhadap struktur, modifikasi dari Nikolovska-Coleska [23,24]

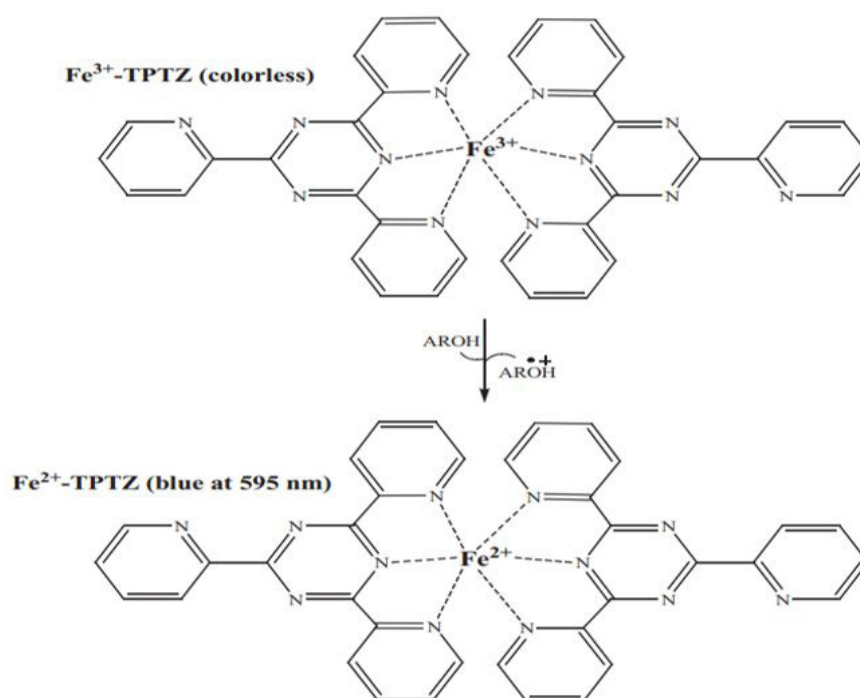
Tabel 4. Uji toksisitas dan persen viabilitas ekstrak etil asetat ranting *Tetracera indica*

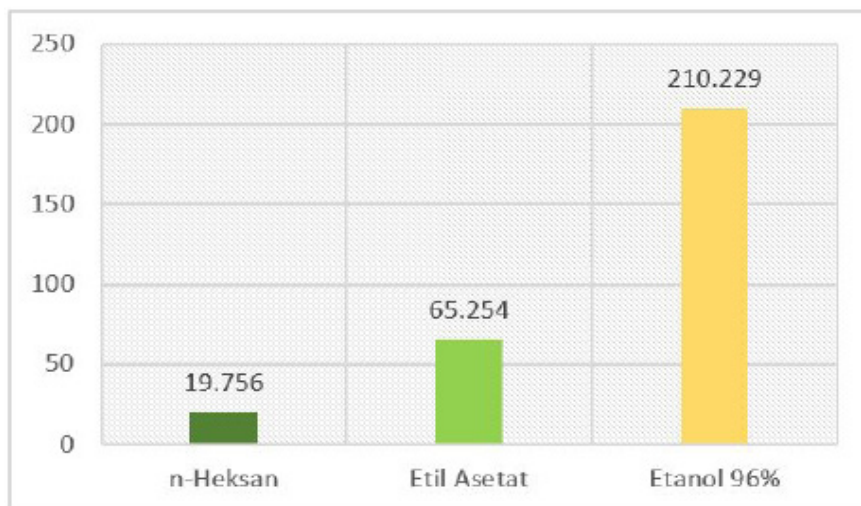
Konsentrasi($\mu\text{g/mL}$)	Log Konsentrasi	% Penghambatan Proliferasi (PP)			% PP rata-rata	SD	% viabilitas sel
		1	2	3			
15,625	1,194	42,105	40,822	39,153	40,693	1,480	59,307
31,25	1,495	52,846	57,381	54,771	54,999	2,276	45,001
62,5	1,796	69,919	67,950	70,004	69,291	1,162	30,709
125	2,097	85,623	84,510	83,911	84,681	0,869	15,319
250	2,398	91,228	90,287	93,239	91,585	1,508	8,415
1000	3000	95,892	94,908	95,208	95,336	0,504	4,664

adalah ekstrak etanol dengan nilai FeEAC 2227,926 mol/g, diikuti oleh ekstrak etil asetat (937,684 mol/g), ekstrak *n*-heksan (228,322 mol/g) dan kontrol positif kuersetin dengan nilai FeEAC 13600 mol/g (Tabel 3). Metode FRAP didasarkan pada kemampuan antioksidan untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan adanya 2,4,6-tri (2-piridil)-triazin (TPTZ) membentuk biru intensif dari kompleks Fe^{2+} - TPTZ yang diukur pada panjang gelombang 593 nm (Gambar 3) [22]. Aktivitas antioksidan tidak hanya dipengaruhi oleh struktur kimia tetapi juga kadar senyawa, pelarut, pH dan waktu inkubasi. Gambar 6 memperlihatkan aktivitas antioksidan untuk ekstrak yang dibandingkan dengan kontrol positif kuersetin. Hasil ini sejalan dengan kandungan fenol dan flavonoid yang tinggi

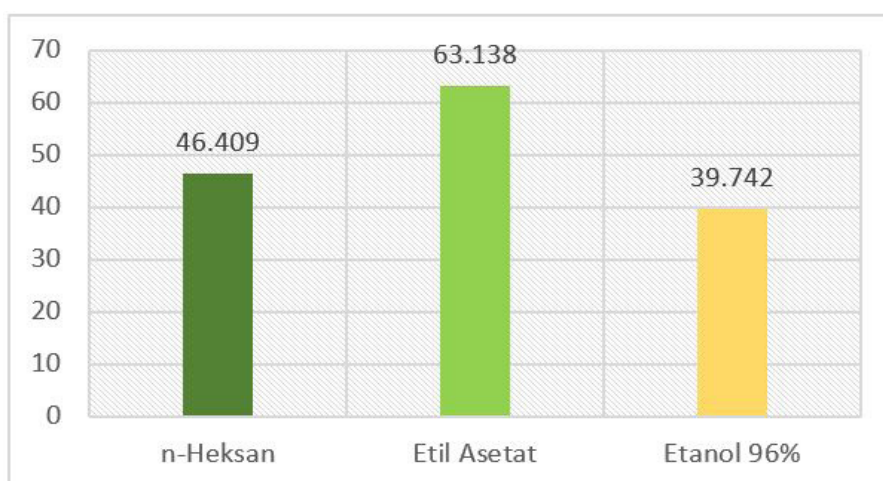
pada ekstrak etil asetat dan etanol 96% (Gambar 4 dan 5).

Untuk mengukur efek toksik suatu bahan alam diperlukan toksisitas untuk mengetahui tingkat keamanannya. Pada penelitian ini uji toksisitas dilakukan dengan metode Methyl Tiazolydiphenyl Tetrabromide (MTT) mrnggunakan sel makrofag RAW 264,7. Uji ini digunakan untuk mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria sel [20]. Sel yang hidup dengan metabolisme aktif akan mengkonversi MTT menjadi senyawa formazan berwarna ungu, sedangkan sel mati tidak dapat mengkonversi MTT. Intensitas warna ungu yang terbentuk meningkat seiring jumlah sel yang hidup yang lebih banyak [25]. Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan penambahan DMSO. Uji

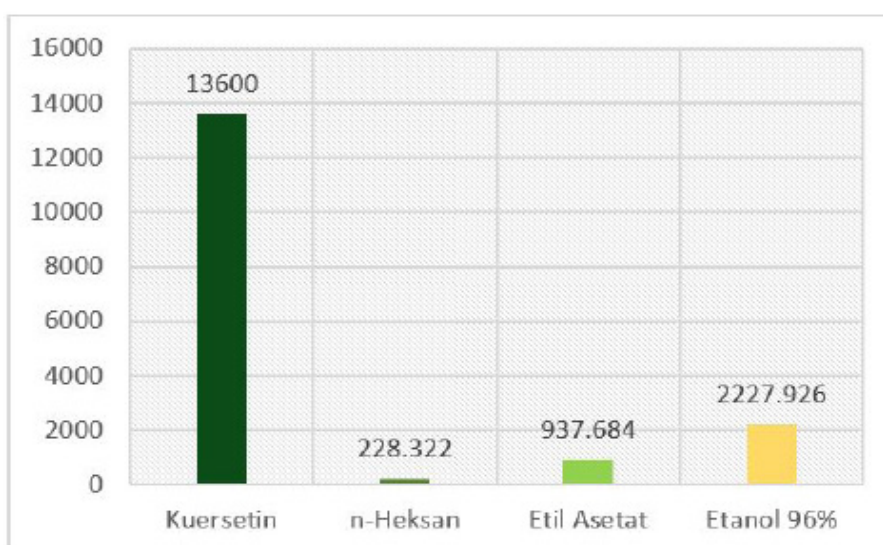
**Gambar 3.** Mekanisme pembentukan warna pada FRAP [22]



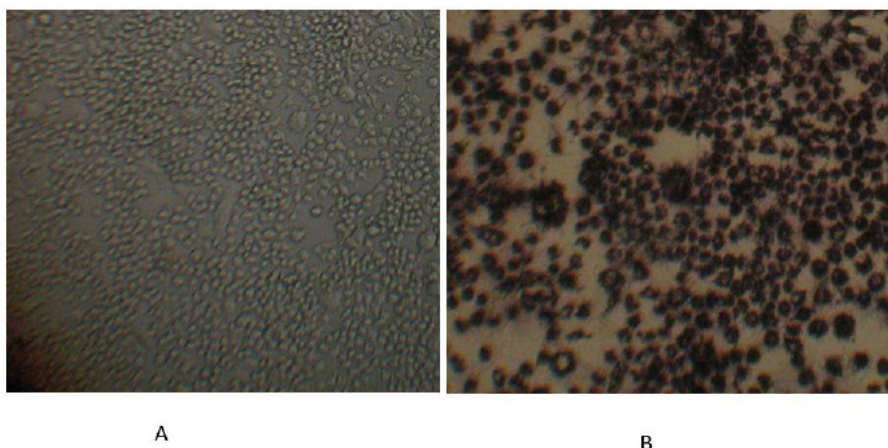
Gambar 4. Diagram batang penetapan kadar fenol total



Gambar 5. Diagram batang penetapan kadar flavonoid total



Gambar 6. Hasil diagram batang aktivitas antioksidan dengan metode frap



Gambar 7. Penampakan sel RAW 264,7 sebelum pemberian MTT (A) dan sesudah pemberian MTT (B)

toksistas dengan metode *MTT assay* dari ekstrak etil asetat diperoleh data IC_{50} adalah 23.877 $\mu\text{g/mL}$ dengan viabilitas terlihat pada [tabel 4](#). Ini menunjukkan ekstrak etil asetat *T. indica* tidak biokompatibel karena persentase sel hidup berada dibawah letal konsentrasi yaitu 50% dan berpotensi sebagai antikanker. Pengamatan mikroskopis sel RAW 264.7 sebelum uji MTT dan sesudah uji MTT terdapat pada [Gambar 7](#).

Kesimpulan

Ekstrak etanol dan etil asetat ranting *Tetracera indica* sangat potensial memberikan efek antioksidan. Hal ini sejalan dengan tingginya kandungan fenol dan flavonoid pada kedua ekstrak yang bertanggung jawab dalam memberikan efek farmakologi. Ekstrak etil asetat ranting *Tetracera indica* juga menghambat proliferasi sel dengan IC_{50} 23.877 $\mu\text{g/mL}$.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih tak terhingga kepada Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof.DR.HAMKA dan Fakultas Farmasi & Sains UHAMKA yang sudah memberikan kesempatan, memfasilitasi laboratorium penelitian ini hingga selesai. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada LAPTIAB BPPT Serpong yang telah memfasilitasi uji lab kultur.

Referensi

[1]. Roskiana Ahmad A, Afrianty Daniya Ratulangi S, Malik A. Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.SM). Vol. 2. 2015.

- [2]. Adesanwo J, Ekundayo O, Oluwole F, Olajide O, van den Berge A, Findlay J. The Effect Of *Tetracera potatoria* And Its Constituent Betulinic Acid On Gastric Acid Secretion And Experimentally- Induced Gastric Ulceration. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*. 2005 Apr 14;18(1).
- [3]. Hasan MdM, Ahmed QU, Soad SZM, Latip J, Taher M, Syafiq TMF, et al. Flavonoids from *Tetracera indica* Merr. induce adipogenesis and exert glucose uptake activities in 3T3-L1 adipocyte cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017 Dec 30;17(1):431.
- [4]. Alhassan AM, Ahmed QU, Latip J, Shah SAA. A new sulphated flavone and other phytoconstituents from the leaves of *Tetracera indica* Merr. and their alpha-glucosidase inhibitory activity. *Natural Product Research*. 2019 Jan 2;33(1):1–8.
- [5]. Abdullah F, Ismail NH, Jamaludin F, Hashim SNAM. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of *Tetracera Indica*. *The Open Conference Proceedings Journal*. 2014 Jan 24;4(1):93–4.
- [6]. Muharni M, Elfita E, Julunar J, Yohandini H, Oktaviani M. β - Sitosterol and Betulonic Acid from n-Hexane Extract the Stem Bark of *Tetracera indica*. *Molekul*. 2019 Nov 30;14(2):103.
- [7]. Lima CC, Lemos RPL, Conserva LM. Dilleniaceae family: an overview of its ethnomedicinal uses, biological and phytochemical profile. ~ 181 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014;3(2):181–204.
- [8]. Bello B, Dogarai S. PHYTOCHEMICAL AND ANTIDIABETIC ACTIVITY INVESTIGATIONS OF TETRACERA INDICA MERR. 2011.
- [9]. Surya Utami T, Arbianti R, Hermansyah H, Reza A, Kunci K, antioksidan A. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpung (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA. *Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia-SNTKI*. 2009.
- [10]. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Virseda 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015 Jan;95(1):204–9.
- [11]. Farasat M, Khavari-Nejad RA, Mohammad S, Nabavi B, Namjooyan F. Antioxidant Activity, Total Phenolics and Flavonoid Contents of some Edible Green Seaweeds from Northern Coasts of the Persian Gulf [Internet]. Vol. 13, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2014. Available from: www.iranhydrography.org
- [12]. Prastiwi R, Elya B, Hanafi M, Desmiaty Y, Sauriasari R. The Antioxidant Activity of *Sterculia stipulata* Korth Woods and Leaves by FRAP Method. *Pharmacognosy Journal*. 2020 Mar 11;12(2):236–9.

- [13]. Pereira, A. C. H., Lenz, D., Nogueira, B. V., Scherer, R., Andrade, T. U., Costa, H. B. da, Romão, W., Pereira, T. M. C., & Endringer, D. C. (2017). Gastroprotective activity of the resin from *Virola oleifera*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 472–480. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1251467>
- [14]. Zheng L, Wang M, Peng Y, Li X. Physicochemical Characterization of Polysaccharides with Macrophage Immunomodulatory Activities Isolated from Red Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *Journal of Chemistry*. 2017;2017:1–8.
- [15]. Muniandy K, Gothai S, Badran KMH, Suresh Kumar S, Esa NM, Arulselvan P. Suppression of Proinflammatory Cytokines and Mediators in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages by Stem Extract of *Alternanthera sessilis* via the Inhibition of the NF- κ B Pathway. *Journal of Immunology Research*. 2018 Aug 1;2018:1–12.
- [16]. Wu J, Liu K, Shi X. The anti-inflammatory activity of several flavonoids isolated from *Murraya paniculata* on murine macrophage cell line and gastric epithelial cell (GES-1). *Pharmaceutical Biology*. 2016 May 3;54(5):868–81.
- [17]. Soonthornsit N, Pitaksutheepong C, Hemstapat W, Utaincharoen P, Pitaksutheepong T. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of *Morus alba* L. Stem Extract in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2017;2017:1–8.
- [18]. Chen, L.Y., Cheng, C.W. & Liang, J.Y., Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.*, 2015; 170:10-15
- [19]. Cornard, J.P. & Merlin, J.C., Complexes of aluminium (III) with isoquercitrin: spectroscopic characterization and quantum chemical calculations. *Polyhedron*, 2002; 21:2801-2810
- [20]. Freshney, R. *Animal cell culture, A practical approach*, 6th edition, IRL, Press: Washington DC, 2011; pp113-114
- [21]. Thamkaew, G., Sjöholm, I., & Galindo, F. G. (2020). A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–24. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1765309>
- [22]. Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>
- [23]. Nikolovska-Česk, Ž., Dvski, K., Kisv, L. & Štukvišvić, L., Identification of phenolic constituents isolated from Macedonian propolis. *Bull. Chem. Technol. Maced.*, 14(1): 13–17 (1995)
- [24]. Sjahid, LR., Aqshari A., Sediarsa., Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Hasil Ultrasonic Assisted Extraction Daun Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten] Steenis). *Jurnal Riset Kimia*, 16- 23. <https://doi.org/10.25077/jrk.v11i1.348>
- [25]. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ. *Cell Viability Assays*. 2016;1–31.



Copyright © 2022 The author(s). You are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) under the following terms: Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)