

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVANOID PADA EKSTRAK DAUN SELEDRI (*Apium graveolens L.*) DENGAN METODE REFLUKS

Kusnadi[✉], Egie Triana Devi[✉]

Program Studi Farmasi
Politeknik Harapan Bersama Tegal, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Maret 2017
Disetujui April 2017
Dipublikasikan April 2017

Kata kunci:
Daun Seledri, Flavonoid,
Refluks, KLT,
Spektrofotometri UV-Vis.

Keywords:
Celery, Flavonoid, Reflux,
TLC,
Spectrophotometry UV-Vis.

Abstrak

Kandungan daun seledri memiliki manfaat antara lain menurunkan tekanan darah (hipertensi), memperlancar pengeluaran urin, dan rheumatik. Salah satu kandungan daun seledri yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar jumlahnya. Tumbuhan yang mengandung flavonoid dapat digunakan untuk antioksidan, anti hipertensi, dan anti inflamasi. Pada penelitian ini untuk mendapatkan ekstrak digunakan metode refluks dengan etanol 96% sebagai pelarut. Pada uji identifikasi yang digunakan meliputi uji pewarnaan dengan NaOH dan H₂SO₄, uji KLT, dan uji Spektrofotometri UV-Vis dengan kuersetin sebagai larutan bakunya. Hasil penelitian menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*). Hasil refluks ditandai adanya perubahan warna menjadi kuning ketika ditetesi NaOH 10 % dan perubahan warna menjadi merah bata ketika ditetesi H₂SO₄ (pekat). Nilai rata-rata R_f sampel yang didapat 0,84 cm nilai ini mendekati nilai R_f standar yaitu 0,88 cm. Kadar rata-rata flavonoid yang diperoleh dari ekstrak sampel 5 µl sebesar 16mg/100 g sampel, pada sampel 10 µl diperoleh kadar rata-rata sebesar 20,79 mg/100 g sampel, dan pada sampel 20µl diperoleh kadar rata-rata sebesar 22,47mg/100 g sampel, serta pada sampel 25µl diperoleh kadar rata-rata sebesar 24,71mg/100 g sampel.

Abstract

The celery has many benefits they are lowering blood pressure (hypertension), expediting expenditure of urine, and rheumatic. One of celery contentis flavonoid. Flavonoidis one largest number of natural phenols. Plants that are containing flavonoid can be used as antioxidant, antihypertensive, anti-inflammatory. In this study, the method used to obtain the extract reflux with 96% ethanol as a solvent. In the identification test used include staining test with NaOH and H₂SO₄, the TLC test, and test the spectrophotometry UV-Vis with kuersetin as the default solution. The results show flavonoid compounds in celery (*Apium graveolens L.*). Reflux results marked by changing color into yellow when dropped by NaOH 10% and the color changes to red brick when dropped by H₂SO₄ (concentrated). The average value of R_f samples obtained is 0.84 cm, this value approaches the standard of R_f that is 0.88 cm. Average levels of flavonoid obtained from the sample extract 5 µl of 16.38mg/100 g samples, on a sample of 10 µl obtained an average grade of 20.79mg/100 g samples, and on samples of 20µl obtained an average grade of 22.47 mg/100 g samples, as well as on samples of 25µl obtained an average grade of 24.71 mg/100 g samples.

© 2017 Universitas Pancasakti Tegal

[✉]Alamat korespondensi:

D3 Farmasi Politeknik Harapan Bersama
Jl. Mataram No 9 Kota Tegal 52142, Indonesia
Telp. (0283) 352000
E-mail: kusnadi.adi87@gmail.com

ISSN 2528-6714

PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan keragaman hayati yang selalu ada di sekitar kita, baik itu yang tumbuh secara liar maupun yang sengaja dibudidayakan. Sejak zaman dahulu, tumbuhan sudah digunakan sebagai tanaman obat, walaupun penggunaannya disebarkan secara turun-temurun maupun dari mulut ke mulut (Yuniarti, 2008 : 3). Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki keanekaragaman obat di dunia. Jumlah tumbuhan obat tersebut sekitar 90% dari jumlah tumbuhan obat yang terdapat di kawasan Asia (Masyud,2010).

Para peneliti banyak melakukan penelitian pada tanaman-tanaman obat sebagai alternatif bahan kimia yang sudah ada. Tanaman yang dapat digunakan sebagai obat salah satunya adalah seledri. Di Indonesia, umumnya daun seledri dimanfaatkan sebagai pelengkap sayuran. Seledri merupakan salah satu tanaman yang telah lama diketahui masyarakat umum memiliki banyak khasiat untuk kesehatan.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa hampir semua bagian tanaman seledri mengandung zat kimia dan nutrisi yang dapat berguna bagi kesehatan. Tanaman Seledri merupakan tumbuhan yang memiliki khasiat sebagai bahan obat tradisional yang memiliki efek anti hipertensi, diuretik ringan dan antiseptik pada saluran kemih serta antirematik. Zat kimia yang terkandung dalam seledri diantaranya flavonoid, saponin, tanin, apiin, minyak atsiri, apigenin, kolin, vitamin A, B, C, zat pahit asparagin (Nadinah, 2008).

Senyawa flavonoid merupakan metabolit sekunder terbesar yang dimiliki pada tanaman seledri. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol yang terbesar. Senyawa flavonoid memiliki aktifitas antioksidan, antiinflamasi, antihepatotoksik, antitumor, antimikrobial, antiviral dan pengaruh terhadap sistem syaraf pusat (Sukandar *et.al.*, 2006). Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dan terdapat pada semua bagian tumbuhan terutama pada bagian daunnya (Rahajo, 2013).

Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol,

metanol, etilasetat, atau campuran dari pelarut tersebut dapat digunakan untuk mengekstrak flavonoid dari jaringan tumbuhan (Rijke, 2005). Pengambilan bahan aktif dari suatu tanaman, dapat dilakukan dengan ekstraksi. Dalam proses ekstraksi ini, bahan aktif akan terlarut oleh zat penyari yang sesuai sifat kepolarannya. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat, daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna (Voight, 1994). Metode ekstrak yang digunakan untuk mengisolasi kandungan senyawa flavanoid pada daun seledri dalam penelitian ini yaitu refluks.

Senyawa flavanoid pada daun seledri diekstraksi dengan metode refluks melalui proses pemisahan kandungan senyawa-senyawa aktif dengan cara panas (membutuhkan pemanasan pada prosesnya), ekstraksi dengan pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RI,1995). Ekstrak daun seledri hasil isolasi kemudian dianalisis secara kualitatif dengan metode kromatografi. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Metode kromatografi yang digunakan dalam analisis senyawa flavanoid yaitu dengan kromatografi lapis tipis.

Metode kromatografi lapis tipis dalam proses pemilihan sistem pelarut yang dipakai didasarkan atas prinsip *like dissolves like*, tetapi akan lebih cepat dengan mengambil pengalaman para peneliti yang sudah ada. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dikemukakan oleh Taher (2011) mengenai isolasi dan identifikasi senyawa flavanoid dari kulit batang langsung (*syzygium cumini*) yang menggunakan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui adanya senyawa flavanoid yang ditunjukkan dengan nilai perbandingan Rf pada sampel dan standar. Analisis kadar senyawa flavanoid secara kuantitatif dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk uji kuantitatif dengan cara interaksi

antara radiasi elektromagnetik (REM) yang dipancarkan dengan sampel yang selanjutnya akan diukur absorbansi dari sampel oleh detector untuk mengetahui kadar flavanoid dalam sampel (Gandjar dan Rohman, 2013). Metode ini dapat memberikan presisi kuantitatif yang baik serta mudah dilakukan karena peralatannya sudah terinstrumentasi (Watson, 2005).

Dari penjelasan di atas maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian terhadap kandungan flavanoid pada daun seledri dengan judul "Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavanoid pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) dengan Metode Refluks. Harapannya dengan penelitian ini dapat memberikan informasi tentang analisis kandungan flavanoid pada daun seledri. Rumusan masalah yang akan dijadikan fokus dalam penelitian ini adalah (1)Apakah ada senyawa flavonoid pada daun seledri (*Apium graveolens* L.)? (2) Berapa kadar flavonoid pada daun seledri (*Apium graveolens* L.)?

METODE

Penelitian ini termasuk jenis penelitian observasional. Variabel yang digunakan adalah variabel tunggal, yaitu senyawa flavonoid pada daun seledri (*Apium graveolens* L.) dengan metode refluks.

Alat Penelitian. Neraca analitik, pisau, kain flanel, blender, *beakerglass*, gelas ukur, labu alas bulat, kondensor, corong pisah, ayakan 20 mesh, klem, statif, selang, cawan uap, waterbath, pipa kapiler, lampu sinar UV, tampah, penggaris, pensil, kaki tiga, lampu spirtus, kasa asbes, chamber, plat KLT, Spektrofotometer UV-Vis.

Bahan Penelitian. Serbuk daun seledri, metanol, fase gerak: n-butanol, asam asetat, air, pelarut difraksinasi: n-heksana, NaOH 10%, H₂SO₄ (pekat), AlCl₃ 10%, NaNO₂ 5%, larutan standar kuersetin dan aquades.

Penyiapan Simplisia. Daun seledri yang masih segar dibersihkan dari kotorannya, lalu menimbang daun seledri yang masih segar untuk mengetahui berat basah sampel. Selanjutnya daun seledri dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Pengeringan daun seledri sampai bobot konstan yaitu dinyatakan

kering jika berat mencapai konstan dengan syarat menimbang 2 kali penimbangan secara berturut-turut (Depkes RI, 2008).

Karakteristik Simplisia. Dilakukan uji pemeriksaan karakteristik simplisia melalui uji organoleptis yang meliputi warna, aroma, rasa, dan tekstur daun, serta kadar air dari simplisia.

Pembuatan Ekstrak Daun Seledri dengan Metode Refluks. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan alat refluks dengan mencampurkan 100 gram simplisia kering daun seledri dengan 300 ml metanol dengan perbandingan simplisia : metanol (1:3). Kemudian diisolasi dengan metode refluks dengan suhu 63-65⁰ C selama 2 jam. Setelah itu disaring dalam keadaan panas menggunakan kain flanel untuk mendapatkan filtrat senyawa flavonoid dalam jumlah maksimal dan diuapkan dengan menggunakan kompor spirtus pada api kecil untuk menghilangkan pelarutnya yang kemudian menghasilkan ekstrak pekat (Alhabsyi, dkk., 2014 : 109).

Uji Bebas Metanol. Ekstrak yang diperoleh dari refluks terlebih dahulu dilakukan uji bebas pelarut (metanol), hal ini dilakukan untuk menyakinkan bahwa ekstrak tersebut telah bebas dari metanol. Satu tetes ekstrak ditambahkan 1 tetes larutan asam sulfat pekat. Kemudian tambahkan 1 tetes larutan KMnO₄ pekat diamkan 10 menit. Tambahkan tetes demi tetes larutan Na₂S₂O₃ pekat sampai warna permanganat (coklat) hilang.

Isolasi Senyawa Flavonoid. Ekstrak yang telah bebas dari pelarut (ekstrak pekat) dilakukan isolasi flavonoid dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana sebanyak 30 ml kemudian digojog. Penambahan n-heksana bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa non polar pada ekstrak. Penambahan n-heksana menyebabkan terbentuknya 2 fase yaitu fase polar dan fase non polar yang memiliki berat jenis dan kepolaran yang berbeda. Berat jenis fase non polar lebih kecil dari pada fase polar, sehingga lapisan non polar berada pada bagian atas dan lapisan polar berada dibagian bawah. Lapisan polar pada bagian bawah diambil dan ditampung dalam cawan uap (yang sebelumnya sudah ditimbang), lalu cawan

porcelain diuapkan diatas waterbath hingga mendapatkan ekstrak kental.

Perhitungan Rendemen

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{BeratEkstrakKental (Y)}}{\text{BeratSampel (X)}} \times 100 \%$$

Keterangan : Y = Berat ekstrak kental
X = Berat sampel

Identifikasi Senyawa Flavonoid

1. Identifikasi Test dengan NaOH 10%

Test dengan NaOH 10 % dengan cara memasukkan dua tetes sampel dalam spots, ditambahkan dengan 2-4 tetes larutan NaOH 10% (Asih, 2009), perubahan warna diamati hingga menjadi warna kuning sampai kuning kecoklatan. Hal ini dikarenakan flavonoid termasuk senyawa fenol sehingga apabila direaksikan dengan basa akan terbentuk warna yang disebabkan terjadinya sistem konjugasi dari gugus aromatik (Desandi, 2014).

2. Uji Warna Test dengan H₂SO₄(pekat)

Test dengan H₂SO₄(pekat) dengan cara masukkan 4 tetes sampel dalam tabung reaksi tambahkan 2-4 tetes larutan H₂SO₄(pekat) (Asih, 2009). Perubahan warna yang terjadi diamati menjadi merah bata sampai coklat kehitaman hal ini disebabkan karena flavonoid apabila direaksikan dengan asam akan terbentuk warna yang disebabkan terjadinya sistem konjugasi dari gugus khalkon.

Uji Kromatografi Lapis Tipis

Menyiapkan alat dan bahan, plat KLT lapis silika gel yang akan digunakan dioven terlebih dahulu selama 3 menit pada suhu 45° C untuk mengurangi kadar air dalam plat KLT. Selanjutnya plat KLT yang sudah dioven diberi garis batas atas dan batas bawah masing-masing 1cm untuk mempermudah penotolan dan mengetahui jarak pelarut yang ditempuh sehingga mempermudah dalam perhitungan Rf. Kemudian membuat fase gerak dengan mengambil n- butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5), dimasukkan kedalam chamber dan dijenuhkan. Penjenuhan bertujuan agar seluruh permukaan di dalam bejana terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan oleh silika baik dan beraturan. Untuk mengetahui chamber yang berisi fase gerak telah jenuh maka di dalam chamber diberi kertas saring, ketika sudah jenuh

eluen akan keluar melalui kertas saring pada proses elusi, silika gel akan mengabsorpsi fase gerak. Proses selanjutnya masukkan plat KLT yang sebelumnya sudah ditotolkan sampel kedalam chamber yang sudah jenuh. Pada proses ini BAA akan bergerak naik melewati butiran silika gel, dan pergerakan BAA akan diikuti oleh senyawa yang diidentifikasi. Setelah proses elusi, lempeng silika gel selesai ditandai dengan naiknya eluen sampai garis batas atas. Angkat plat KLT dan keringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian diliat penampakan noda pada sinar UV 366 nm sebagai panjang gelombang teoritis. Eluen yang baik ialah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya noda. Syarat noda yang baik adalah bentuk noda tidak berekor dan jarak antar noda satu dengan yang lainnya jelas. Noda yang dihasilkan berwarna kuning atau hijau lembayung yang menandakan bahwa adanya senyawa flavonoid. Proses selanjutnya menganalisa Rf dan hRf (Harborne, 1996: 88).

UJI Spektrofotometri UV-Vis

1. Pembuatan Larutan Blanko

Mengambil 10 ml metanol masukkan dalam tabung reaksi dan memasukkan 3 ml metanol kedalam kuvet kemudian masukkan kuvet kedalam Spektrofotometri UV- Vis. Pembuatan larutan blanko bertujuan untuk kalibrasi pada alat sehingga konsentrasi dimulai dari titik nol (Rohyami, 2008)

2. Pembuatan Larutan Induk Baku Kuersetin.

Ditimbang sebanyak 50 mg Kuersetin baku, dimasukkan ke dalam labu ukuran 50 mL dengan ditambahkan pelarut metanol sampai garis tanda batas. Kadar kuersetin yang diperoleh menjadi 1 mg/ml atau konsentrasi 1000 µl/ml.

3. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Memipet larutan induk kuarsetin sejumlah volume tertentu pada kuvet kemudian periksa pada panjang gelombang 300-400 nm, kemudian mencatat absorbansi yang dihasilkan oleh masing-masing panjang gelombang dan membuat kurva hubungan antara panjang gelombang dan absorbansi (Hanani, 2016).

4. Pengukuran Absorbansi Pada Larutan Seri Baku Kuersetin

Mengambil larutan baku 1000 µl, kemudian dibuat masing-masing konsentrasi sebanyak 0,

10, 20, 30, 40, 50 μ l, kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimal yang didapat dan membuat kurva linier absorbansi pada masing-masing konsentrasi.

5. Penetapan Kadar Senyawa Flavonoid

Ekstrak sampel dipipet sebanyak 5, 10, 20, dan 25 μ l kedalam tabung reaksi. Pada masing-masing tabung tambahkan 2 ml aquades kemudian tambahkan 150 μ L NaNO₂ 5%. Setelah itu tambahkan 150 μ L AlCl₃10% dan 2 ml NaOH 1 M dan tambahkan aquades hingga volume menjadi 5 ml (Hayati, *et.al.*, 2010). Larutan dikocok hingga homogen, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang didapat dengan melakukan tiga kali replikasi untuk menghitung masing-masing konsentrasi flavonoid pada sampel (Agung:2016).

Analisis Data

Hasil pengukuran absorbansi flavonoid pada ekstrak daun seledri secara Spektrofotometri UV-Vis, analisis data menggunakan regresi linier.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidak kandungan senyawa flavonoid serta berapa kadar flavonoid pada ekstrak daun seledri dengan metode refluks dan spektrofotometri UV-Vis. Daun seledri yang digunakan diperoleh dari pasar wisata Guci

Kabupaten Tegal. Hasil uji organoleptis dapat dipastikan bahwa sampel yang digunakan adalah daun seledri yang dinyatakan dengan warna kulit hijau, aroma khas seledri, rasa asin sedikit pedas, dan tekstur halus/lembut.

Proses pembuatan simplisia daun seledri dimulai dari proses pencucian, dengan tujuan untuk memisahkan dari kotoran – kotoran yang menempel. Pemisahan daun dari batang daun seledri. Pilih daun seledri yang masih segar apabila daun seledri ada yang layu akan berakibat rusak kandungan kimia karena oksidasi maupun reduksi. Apabila daun yang layu atau busuk akan mempercemari daun seledri dalam proses pengeringan. Proses pengeringan dilakukan dengan cara alamiah melalui angin-anginkan dan ditutup kain hitam selama 5 hari dengan kadar airnya mencapai <10 %. Pengeringan merupakan proses pengawetan simplisia sehingga simplisia tahan lama dalam penyimpanan. Proses pengeringan juga akan menghindari terurainya kandungan kimia karena pengaruh enzim. Bahan harus dikeringkan dengan cukup untuk menghindari pertumbuhan mikroorganisme dan kapang (jamur). Fungsi penggunaan kain hitam pada proses pengeringan adalah untuk menghindari terurainya kandungan kimia daun seledri dan polusi dari debu. Dari proses pengeringan diperoleh bobot konstan untuk mengetahui prosentase bobot kering terhadap bobot basah yang tertera pada tabel 1 di bawah ini:

Tabel 1.
Data Berat Awal Sampel dan Berat Setelah Proses Pengeringan

Sampel Replikasi	Berat awal sampel (g)	Berat simplisia kering (g)	Susut pengeringan (%)
1	600	48,3	8,05
2	600	49,8	8,30
3	600	50,7	8,45
Rata-rata		49,6	8,26

Susut pengeringan memberikan batasan besarnya senyawa yang hilang pada saat pengeringan. Hasil pengeringan yang diperoleh bahwa nilai susut pengeringan untuk simplisia daun seledri sebesar 8,26 %. Pengujian kadar air tidak dilakukan karena hasil susut pengeringan <10 %. Jika kadar air dalam bahan masih tinggi

dapat mendorong enzim melakukan aktifitasnya mengubah kandungan kimia yang ada dalam bahan menjadi produk lain yang mungkin tidak lagi memiliki efek farmakologi seperti senyawa aslinya. Hal ini sesuai dengan Peraturan BPOM RI No. 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional mengenai kadar air

untuk simplisia yang dipergunakan sebagai obat adalah <10 %.

Pada penelitian ini, digunakan daun seledri yang sudah kering sebanyak 100 g kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender yang bertujuan untuk memperluas proses ekstraksi dengan metode refluks. Daun seledri yang sudah halus kemudian diayak menggunakan pengayak agar hasil yang diperoleh lebih seragam. Daun seledri diekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut yang tepat yaitu metanol untuk memperoleh senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid termasuk senyawa polar sehingga harus dilarutkan dengan pelarut yang bersifat polar yaitu metanol yang mempunyai daya polaritas yang cukup tinggi sehingga dapat memperoleh hasil ekstrak senyawa flavonoid lebih banyak. Bantuan energi berupa panas pada proses refluks akan membantu pemecahan dinding sel sehingga senyawa flavonoid pada sampel dapat terekstraksi secara maksimal. Suhu konstan pada saat proses ekstrak refluks digunakan suhu antara 63-65°C. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan penangas air untuk menjaga agar tidak terjadi kelebihan temperatur selama pemanasan. Hasil refluks kemudian disaring menggunakan kain flanel sehingga didapat ekstrak cair. Hasil ekstrak cair lalu diuapkan menggunakan pemanasan lampu spiritus dengan api kecil.

Ekstrak daun seledri hasil refluks terlebih dahulu dilakukan uji bebas metanol untuk lebih menyakinkan bahwa ekstrak tersebut telah bebas dari pelarut metanol. Ekstrak yang telah bebas dari metanol kemudian proses isolasi

menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksana dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Penambahan n-heksana pada ekstrak menyebabkan terbentuknya 2 fase, lapisan yang berada dibagian atas senyawa non polar (fase n-heksana) dan lapisan yang berada dibagian bawah fase polar (fase flavonoid). Hal ini disebabkan air memiliki masa jenis yang lebih besar dibandingkan dengan heksana, penambahan n-heksana bertujuan untuk memisahkan komponen dari fase air. Lapisan yang diambil untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid adalah lapisan bawah (fase flavonoid). Kemudian filtrat yang didapat diuapkan menggunakan waterbath dengan tujuan agar fraksi ekstrak yang terdapat pada sampel menguap untuk mendapatkan ekstrak kental. Rendemen yang dihasilkan pada proses isolasi masing-masing pada replikasi 1 sebesar 5,5 g, replikasi 2 sebesar 5,7 g dan pada replikasi 3 sebesar 5,65 g, sehingga mempunyai rata-rata rendemen yang diperoleh sebanyak 5,65 g dengan presentase 5,65 %.

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan tiga metode yaitu reaksi warna, KLT dan Spektrofotometri UV-Vis. Identifikasi pertama yang dilakukan adalah reaksi warna. Uji ini digunakan untuk membuktikan terjadinya reaksi kimia dengan mengamati ciri-ciri yang terjadi seperti adanya gas, endapan, perubahan suhu dan perubahan warna. Dalam uji reaksi warna yang dilakukan reaksi yang teramati adalah perubahan warna. Berikut hasil pengamatan identifikasi reaksi warna flavonoid pada ekstrak.

Tabel 2.
Hasil Identifikasi Flavonoid dengan reaksi warna

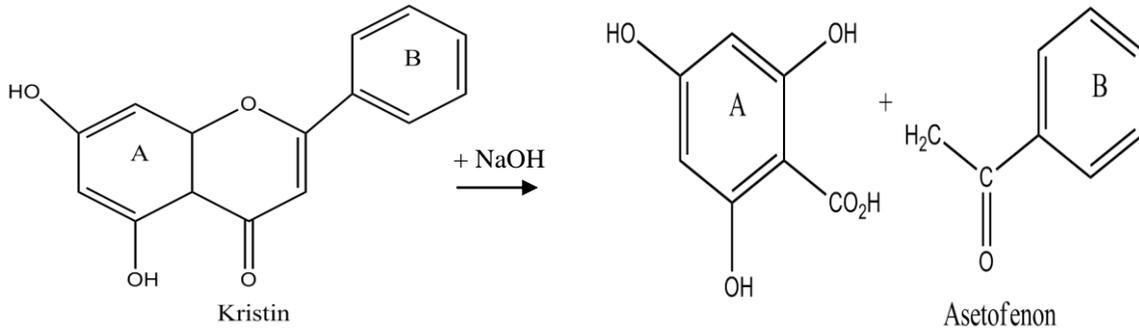
Identifikasi Senyawa Flavonoid	Hasil	Pustaka (Asih,2009)
ekstrak daun seledri +NaOH 10 %	Perubahan warna menjadi kuning(+)	Perubahan warna kuning
ekstrak daun seledri +H ₂ SO ₄ (pekat)	Perubahan warna menjadi warna merah (+)	Perubahan warna coklat kehitaman sampai merah tua

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan ekstrak daun seledri positif mengandung flavonoid, karena terjadi perubahan warna

menjadi kuning setelah ditetesi NaOH 10%. Senyawa kristin yang merupakan turunan dari senyawa flavon pada penambahan NaOH 10%

mengalami penguraian oleh basa menjadi molekul seperti asetofenon yang berwarna kuning karena adanya pemutusan ikatan pada

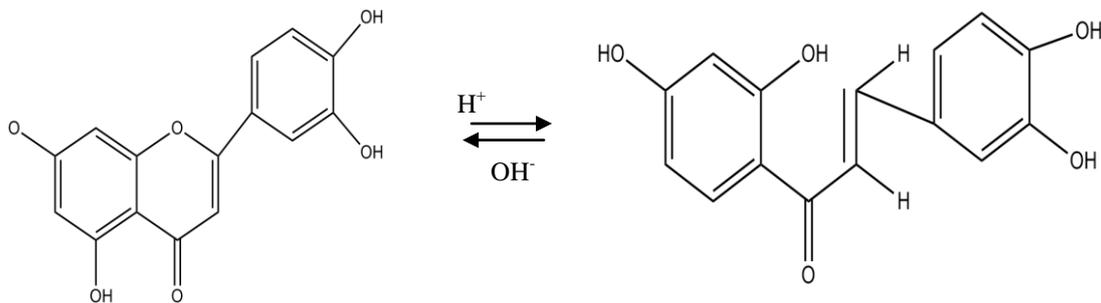
struktur isoprena. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun seledri mengandung senyawa flavonoid.



Gambar 1. Reaksi Flavanoid dengan NaOH

Uji identifikasi yang kedua terjadi perubahan warna yaitu berubah menjadi warna merah tua setelah ditetesi H₂SO_{4(pekat)}. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun seledri mengandung senyawa flavonoid. Hal ini menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara H₂SO_{4(pekat)} dan flavonoid yang

menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks yang menimbulkan warna merah tua sampai coklat kehitaman pada sampel (Asih, 2009). Hasil kualitatif reaksi warna pada rendemen daun seledri diperoleh hasil positif mengandung senyawa flavonoid. Hasil reaksi kimia yang dapat dilihat pada Gambar 2..



Gambar 2. Reaksi Flavanoid dengan H₂SO_{4(pekat)}

Uji reaksi warna diketahui hasilnya positif maka dilanjutkan identifikasi dengan cara Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi ini menggunakan hasil yang diperoleh dari metode refluks. Prinsip KLT yaitu untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan prinsip absorpsi dan partisi, yang ditentukan oleh fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah plat KLT yang berupa silika gel yang bersifat polar, yang terlebih dahulu dioven pada suhu 45 °C selama 3 menit hal ini dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan air yang terdapat pada plat sehingga daya serap plat

menjadi maksimal, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5). Pemilihan eluen yang digunakan merupakan eluen yang mempunyai kepolaran yang tinggi sehingga dapat memisahkan senyawa flavonoid yang bersifat polar. Bejana yang digunakan dahulu dijenuhkan supaya seluruh permukaan bejana terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan baik dan beraturan.

Penjenuhan dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh homogenitas dalam bejana dan meminimalkan penguapan pelarut

darilempeng KLT. Kemudian setelah jenuh dilakukan penotolan sampel pada lapisan penyerap (plat KLT) yang selanjutnya penyerap dimasukkan kedalam bejana yang berisi fase gerak yang sudah jenuh. Pada saat proses pengembangan, plat KLT akan mengabsorpsi fase gerak. Setelah mencapai batas atas plat kemudian plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan deteksi senyawa yang diidentifikasi dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Panjang gelombang 254 nm untuk melihat bercak pada plat KLT. Sedangkan UV pada panjang gelombang 366 nm digunakan untuk melihat warna atau bercak yang tidak terlihat pada panjang gelombang 254 nm oleh mata. Bercak yang tampak ditandai agar mudah untuk dianalisa karena jika sinar UV dimatikan bercak tidak tampak lagi. Berdasarkan hasil identifikasi KLT terlihat bercak pada plat KLT dibawah sinar UV panjang gelombang 366 nm berwarna kekuningan, sehingga diperoleh nilai Rf dan hRf senyawa flavonoid daun seledri yang dapat dilihat pada Tabel 3

Tabel 3.
Hasil Rf dan hRf senyawa flavonoid Pada Ekstrak Daun Seledri

Replikasi	Sampel		Standar	
	Rf (cm)	HRf (cm)	Rf (cm)	HRf (cm)
I	0,87	87	0,88	88
II	0,85	85		
III	0,86	86		
Rata-rata	0,86	86		

Nilai Rf yang dihasilkan dari hasil KLT untuk ekstrak daun seledri adalah sebesar 0,87 cm pada replikasi pertama yang kedua 0,85 cm dan pada replikasi yang ketiga sebesar 0,86 cm. Dari ketiga replikasi semuanya mendekati nilai Rf standar kuersetin yaitu 0,88 cm. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun seledri mengandung senyawa flavonoid. Nilai Rf dipengaruhi oleh kejenuhan bejana, jumlah cuplikan yang digunakan, suhu dan struktur senyawa yang dipisahkan.

Analisis berikutnya yaitu secara kuantitatif dengan tujuan untuk menetapkan kadar flavonoid pada sampel dengan metode

Spektrofotometri UV-Vis menggunakan alat spektrofotometer. Metode Spektrofotometri UV-Vis digunakan karena cukup mudah dalam pengerjaannya, waktu pengerjaan singkat, jumlah sampel yang digunakan sedikit dan data yang dihasilkan lebih valid dengan tingkat ketelitian yang tinggi. Pada tahap spektrofotometri UV-Vis terlebih dahulu menyiapkan larutan blanko. Larutan blanko yang digunakan adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel, yaitu metanol. Larutan blanko bertujuan untuk membuat titik nol konsentrasi dari grafik kalibrasi.

Proses selanjutnya dilakukan penentuan panjang gelombang untuk memperoleh absorbansi maksimal. Alasan penggunaan panjang gelombang maksimal untuk memperoleh kepekaan dan serapan yang maksimal juga. Oleh karena itu, pada serapan yang maksimal pada perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Larutan yang digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometri UV-Vis yaitu larutan standar kuersetin. Hasil pengukuran panjang gelombang larutan standar kuersetin dapat dilihat pada tabel 4 di bawah ini:

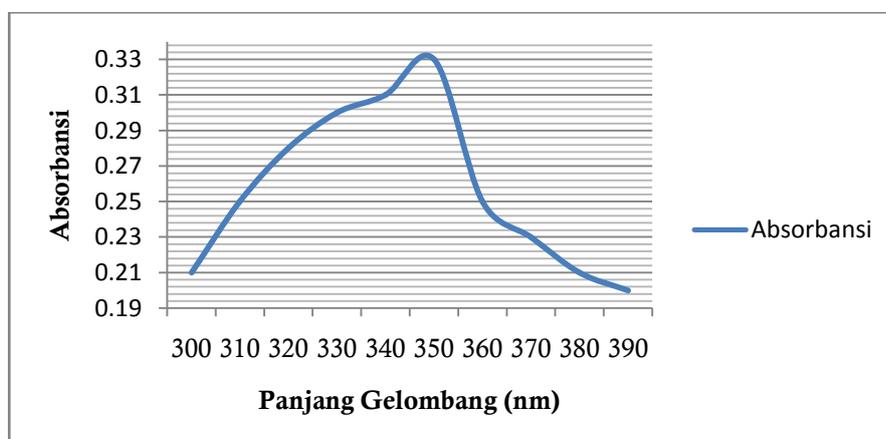
Tabel 4.
Data Absorbansi Larutan Kuersetin

NO	Panjang gelombang (nm)	Absorbansi
1	300	0,21
2	310	0,25
3	320	0,28
4	330	0,3
5	340	0,31
6	350	0,33
7	360	0,25
8	370	0,23
9	380	0,21
10	390	0,2

Hubungan antara absorbansi dan panjang gelombang ditentukan sehingga dapat diketahui panjang gelombang maksimalnya, hasil orientasi diperoleh data panjang gelombang dengan mengukur serapan pada panjang gelombang maksimum (puncak kurva), agar dapat memberikan serapan tertinggi untuk

setiap konsentrasi. Dari data yang diperoleh kemudian dibuat kurva hubungan antara panjang gelombang dengan absorbansinya.

Kurva hubungan antara panjang gelombang dengan absorbansinya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Panjang Gelombang Vs Absorbansi

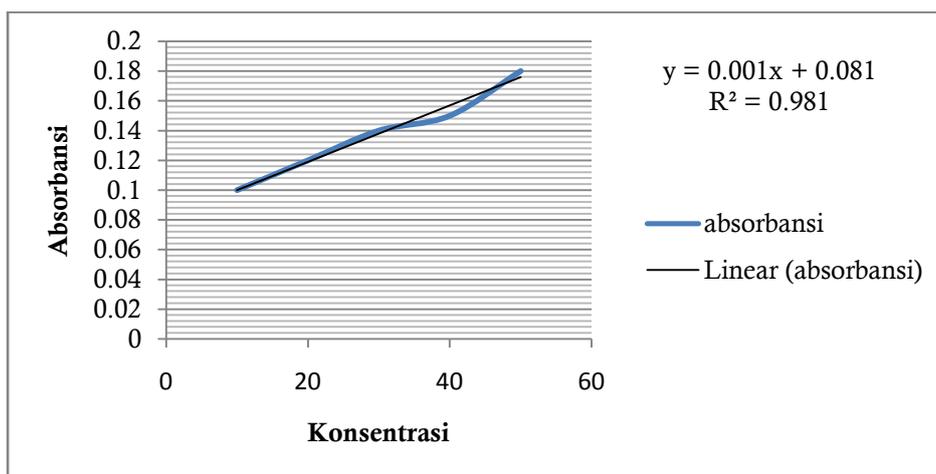
Gambar 3 menunjukkan bahwa absorbansi tertinggi terdapat pada panjang gelombang 350 nm dengan absorbansi 0,33. Hasil orientasi diperoleh data panjang gelombang maksimal pada larutan standar kuersetin adalah 350 nm. Hal ini sesuai dengan penentuan spektrum khas flavonoid golongan flavon dan flavonol mempunyai puncak absorbansi terletak pada daerah panjang gelombang 300-400 nm (Hanani, 2016). Proses selanjutnya setelah diperoleh panjang gelombang maksimal, diukur absorbansi dengan menggunakan larutan seri baku kuersetin dari 5 konsentrasi untuk membuat kurva linier dengan menggunakan panjang gelombang maksimal yang diperoleh. Data absorbansi dari konsentrasi larutan seri baku kuersetin dapat dibuat kurva baku antara konsentrasi larutan kuersetin dan absorbansinya. Kurva baku dibuat dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansinya

sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui. Larutan seribaku kuersetin yang digunakan yaitu 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ l. Konsentrasi 0 adalah konsentrasi blanko (Agung: 2016)

Tabel 5.

<i>Konsentrasi dan Absorbansi dari Kuersetin</i>	
Konsentrasi	Absorbansi
0	0
10	0.1
20	0.12
30	0.14
40	0.15
50	0.18

Selanjutnya hasil pembuatan kurva standar kuersetin yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva Konsentrasi Dengan Absorbansi Kuersetin

Kurva standar yang diperoleh memiliki persamaan garis $y = 0,001x + 0,081$. Persamaan ini digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel dimana (y) menyatakan nilai absorbansi dan (x) menyatakan kadar flavonoid dalam sampel. Dengan nilai koefisien korelasi yang diperoleh $R^2 = 0,981$. Hal ini menunjukkan dari kurva tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi pula absorbansinya.

Persamaan linier $y = 0,001x + 0,081$ yang diperoleh akan digunakan untuk menetapkan kadar flavonoid pada daun seledri dengan metode refluks dengan y adalah absorbansi sampel dan x adalah konsentrasi flavonoid dalam sampel. Pengukuran absorbansi pada ekstrak daun seledri dilakukan pada panjang gelombang maksimal yang didapat yaitu 350 nm. Data kadar flavonoid pada sampel menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada gelombang 350 nm dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6.
Data Kadar Flavonoid Pada Sampel

Ekstrak Sampel (μl)	Replikasi	Absorbansi	Kadar (mg/100 g sampel)	Rata-rata kadar (mg/100 g sampel)
5	I	0,1	15,46	16,58
	II	0,11	17,18	
	III	0,11	17,12	
10	I	0,135	21,35	20,79
	II	0,13	20,55	
	III	0,13	20,47	
20	I	0,14	22,19	22,47
	II	0,145	23,08	
	III	0,14	22,15	
25	I	0,15	23,88	24,71
	II	0,155	24,76	
	III	0,16	25,51	

Hasil penetapan kadar yang diperoleh pada ekstrak sampel masing-masing terdiri dari 5 μl , 10 μl , 20 μl , dan 25 μl menunjukkan bahwa rata-rata kadar flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun seledri pada sampel replikasi 1 pada 5 μl

dengan rata-rata kadar adalah 16,58 mg/100 g, pada sampel replikasi 2 adalah 20,79 mg/100 g, pada sampel replikasi 3 adalah 22,47mg/100 g, dan pada sampel replikasi 4 rata-rata kadar

flavonoid yang paling besar yaitu 24,71mg/100 g.

Pengukuran kadar flavonoid total pada ekstrak daun seledri dengan penambahan AlCl_3 dan NaNO_2 terbentuk senyawa kompleks antara AlCl_3 dan NaNO_2 dengan flavonoid yang menghasilkan reaksi warna, yang kemudian bereaksi dengan basa kuat (NaOH). Pereaksi AlCl_3 dapat digunakan untuk mendeteksi flavonoid dengan gugus orto dihidroksi dan dihidroksi karbonil atau yang hanya mempunyai gugus orto dihidroksi saja.

Kadar yang diperoleh dapat dibuktikan dengan ketelitian metode spektrofotometri UV-Vis melalui uji presisi. Uji presisi merupakan ukuran yang menunjukkan kesesuaian antara hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Berdasarkan hasil tersebut diperoleh SD (*standar deviation* atau simpangan baku) dan RSD (*relative standar deviation* atau simpangan baku relatif). Hasil uji tersebut tertera pada Tabel 7.

Tabel 7.
Data hasil uji presisi

Ekstrak Sampel(SD	RSD
5	0,006	1,06 %
10	0,001	0,11 %
20	0,004	0,10 %
25	0,005	0,21 %

Hasil pengujian presisi menunjukkan nilai RSD (*Relative standar deviation* atau simpangan baku relatif) pada sampel A adalah 1,06 %, pada sampel B adalah 0,11 %, pada sampel C adalah 0,10 %, dan pada sampel D adalah 0,21 %. Nilai yang diperoleh sesuai dengan ketentuan yaitu $\text{RSD} \leq 2\%$. Dengan demikian identifikasi flavonoid pada ekstrak daun seledri dengan metode spektrofotometri UV-Vis ini dikatakan sangat baik.

SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah Terdapat senyawa flavonoid pada ekstrak daun seledri (*apium graveolens l.*) dari hasil refluks. Hasil rata-

rata kadar senyawa flavonoid ekstrak daun seledri (*apium graveolens l.*) yang diperoleh pada sampel A adalah 16,58 mg/100 g, pada sampel B 20,79 mg/100 g, pada sampel C 22,47mg/100 g, dan pada sampel D 24,71mg/100 g.

Saran dalam penelitian ini dilakukan perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar senyawa yang terkandung dalam tumbuhan daun seledri selain dari daunnya dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan membuat sebuah sediaan farmasi dari hasil ekstrak daun seledri.

DAFTAR PUSTAKA

- Agung, NC. (2016). *Pengembangan Produk kombinasi Ekstrak Daun Pare Dan Bonggol Pisang Kepok Dengan Sediaan Tonik Rambut Pada Kelinci Jantan*. Jakarta : Univesitas Pancasila, Hal : 62.
- Alhabsyi, D.F., Suryanto, E., dan Wewengkang, D.S. (2014). *Aktifitas Antioksidan Dan Tabir Surya Pada Ekstrak Kulit Buah Pisang Goroho(Musa Acuminata L)*. Jurnal Ilmiah. Manado: UNSRAT Manado.
- Asih, I.A.R. Astuti. (2009). *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycin max)*. Jurnal. Bukit Jimboran : FMIPA, Universitas Udayana. Hal: 35.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta : Depkes RI.
- Departemen Kesehatan RI. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia edisi 1*. Jakarta : Depkes RI.
- Desandi Y, Andi. (2014). *Ekstraksi dan Uji Filokimia (Sonneratia alba)*. Laporan Penelitian. Bandung : Universitas Padjadjaran. Hal :5.
- Ganjar, I. G., dan Rohman, A. (2013). *Kimia Farmasi Analis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Hanani, Endang. (2016). *Analisis Fitokimia*. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, 2nd, (Terjemahan oleh : Padwaminata, K. Dan Soediro, I). Bandung : Penerbit ITB.
- Hayati, E.K, dan Halimah. N. (2010). *Phytochemical Test and Brine Shrimp Lethally Test Against Artemia salina Leach Anting-anting (Achalypa indica Linn.) Plant Ekstract*. *AlCHEMY*. Vol. 2: 53-103.

- Masyhud. (2010). *Tanaman Obat Indonesia*. <http://www.dephut.go.id/index.php.id>. (Diakses tanggal 12 Desember 2016).
- Nadinah. (2008). *Kinetika Inhibisi Ekstrak Etanol Seledri (*Apium graveolens L.*) dan fraksinya Terhadap Enzim Xantin oksidase Serta Penentuan Senyawa Aktifnya*. Tesis. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Raharjo, T.J. (2013). *Kimia Hasil Alam*. Cetakan I. Yogyakarta : Pustaka Pelajar. Hal : 111.
- Rijke, E. (2005). *Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application ti Plants of The Leguminosae Family* [disetasi]. Amst erdam: Universitas Amst erdam.
- Sukandar EY, Suwendar, Ekawati, E. (2006). *Aktivitas Ekstrak Etanol Herba Seledri (*Apium graveolens*) dan Daun Urang Aring (*Eclipta prostrata L.*) terhadap *Pityrosporum ovale**. *Majalah Farmasi Indonesia*. 17(1):7-12.
- Rohyami, Yuli. (2008). *Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa Scheff Boerl.*)*. *Jurnal*. Yogyakarta : Universitas Islam Indonesia.
- Taher, Tamrin. (2011). *Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Langsung (*Lansium domesticum L.*)*. Skripsi. Gorontalo: UNG.
- Voight, R. (1994). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh NoeronoSoenandi. Yogyakarta : Gajah Mada Universitas Press.
- Watson, David G. (2005). *Analisis Farmasi (Edisi II)*. Diterjemahkan oleh Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia. Jakarta : EGC. Hal : 105.
- Yuniarti, Titin. (2008). *Ensiklopedia Tanaman Obat Tradisional*. Yogyakarta: Media Pressindo. Hal: 3.