

Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Densitometri

Annisa Fatmawati¹, Nurwani Purnama Aji²

¹)Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Alma Ata

²)Akademi Farmasi Al-Fatah Bengkulu

Email : annisafatma20@gmail.com

Abstrak

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) mengandung senyawa flavonoid yang dapat digunakan untuk antikanker, antidiabetes dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan flavonoid total pada daun kelor dengan standar kuersetin. Penentuan kandungan kuersetin dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis densitometrik (TLC-Densitometri). Kuersetin standar dibuat dengan konsentrasi 1mg / ml dan sampel ekstrak 250mg / ml dalam metanol, dilakukan scan panjang gelombang dan pembacaan serapan luas area untuk penetapan kadar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen ekstrak etanol daun kelor (EEDK) 13,65%, dan kadar flavonoid total 0,45 gram / 100 gram ekstrak dengan persentase 0,45%. Fase gerak yang digunakan toluena: etil asetat: asam format, 5: 4: 0,2 (v / v / v) memberikan hasil elusi yang baik. Daun kelor dapat digunakan untuk pengobatan bahan alami dengan kandungan flavonoid.

Kata kunci: *Moringa oleifera*, kuersetin, KLT-Densitometri

Abstract

Moringa leaf (*Moringa oleifera* Lam) contains flavonoid compounds that can be used for anticancer, antidiabetes and antioxidants. This study aims to determine the total flavonoid content in moringa leaves with standard quercetin. Determination of quercetin content was done by thin layer chromatography densitometric (TLC-Densitometry) method. The standard quercetin was prepared with a concentration of 1mg/ml and the extract sample 250mg/ml in methanol, wavelength scans and uptake readings for area determination were carried out. The results showed that the rendemen of 13.65% moringa leaf ethanol extract, and total flavonoid content 0,45 gram/100 gram extract with percentage 0,45%. The mobile phase used toluene: ethyl acetate: formic acid, 5: 4: 0.2 (v / v / v) gives good elution results. Moringa leaves can be used for the treatment of natural ingredients with flavonoid content.

Keywords : *Moringa oleifera*, quercetin, TLC-Densitometry

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki ragam tumbuhan yang dapat dijadikan sebagai sumber nutrisi dan telah diteliti memiliki khasiat obat. Berbagai macam penyakit dengan terapi obat sintetis dapat menyebabkan efek samping, sehingga pengobatan bahan

alam menjadi alternatif terapi. Bahan alam yang berasal dari tumbuhan yang dapat digunakan untuk pengobatan yaitu daun kelor.

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) mengandung senyawa flavonoid yang dapat memiliki efek antikanker dan antioksidan (1). Kuersetin merupakan flavonoid yang terdapat dalam daun kelor, yang secara *invivo* memiliki aktivitas antidiabetes bersama senyawa asam klorogenik dan moringinine (2). Flavonoid adalah metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman dengan berbagai aktivitas biologis. Sifat fisik dan biokimia flavonoid, mampu berpartisipasi dalam interaksi tanaman dengan organisme lain (mikroorganisme, hewan, dan tanaman lain) dan reaksi terhadap tekanan lingkungan (3).

Beberapa penelitian melaporkan mekanisme kuersetin sebagai antidiabetes, seperti penurunan peroksidasi lipid, peningkatan aktivitas enzim antioksidan (seperti SOD, GPX, dan CAT), penghambatan aktivasi PI3K dan penurunan penyerapan glukosa usus dengan menghambat GLUT2 (4). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kandungan flavonoid total pada daun kelor dengan standar kuersetin. Penentuan kandungan kuersetin dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis densitometrik (TLC-Densitometri).

MATERIAL DAN METODE

Bahan uji yang digunakan adalah daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diperoleh dari Kranggan, Tasikmadu, Karanganyar, Jawa Tengah. Alkohol 70% digunakan untuk pelarut ekstraksi daun kelor. Silica gel GF-245 sebagai fase diam, fase gerak (toluena: etil asetat: asam format) dan pelarut ekstrak methanol pro-analisis (p.a) untuk uji kromatografi lapis tipis (KLT) densitometri. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (pyrex), *rotary evaporator*, *magnetic stirrer* dan Densitometer (*TLC Scanner Camag*).

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kelor (EEDK)

Tanaman segar kelor diperoleh dari daerah Kranggan, Tasikmadu, Karanganyar, Jawa Tengah dan dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi, FMIPA, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. Tanaman segar kelor dicuci bersih dan dilakukan sortir terhadap bagian daun kelor. Kemudian dilakukan pengeringan simplisia daun dengan oven. Simplisia kering daun kelor diperoleh dengan cara pengeringan dalam oven pada suhu 40°C sampai kadar air kurang dari 10% dari bobot awal dan diserbuk dengan menggunakan blender (5).

Maserasi daun kelor dilakukan menurut penelitian Saputra (6) dengan modifikasi perbandingan pelarut. Daun kelor tua segar dibersihkan, dicuci, dikeringkan kemudian dihaluskan dan diayak dengan mesh no. 12 sampai diperoleh serbuk kering. Sebanyak 1,316 kg serbuk simplisia dimaserasi dengan etanol 70% (1:5) selama 3 hari, kemudian disaring. Ampas dimaserasi kembali dengan larutan etanol 70% (remaserasi satu kali). Maserat kemudian diuapkan dengan menggunakan vacuum rotary evaporator (suhu 60°C, kecepatan) hingga tidak ada uap ethanol yang menetes pada labu alas bulat penampung kaca *rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan waterbath pada suhu 50°C hingga didapat ekstrak kental etanol 70% (7). Ekstrak kental yang didapat, dilakukan perhitungan rendemen ekstrak berdasarkan rumus: % rendemen = (berat ekstrak kental (gram)/ berat sampel (gram)) x 100% (8).

Penetapan Kadar kuersetin pada Ekstrak Etanol Daun Kelor

Penetapan kadar kuersetin pada EEDK berdasarkan penelitian Gupta *et al.*, (9) dengan modifikasi konsentrasi standar dan sampel sesuai orientasi penelitian di Laboratorium Kimia Analisis UAD. Timbang sampel EEDK sejumlah 250 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol pro-analisis (pa) dalam labu takar 10 ml. Standar kuersetin sebanyak 25,0 mg dilarutkan dalam 25 ml pelarut metanol pro-analisis. Larutan dipipet 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 ml dilarutkan dalam metanol p.a dengan labu takar 10 ml (8).

Fase diam menggunakan pelat Silica Gel F254 10 x 10 cm dipanaskan dalam oven suhu 100°C selama 10 menit. Sampel dan standar ditotolkan (0,5 mikro liter) pada pelat, pada jarak 10 mm (10). Jarak elusi yang digunakan 80 mm dilakukan pada suhu kamar (28 ± 2°C), dengan fase gerak toluena: etil asetat: asam format, 5: 4: 0,2 (v / v / v), dalam chamber Camag kaca yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan fase gerak selama 20 menit. Fase diam (plate) KLT yang telah dikeringkan di dalam lemari asam, selanjutnya di masukkan ke dalam alat Densitometer (Camag TLC Scanner) yang terinstalasi dengan software komputer bernama Win Cats, menggunakan lampu deuterium (9). Pembacaan plat KLT dengan densitometer dilakukan dengan *scanning* panjang gelombang maksimal dan pembacaan luas area dibawah kurva atau *area under curve* (AUC). Data seri kadar dan AUC dilakukan analisis SPSS dengan metode regresi. Hasil analisis regresi selanjutnya dilihat pada data R hitung dan dibandingkan dengan R tabel. Kadar flavonoid total dihitung dengan regresi linier antara AUC dengan kadar kurva baku standar kuersetin dan dinyatakan dalam % kadar.

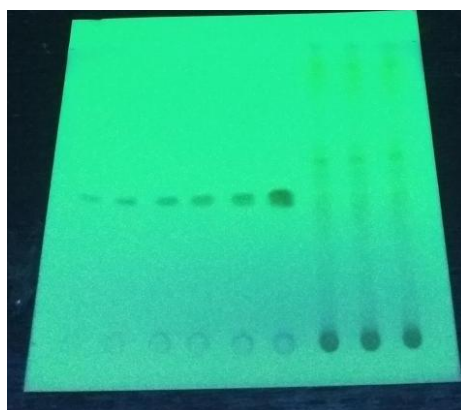
HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun kelor (*Moringa oleifera*) dilakukan determinasi di Laboratorium Ilmu Alam, Biologi, Fakultas MIPA, UAD dengan tujuan untuk mengetahui secara pasti bahwa sampel yang digunakan merupakan daun kelor. Hasil determinasi daun kelor yang diperoleh sebagai berikut:

1b - 2b - 3b - 4b - 17b - 18b - 19b - 20b - 21b - 22b - 23b - 24b - 25b - 26b - 27a - 28b - 29b - 30b - 21a - 32a - 33a - 34a - 35a - 36d - 37b - 38b - 39b - 41b - 42b - 44b - 45b - 46a - 47a Moringaceae - Moringa - 1 Moringa oleifera Lamk

Ekstrak etanol daun kelor dibuat dengan metode maserasi yaitu dengan cara menimbang serbuk simplisia kering daun kelor sebanyak 1,316 kg dan direndam menggunakan etanol 70% sebanyak 6,58 Liter (perbandingan 1 : 5). Etanol 70% dipilih untuk maserasi karena merupakan pelarut dengan daya ekstraktif terbesar untuk semua bahan alam berbobot molekul rendah, seperti alkaloida, saponin dan flavonoid^[10].

Sebanyak 1,316 kg serbuk simplisia dimaserasi dengan etanol 70%. Metode penyarian dilakukan dengan cara maserasi dan remaserasi selama 3 hari. Pengadukan selama 3 jam menggunakan magnetic stirrer dengan skala 3 (*Ika Labortechnik*) bertujuan untuk memudahkan penetrasi cairan penyari kontak dengan serbuk simplisia. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan didapatkan filtrat, dan diuapkan menggunakan rotary evaporator (kecepatan , dengan suhu 60°C) sampai agak kental. Kemudian ekstrak dipekatkan pada waterbath dengan suhu 60°C sampai terbentuk ekstrak kental. Setelah didapatkan ekstrak etanol kental daun kelor, dilakukan penimbangan bobot ekstrak yaitu sebanyak 179,7 gram, sehingga didapatkan rendemen ekstrak sebanyak 13,66%.



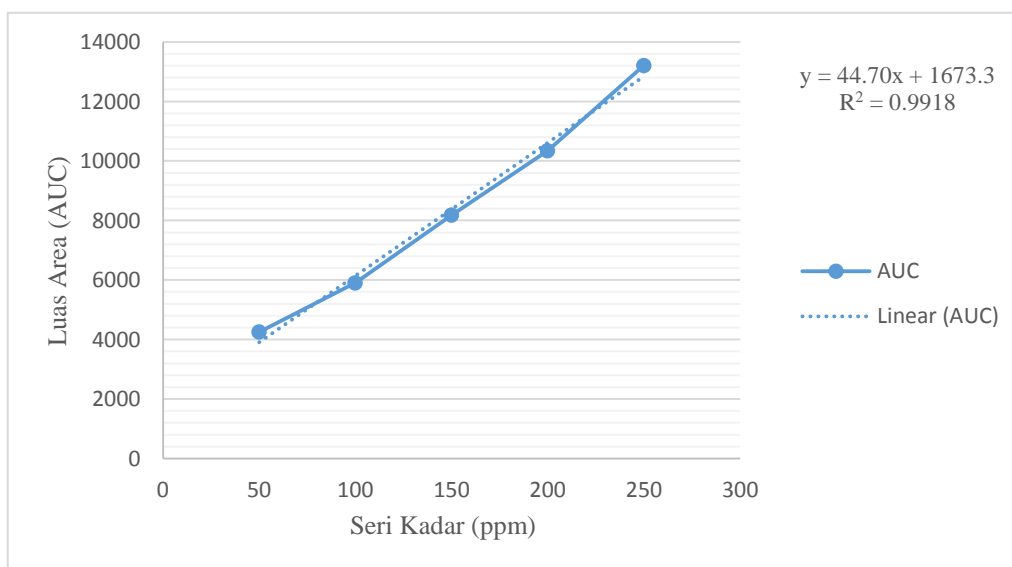
Gambar 1. Plate KLT Hasil Elusi Sampel EEDK dan Standar Kuersetin

Penetapan Panjang Gelombang kuersetin dengan Densitometer

Pembacaan panjang gelombang maksimum dilakukan pada tolotan seri kurva baku standar kuersetin dari konsentrasi terendah hingga tertinggi. Rentang pembacaan densitometri panjang gelombang dilakukan pada 300 - 500 nm secara teori panjang gelombang kuersetin 380 nm (9), didapatkan hasil panjang gelombang kuersetin pada percobaan ini pada 377 nm. Hasil panjang gelombang kuersetin yang didapat pada percobaan ini mendekati panjang gelombang secara teoritis, sehingga panjang gelombang hasil percobaan digunakan untuk pembacaan *area under curve* (AUC) plate silica gel (Gambar 1) pada densitometer.

Pembacaan Area Under Curve (AUC) dengan Densitometer

Pembacaan serapan AUC pada plate KLT dilakukan dengan panjang gelombang maksimum 377 nm dari scanning hasil penelitian. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai Rf, dengan rumus $R_f = \text{Jarak Hasil Elusi (cm)} / \text{Total Jarak elusi (cm)}$ (8). Nilai Rf sampel EEDK (0,44) sama dengan Rf standar (0,44), sehingga dapat dikatakan bahwa bercak hasil elusi sampel EEDK mengandung senyawa kuersetin yang dapat di scan untuk penetapan kadar. Hasil serapan luas area dibawah kurva (AUC) tersaji pada Tabel I.



Gambar 2. Kurva linier antara Luas Area (AUC) dengan Seri Kadar (ppm) Kuersetin

Tabel I. Hasil KLT Densitometri Penetapan Kadar Kuersetin EEDK

Keterangan	Seri Kadar (ppm)	Luas Area (AUC)	Hasil Elusi (cm)	Jarak Elusi (cm)	Rf
Standar	50	4253,6	3,5	8	0,44
Standar	100	5905,3	3,5	8	0,44
Standar	150	8177,8	3,5	8	0,44
Standar	200	10348,1	3,5	8	0,44
Standar	250	13207,5	3,5	8	0,44
Sampel EEDK	Replikasi 1	6771,0	3,5	8	0,44
Sampel EEDK	Replikasi 2	6882,6	3,5	8	0,44
Sampel EEDK	Replikasi 3	6487,8	3,5	8	0,44

Perhitungan Kadar kuersetin dalam EEDK

Hasil perhitungan regresi linear antara seri kadar dengan luas area plate EEDK (Gambar 2) didapatkan persamaan regresi linier $Y = 44,7x + 1673,3$ dengan nilai Rhitung = 0,9960. Nilai Rhitung > Rtabel = 0,8783 (derajat bebas 3; $p < 0,05$), sehingga persamaan regresi linear dapat digunakan untuk menghitung kadar kuersetin. Berdasarkan hasil penetapan kadar kuersetin dengan KLT Densitometri didapatkan kadar kuersetin = 0,0045mg/ mg EEDK, kemudian dikonversi menjadi kadar kuersetin 0,45 gram/ 100 gram EEDK = 0,45% (b/b).

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) mengandung senyawa flavonoid yang dapat memiliki efek antikanker dan antioksidan (11). Kuersetin merupakan flavonoid yang terdapat dalam daun kelor, yang secara invivo memiliki aktivitas antidiabetes bersama senyawa asam klorogenik dan moringinine (2). Flavonoid adalah metabolit sekunder yang disintesis oleh tanaman dengan berbagai aktivitas biologis. Sifat fisik dan biokimia flavonoid, mampu berpartisipasi dalam interaksi tanaman dengan organisme lain (mikroorganisme, hewan, dan tanaman lain) dan reaksi terhadap tekanan lingkungan (4).

KESIMPULAN DAN SARAN

Daun kelor mengandung senyawa kuersetin yang dinyatakan dalam kadar flavonoid total 0,45 gram/ 100 gram EEDK = 0,45%. Ekstrak etanol daun kelor dapat digunakan untuk pengobatan bahan alami dengan kandungan flavonoid. Perlu

dilakukan penetapan kadar flavonoid total pada hasil fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun kelor dengan metode KLT Densitometri.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*,(2016); 5(2), 49-56.
- [2] Ali, Fahmy T., Nahla S. Hassan dan Rehab R. Abdrabou. Potential activity of *Moringa Oleifera* leaf extract and some active ingredients against diabetes in rats. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, May-2015; Volume 6, Issue 5
- [3] Mierziak, J.,K.Kostyn, A.Kulma. Flavonoids as important molecules of plants interactions with the environment. *Molecules*. 2014; 19.16240-16265.
- [4] Vinayagam, Ramachandran dan Baojun Xu. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism*. 2015, 12:60. Bio Med Central.
- [5] Srijanto, Bambang, Olivia Bunga P., Lely Khojayanti, Eriawan Rismana, dan Sriningsih, Pemurnian Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness.) Dengan Teknik Ekstraksi Cair-Cair. *Prosiding InSINas*, Jakarta; 2012
- [6] Saputra, Irfan, Ghuzrina Prihandini, Siti Zullaikah, M Rachimoellah. Ekstraksi Senyawa Aktif dari Daun *Moringa oleifera*. *Jurnal Teknik Pomits* Vol. 2, No. 1, (2013) ISSN-2337-3539(2301-9271 Print)
- [7] Departemen Kesehatan RI. *Buku Panduan Teknologi Ekstrak*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 2000; Hlm. 3,6,11-15,17,39.
- [8] Anonim. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisis I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008
- [9] Gupta, Arti, Navin R Sheth, Sonia Pandey and Jitendra Singh Yadav. Determination of Quercetin a Biomarker in Hepatoprotective Polyherbal Formulation through High Performance Thin Layer Chromatography. *J Chromatogr Sep Tech* 2015, 6:6
- [10]Bhandari, Pamita, Neeraj Kumar, Ajai P. Gupta, Bikram Singh dan Vijay K. Kaul. A rapid RP-HPTLC densitometry method for simultaneous determination of major flavonoids in important medicinal plants. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 2092–2096.
- [11]Agoes, Goeswin. *Teknologi Bahan Alam*. 2009; Serial *Farmasi Industri-2* ed. Revisi