

PREDIKSI MODEL PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL PADA EKSTRAK *Abelmoschus manihot* L. MENGGUNAKAN SPEKTROSKOPI IR YANG DIKOMBINASIKAN DENGAN KEMOMETRIK

Juliandro Matsuzaki Fangohoy¹⁾, Sri Sudewi¹⁾, Adithya Yudistira¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

This study aims to determine the validation of IR spectroscopy method in determining the total flavonoid level in Abelmoschus manihot L., can meet the requirements and can be applied. The method for determining the total flavonoid content model using a combination of IR Spectroscopy and Chemometrics Partial Least Square Regression (PLSR). The calorimetrics method was used to determine the total flavonoid content in the green gedi leaves extracts on eight samples of growth where Bitung Was 2.64 mg QE/g extract \pm 0.035, Minahasa Selatan is 1.91 mg QE/g extract \pm 0.027, Kotamobagu is 4.84 mg QE/g extract \pm 0.03, Minahasa Utara is 4.40 mg QE/g extract \pm 0.091, Manado is 3.45 mg QE/g extract \pm 0.012, Minahasa Tenggara is 1.72 mg QE/g extract \pm 0.006, Minahasa is 3.67 mg QE/g extract \pm 0.033, Tomohon is 3.40 mg QE/g extract \pm 0.003. This combination involves involving x-variables (FTIR measurement results) and y-variables (data from the results of the calorimetric method analysis). Error value [standard error calibration (SEC=0.003), standard error of prediction (SEP = 0.052)] and calibration r value 0.999, and r validation 0.975.

Keywords: *Flavonoids, Green Gedi Leaves, FTIR Spectrofotometry, UV-VIS Spectrofotometry, Chemometrics*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Validasi Metode Spektroskopi IR Pada Penetapan kadar Flavonoid Total pada *Abelmoschus manihot* L Dapat Memenuhi Persyaratan dan Dapat di Aplikasikan. Metode penentuan model kandungan flavonoid total menggunakan kombinasi Spektroskopi IR dan Kemometrik *Partial Least Square Regression* (PLSR). Metode Kalorimetrik digunakan untuk mengetahui kandungan Flavonoid Total pada Ekstra Daun Gedi Hijau pada 8 sampel tempat tumbuh yaitu Bitung sebesar 2.64 mg QE/g ekstrak \pm 0.035, Minahasa Selatan sebesar 1.91 mg QE/g ekstrak \pm 0.027, Kotamobagu sebesar 4.84 mg QE/g ekstrak \pm 0.03, Minahasa Utara sebesar 4.40 mg QE/g ekstrak \pm 0.091, Manado sebesar 3.45 mg QE/g ekstrak \pm 0.012, Minahasa Tenggara sebesar 1.72 mg QE/g ekstrak \pm 0.006, Minahasa sebesar 3.67 mg QE/g ekstrak \pm 0.033, Tomohon sebesar 3.40 mg QE/g ekstrak \pm 0.003. Kombinasi ini melibatkan variabel x (hasil pengukuran FTIR) dan variabel y (data hasil analisis metode Kalorimetrik). Nilai kesalahan (*standar error calibration* (SEC = 0.003), *standard error of prediction* (SEP = 0.052)) dan nilai r kalibrasi 0.999, serta r validasi 0.975.

Kata Kunci: Total Flavonoid, Daun Gedi Hijau, Spektrofotometri FTIR, Spektrofotometri UV-VIS, Kemometrik.

PENDAHULUAN

Gedi hijau (*Abelmoschus manihot L.*) merupakan salah satu tumbuhan dari suku Malvaceae umum ditanam dan dimanfaatkan oleh masyarakat di Sulawesi Utara khususnya Manado. Masyarakat Manado sendiri biasa memanfaatkan Gedi hijau (khususnya bagian daun) sebagai bahan makanan yang dikenal sebagai Bubur Manado (Tinutuan), yang merupakan salah satu makanan khas dari Manado (Mamahit dan Sukarno, 2010).

Senyawa flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Robinson, 1991).

Analisis kuantitatif senyawa flavonoid total dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kadar flavonoid total yang terkandung pada ekstrak etanol daun gedi hijau (*Abelmoschus manihot L.*). Analisis flavonoid dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis karena flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, J.B 1987).

Spektrofotometer inframerah tertransformasi Fourier (Fourier transformed infrared spectrophotometer, FTIR)

merupakan suatu metode yang dapat mengukur secara cepat contoh tanpa merusak dan mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak. Akan tetapi, Penggunaan FTIR dalam analisis tumbuhan masih terbatas karena matriks dan spektrum yang dihasilkan cukup kompleks. Dukungan kemometrik memperluas potensi spektroskopi FTIR sebagai metode alternatif untuk menganalisis komponen tumbuhan. (Wold et al., 2001).

Berdasarkan hal-hal diatas maka mendorong penulis melakukan penelitian yang lebih intensif untuk mengetahui kadar flavonoid total *Abelmoschus manihot L.* menggunakan Spektrofotometer inframerah tertransformasi Fourier (*Fourier transformed infrared spectrophotometer*, FTIR) karena metode ini merupakan suatu metode yang dapat mengukur secara cepat contoh tanpa merusak dan mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak,

METODELOGI

PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2018 sampai Mei 2019 di Laboratorium Penelitian Farmasi Lanjutan, Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi Manado

Bentuk Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental yang artinya penelitian ini dilakukan untuk mengetahui akibat yang ditimbulkan dari

suatu perlakuan yang diberikan secara sengaja oleh peneliti.

Alat dan Bahan

a. Alat

Alat-alat ukur analitis yang digunakan untuk penelitian ini adalah Spektrofotometri UV-VIS (Shimadzu 00780), Komputer pengolah data (Acer Aspie ES 11), Alat-alat gelas, Vortex (Mixer Hwashin), toples, Blender (Phillips), Water Bath, *rotary shaker*.

b. Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah simplisia kering daun Gedi dari 8 tempat tumbuh yang berbeda yaitu Minahasa, Minahasa Utara, Minahasa Selatan, Minahasa Tenggara, Tomohon, Manado, Bitung dan Kotamobagu . Etanol p.a, etanol 96%, aluminium klorida (AlCl_3) (Merck), asam asetat (CH_3COOH) (Merck), kuersetin p.a, pelarut n-heksana (Merck), etil asetat (Merck), dan aquadest (Merck).

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel

Sampel daun Gedi Hijau (*Abelmoschus manihot* L.) diambil dari 8 tempat tumbuh yang berbeda yaitu Minahasa, Minahasa Utara, Minahasa Selatan, Minahasa Tenggara, Tomohon, Manado, Bitung dan Kotamobagu. Selanjutnya setiap sampel daun gedi hijau (*Abelmoschus manihot* L.) dibuat menjadi bentuk simplisia. Kemudian setiap sampel dari masing-masing kota dibuat ekstrak dengan menggunakan metode maserasi.

Ekstraksi

Sebanyak 250 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples 500 mL dan kemudian ditambahkan etanol 96%. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 3 hari dan pengadukan dibantu dengan alat *rotary shaker*. Ekstrak hasil maserasi kemudian diuapkan dengan *Water Bath* hingga terbentuk ekstrak kental.

Pembuatan Larutan Baku Kuersetin

Dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang dengan seksama 10 mg kuersetin p.a dan dilarutkan dengan etanol p.a 10 mL. Kemudian dibuat larutan standar kuersetin 10; 20; 30; 40; 50 ppm dari pengenceran larutan baku kuersetin 1000 ppm.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara membuat larutan standar kuersetin 40 ppm kemudian sebanyak 1 mL larutan kuersetin 40 ppm tersebut direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 2% di dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 8 mL asam asetat 5% ke dalam larutan dan dilakukan pembacaan pada rentang panjang gelombang 400-500 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

Penetapan Operating Time Kuersetin

Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 mL larutan kuersetin 20 ppm dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 2%, dan ditambahkan 8 mL asam asetat 5% ke dalam larutan. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang

maksimum yang telah diperoleh dengan interval waktu 60 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Sukmawati, 2014).

Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Pembuatan kurva baku kuersetin dilakukan dengan cara membuat larutan baku kuersetin 1000ppm, lalu dibuat larutan dengan seri konsentrasi 10; 20; 30; 40; 50 ppm kemudian dipipet 1 ml lalu ditambahkan 1 ml aluminium (III) klorida 5%, 1 ml larutan CH₃COOH 5%, Setelah itu diinkubasi selama 20 menit, absorbansi dari larutan pembanding diukur menggunakan spektrofotometer UV Vis pada panjang gelombang maksimum.

Penentuan Kandungan Total Flavonoid Ekstrak Daun Gedi

Sampel ekstrak etanol daun gedi hijau 1000 ppm dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan dengan volume aluminium klorida (AlCl₃) hasil optimasi dengan konsentrasi dari hasil optimasi yang paling optimal. Tambahkan volume hasil optimasi asam asetat (CH₃COOH) dengan konsentrasi hasil optimasi yang paling optimal. Campuran dikocok homogen lalu dibiarkan selama waktu inkubasi yang paling optimal dari hasil optimasi waktu inkubasi. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Penentuan nilai flavonoid akhir dilakukan berdasarkan formula yang dikembangkan oleh Pan *et al.* (2012), yaitu:

$$\text{Flavonoid Total} = \left(\frac{m}{g}\right) = \frac{Y \times N \times V}{W}$$

Keterangan :

Y = konsentrasi flavonoid contoh yang dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standard (mg g⁻¹)

N = Faktor pengenceran.

V = volume Sampel (mL).

W= berat Sampel (g).

Pembuatan spektrum FTIR

Sebanyak 0.5 mg serbuk daun Gedi dicampurkan dengan 180 mg KBr, dihomogenisasi. Pengukuran spektrum FTIR dilakukan pada daerah IR tengah (4000- 400 cm⁻¹) dengan melibatkan pengontrol kerja berupa personal komputer yang dilengkapi perangkat lunak OPUS versi 4.2. Spektrum dihasilkan dengan kecepatan 32 detik dan resolusi 4 cm-1. Tampilan data spektrum akan menampilkan jumlah titik serapan kemudian diubah ke dalam format DPT (*data point table*) untuk keperluan pengolahan data. Data ini dapat dibuka dengan program *Microsoft Excel*. Selanjutnya data jumlah titik serapan yang ditampilkan (telah dihilangkan serapan CO₂-nya pada 2399-2252 cm⁻¹) diolah dengan program *Mini Tab* yang dijalankan dengan sistem operasi *Microsoft Windows 10*.

Analisis Data

Model kalibrasi multivariat dibuat dengan program Mini Tab menggunakan metode regresi PLS. Pembentukan model prediksi flavonoid total dilakukan oleh PLS dengan melibatkan variabel x (hasil pengukuran FTIR) dan variabel y (data hasil analisis metode AlCl₃). Kalibrasi dan validasi model diolah dengan teknik validasi silang. Keakuratan model dapat dilihat pada nilai korelasi atau koefisien determinasi dan

nilai kesalahan yang dihasilkan. Model dapat digunakan bila memiliki nilai kesalahan (standar error calibration SEC, standard error of prediction SEP) rendah dan nilai korelasi atau koefisien determinasinya tinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Ekstraksi

Setiap sampel sebanyak 250 gram serbuk simplisia daun gedhi hijau dimasukkan ke dalam toples 500 ml dan di tambahkan etanol. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 24 jam menggunakan alat bantu pengaduk (*rotary shacker*). kemudian disaring dan didapatkan filtrat. Filtrat yang diperoleh akan diuapkan dengan *rotary evaporator*.

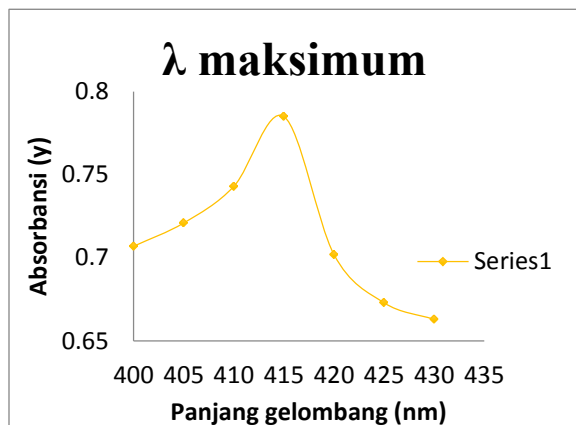
Berdasarkan hasil ekstraksi 250 gram daun gedhi hijau maka diperoleh jumlah hasil rendemen dari masing-masing ekstrak adalah kota Bitung sebesar 5,50%, Minahasa Selatan sebesar 5,80%, Kotamobagu sebesar 5,25%, Minahasa Utara sebesar 5,34%, Manado sebesar 6,59%, Minahasa Tenggara sebesar 7,23%, Minahasa sebesar 7,34% dan Kota Tomohon sebesar 5,63%.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Pada penelitian ini penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang gelombang 400-500 nm dan konsentrasi yang dipakai adalah 40 ppm sehingga diperoleh panjang gelombang 415 nm.

Tujuan penentuan panjang gelombang maksimum agar mengetahui daerah serapan yang dapat dihasilkan berupa

nilai absorbansi dari larutan baku kuersetin yang diukur serapannya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-500 nm. Data hasil panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada gambar 1.



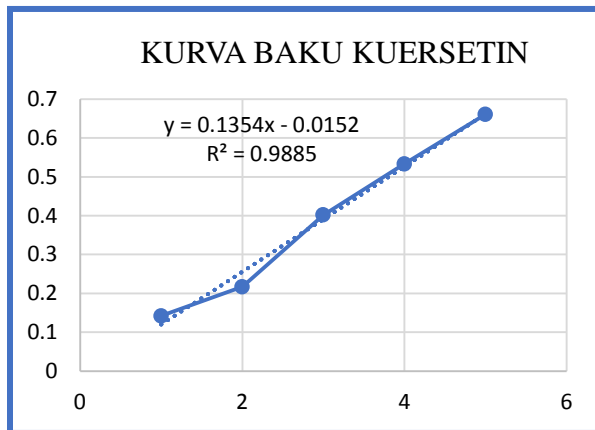
Gambar 1. Kurva Panjang gelombang Maksimum Kuersetin

Penentuan *Operating Time*

Dari hasil pengukuran *Operating Time*, didapatkan bahwa absorbansi stabil pada menit ke-1 sampai dengan menit ke-20. Hal ini menunjukkan bahwa berdasarkan kestabilannya waktu optimal untuk pembacaan absorbansi adalah pada menit ke-1 sampai menit ke-20. Penentuan *operating time* perlu dilakukan untuk mengetahui waktu kestabilan optimal. *Operating time* ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum dari data yang telah dihasilkan pada penentuan panjang gelombang maksimum yaitu 415 nm dengan konsentrasi yang digunakan adalah 20 ppm dengan rentang waktu 1-20 menit dengan hasil absorbansi yaitu 0,42.

Kurva Kalibrasi Kuersetin dan Lineritas

Berdasarkan hasil pembuatan kurva kalibrasi dengan menggunakan metode Spektrofotometri yang menghubungkan konsentrasi dengan absorbansi, diperoleh persamaan linear $y = 0.1354x - 0,015$ dengan koefisien korelasi $r = 0,988$. Hasil koefisien korelasi diatas telah memenuhi kriteria penerimaan yaitu $\geq 0,98$ (Hermita, 2004).



Gambar 2. Kurva Baku Kuersetin

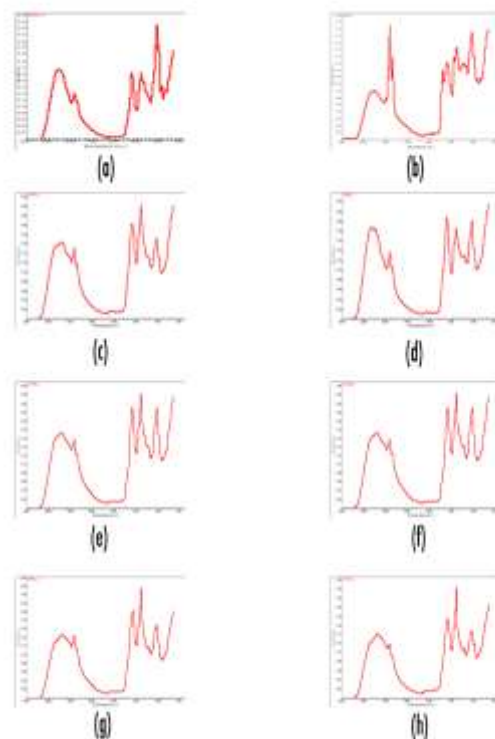
Hasil Kandungan Total Flavonoid

Pada perhitungan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Gedi Hijau ini dihitung menggunakan Persamaan Regresi Linear Kurva Baku $y = ax + b$ menghasilkan kandungan flavonoid pada Kota Bitung sebesar 2,64 mg QE/g ekstrak $\pm 0,035$, Minahasa Selatan 1,91 mg QE/g ekstrak $\pm 0,027$, Kotamobagu 4,84 mg QE/g ekstrak $\pm 0,03$, Minahasa Utara 4,40 mg QE/g ekstrak $\pm 0,091$, Manado 3,45 mg QE/g ekstrak $\pm 0,012$, Minahasa Tenggara 1,72 mg QE/g ekstrak $\pm 0,006$, Minahasa 3,67 mg QE/g ekstrak $\pm 0,033$, Tomohon 3,40 mg QE/g ekstrak $\pm 0,003$. Dan dari data diatas menunjukkan bahwa kandungan Total Flavonoid tertinggi berasal dari daerah Kotamobagu (Dataran Tinggi) dengan nilai

kandungan flavonoid sebesar 4,84 mg QE/g ekstrak. Dataran tinggi merupakan dataran yang luas dan letaknya di daerah tinggi atau pegunungan yang tingginya berkisar 700m di atas permukaan laut. Secara geografis jenis tanah di daerah ini merupakan Tanah Alluvial, tanah alluvial merupakan jenis tanah yang terbentuk dari hasil erosi dan sedimentasi sehingga cukup mendukung untuk bercocok tanam karena tanahnya sangat subur (Kasenda, dkk. 2014).

Pembuatan Spektrum FTIR

Spektrofometer inframerah merupakan suatu metode yang dapat mengukur secara cepat contoh tanpa merusak dan mampu menganalisis beberapa komponen secara serentak (Wold *et al.*, 2001). Spektrum FT-IR daun gedi memberikan pola yang hampir mirip satu sama lain, hal ini menandakan bahwa senyawa kimia yang dikandung hampir sama.



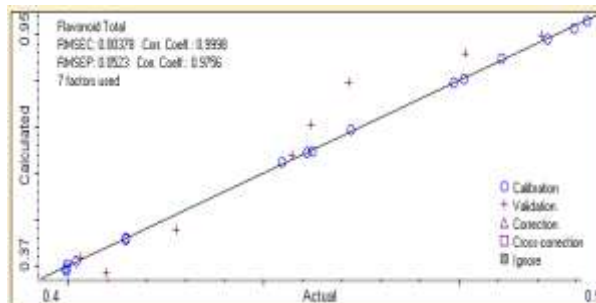
Gambar 3. Spektra FTIR Daun Gedi Hijau
(a) Bitung, (b) Minahasa Selatan,
(c) Kotamobagu, (d) Minahasa
Utara, (e) Manado, (f) Minahasa
Tenggara, (g) Minahasa, (h)
Tomohon

Berdasarkan pengujian dari ke 8 sampel menggunakan instrument FT-IR, diperoleh puncak absorbansi pada panjang gelombang $3580,05\text{ cm}^{-1}$ - $3649,76\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus OH (alcohol), pada panjang gelombang $3392,69\text{ cm}^{-1}$ - $3496,99\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus NH (Amina Sekunder). Pada ikatan C=O (Aldehid) terlihat di panjang gelombang $1720,43$ – $1739,99\text{ cm}^{-1}$, C=O (keton) pada 1675 - 1725 cm^{-1} , C=O (asam karboksilat) pada 1700 - 1725 cm^{-1} . Adanya ikatan C=C (alkena) pada panjang gelombang 1620 cm^{-1} - 1680 cm^{-1} . Serapan di daerah 1400 - 1500 cm^{-1} menunjukkan adanya C-C aromatic.

Analisis Data

Model kalibrasi multivariat dibuat dengan program Mini Tab menggunakan metode regresi PLS. Kalibrasi multivariat dengan metode *Partial Least Square Regression* (PLS) secara otomatis akan memberikan informasi spektrum yang khusus dan relevan dengan suatu sifat kimia dari model kalibrasi pada bilangan gelombang tertentu (Van der Vort *et al.*, 1992). Pembentukan model prediksi flavonoid total dilakukan oleh PLS dengan melibatkan variabel x (hasil pengukuran FTIR) dan variabel y (data hasil analisis metode AlCl₃). Kalibrasi dan validasi model diolah dengan teknik validasi silang. Model dapat digunakan bila memiliki nilai

kesalahan (standar error calibration SEC, standar error of cross validation SECV atau standard error of prediction SEP) rendah dan nilai korelasi atau koefisien determinasinya tinggi (Miller and Miller, 2010).



Gambar 4. Plot Regresi PLS Daun Gedi Hijau

Pada Plot regresi memperlihatkan mutu model regresi yang dihasilkan. Model data spektrum yang terbentuk merupakan model yang kurang baik karena menghasilkan titik yang tidak berdekatan satu sama lain, sehingga memperoleh nilai korelasi yang rendah.

Berdasarkan Hasil prediksi PLS menunjukkan nilai korelasi (r) kalibrasi = 0.999, nilai korelasi (r) validasi = 0.975 dan nilai SEP = 0.052 dan SEC = 0.003 Hal ini menunjukkan bahwa model kalibrasi dapat diterima dikarenakan memenuhi syarat dengan nilai koefisien determinasi yang tinggi dan galat yang rendah (Miller and Miller, 2010).

KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil Validasi Spektroskopi IR yang telah didapatkan menunjukkan bahwa Hasil tersebut memenuhi persyaratan dengan nilai parameter-parameter (r) validasi = 0.975 dan nilai SEP = 0.052. Hal ini menunjukkan bahwa model Validasi dapat diterima

dikarenakan memenuhi syarat dengan nilai koefisien determinasi yang tinggi dan galat yang rendah.

2. Berdasarkan hasil yang di dapatkan bahwa hasil dapat di aplikasikan dalam penentuan kadar total flavonoid dengan menggunakan metode FTIR.

SARAN

Disarankan agar dalam penentuan kandungan total flavonoid menggunakan spektrofotomer FTIR dapat menggunakan metode kemometrik yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

Harbone. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis*. ITB press, Bandung.

Kasenda, Ivanny, M.Sylviah, dan H.Wungouw. 2014. Perbandingan Denyut Nadi antara Penduduk yang Tinggal di Dataran Tinggi dan Dataran Rendah. *E-Biomedik*, 2(2): 1-6.

Mamahit L.P. & Soekarno,N.H., 2010. Satu senyawa organik yang diisolasi dari daun gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik) Asal Sulawesi utara. *Jurnal Kimia*. Vol.3, No.1, Hal. 45.

Miller, J.N., and Miller, J.C. 2010. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth edition*. Pearson Education Limited, England.

Pine, A.T.D., Alam, G. dan Attamim, F. 2011. Standarisasi mutu ekstrak daun gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik) dan uji efek antioksidan dengan metode DPPH.

<http://www.pasca.unhas.ac.id/jurnal>. [21 Agustus 2012].

Robinson, T., 1991. *The Organic Constituents of Higher Plants, 6th Ed.*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung

Rohaeti, E., Heryanto, R., Rafi, M., Kurniasari, I., and Darusman, L. K., 2006, Rapid Analysis of Total Flavonoids from Medicinal Herb: Interpretation of Chemometrics on Infrared Spectra of *Phyllanthus niruri*, *Prosiding of The 2006 Seminar on Analytical Chemistry 9 Maret 2006*, Departemen Kimia Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

South, E., H. Kaempe dan A. Tampi. 2013. Evaluasi Kandungan Total Polifenol dan Isolasi Senyawa Flavonoid Pada Daun Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). *Chemistry Progress*. 6 : 86.

Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. CV.Putra Media Nusantara, Surabaya.