

Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dari Babakan Ciparay, Bandung Selatan, Indonesia

*Irda Fidrianny, Komar Ruslan Wirasutisna, Patricia Amanda

Kelompok Keilmuan Biologi Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung,
Jalan Ganesha 10 Bandung 40132

Abstrak

Saat ini, kebutuhan manusia akan antioksidan berkembang pesat. Hal ini dikarenakan masyarakat mulai peduli akan adanya radikal bebas yang dapat meningkat di dalam tubuh diakibatkan oleh beberapa hal, antara lain paparan lingkungan, radiasi zat-zat kimia, racun, dan gaya hidup yang tidak sehat. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah terbentuknya radikal bebas dan dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Berdasarkan beberapa penelitian, daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diketahui memiliki efek antioksidan. Selain itu, daun binahong juga telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat untuk mengobati berbagai penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa antioksidan dari daun binahong serta menentukan golongan senyawa antioksidan yang terkandung dalam daun binahong. Simplisia daun binahong diekstraksi dengan metode refluks menggunakan tiga pelarut berbeda dengan kepolaran meningkat, berturut-turut yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstrak diuji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serta diukur flavonoid total, fenol total, dan tanin total. Ekstrak etil asetat difraksinasi dengan menggunakan *chromatotron* dan fraksi-fraksi yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya menggunakan DPPH. Pemurnian dilakukan dengan metode KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-metanol (10:1). Isolat dikarakterisasi menggunakan penampak bercak spesifik, spektrofotometri UV-sinar tampak, dan spektrofotometri inframerah. Simplisia daun binahong mengandung flavonoid, steroid/triterpenoid, tanin, dan fenol, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung flavonoid dan steroid/triterpenoid. Aktivitas peredaman DPPH ekstrak etil asetat, n-heksana, dan etanol adalah 38,15%, 29,44%, dan 40,27% dengan flavonoid total secara berurutan sebesar 1,37%, 0,24%, dan 0,70%. Senyawa antioksidan P diisolasi dari ekstrak etil asetat. Senyawa antioksidan P diduga merupakan suatu senyawa flavonol aglikon dengan gugus OH pada posisi C-7 dan OH tersubstitusi pada C-3.

Kata kunci: antioksidan, daun binahong, *Anredera cordifolia*, ekstrak etil asetat, isolat P

Abstract

Nowadays, human's need of antioxidant is growing so fast. It is caused by the people awareness of the free radical that can be increased in the body because of many factors, such as environmental exposures, radiation of chemical substances, poison, and unhealthy life style. Antioxidant is a substance that can avoid the free radical formation and it can resist the oxidation reaction by binding with the free radical and other reactive molecules. In some researches, the binahong leaves (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) had antioxidant activity. Besides, the binahong leaves were used by the people to cure some diseases. The objective of this research was to isolate an antioxidant compound of binahong leaves. Crude drug of binahong leaves was extracted by reflux method using three different solvents with increasing polarity, which were n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The antioxidant activity was tested by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, the total content of flavonoids, fenols, and tannins of extract were also determined. The ethyl acetate extract was fractionated by chromatotron and the antioxidant activity of the fractions has to be tested by DPPH method. Purification was done by preparative TLC method using silica gel GF₂₅₄ as the stationery phase and chloroform – methanol (10:1) as the mobile phase. The isolate was characterized by specified spray reagent, UV-visible spectrophotometri, and infrared spectrophotometri method. Crude drug of binahong leaves contained flavonoids, steroid/triterpenoids, tannins, phenol, while the ethyl acetate extract contains flavonoids and steroid/triterpenoids. The DPPH reducing activity of ethyl acetate extract was 38.15%, total content of flavonoids was 1.37%. An antioxidant compound was isolated from ethyl acetate extract. Antioxidant compound P was aglycone flavonol that has OH in C-7 and substituted OH in C-3.

Keywords: antioxidant, binahong leaves, *Anredera cordifolia*, ethyl acetate extract, isolate P

Pendahuluan

Pada zaman sekarang ini, antioksidan merupakan salah satu senyawa penting yang banyak dicari oleh manusia. Hal ini dikarenakan semakin banyaknya paparan dari lingkungan yang dapat menyebabkan

peningkatan radikal bebas di dalam tubuh saat ini. Radikal bebas merupakan suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya dan bersifat reaktif (Winarsi 2011). Radikal bebas tersebut timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, polutan

*Penulis korespondensi, e-mail: irda@fa.itb.ac.id

lingkungan, radiasi zat-zat kimia, racun, dan makanan cepat saji serta makanan yang digoreng pada suhu tinggi. Jika jumlahnya berlebih, radikal bebas akan memicu efek patologis.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah terbentuknya radikal dan juga dapat menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan dapat berupa enzim seperti SOD, katalase, dan glutathion peroksidase, maupun non-enzim, misalnya vitamin E, vitamin C, vitamin A, karoten, flavonoid, albumin, bilirubin, seruloplasmin, dan lainnya (Winarsi 2011). Contoh penyakit yang dapat dipengaruhi oleh adanya antioksidan antara lain penyakit ginjal, jantung, kanker, dan lainnya.

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan tumbuhan yang telah digunakan secara luas oleh masyarakat Indonesia. Binahong memiliki efek antiinflamasi dan bisa mengurangi rasa nyeri pada luka bakar, antimikroba, penyembuhan luka bakar dengan cara mencegah infeksi dan mencegah meluasnya luka akibat toksik bakteri, meningkatkan daya tahan terhadap infeksi dan berfungsi dalam pemeliharaan membran mukosa, dan antioksidan (Rachmawati 2007).

Daun binahong diketahui mempunyai kandungan asam oleanolik. Asam oleanolik merupakan golongan triterpenoid yang merupakan antioksidan pada tanaman (Octavia 2009). Daun tanaman binahong juga mengandung saponin triterpenoid, flavonoid dan minyak atsiri (Rachmawati 2007).

Daun binahong merupakan alternatif sumber antioksidan yang dapat dikembangkan lebih lanjut. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi senyawa antioksidan dari daun binahong. Senyawa yang diisolasi tersebut dapat dijadikan *marker* bagi daun binahong.

Percobaan

Bahan

Serbuk simplisia daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), anhidrida asetat, amil alkohol, serbuk magnesium, kalium bromida, besi (III) klorida, natrium hidroksida, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, pereaksi Steasny, pereaksi Liebermann-Burchard, natrium asetat, pereaksi Folin-Ciocalteu, plat KLT GF₂₅₄ (pra lapis), silika gel GF₂₅₄, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

Alat

Seperangkat alat distilasi, seperangkat alat *chromatotron*, labu bundar, *rotavapor* (Buchi *Rotavapor* R-124, Buchi *Waterbath* B-480, Buchi *Rotavapor* R-125, dan Buchi *Waterbath* B-491), seperangkat alat refluks, lampu UV (Desaga Sarstedt Gruppe dan CAMAG), spektrofotometer UV-sinar tampak (Hewlett Packard 8435), spektrofotometer inframerah (Jasco FT-IR-4200 type A).

Prosedur

Pengumpulan, Determinasi, dan Pengolahan Tanaman Uji

Bahan berupa daun binahong dikumpulkan dari Babakan Ciparay, Kabupaten Bandung, Bandung Selatan pada bulan Desember 2011. Determinasi tanaman dilakukan di *Herbarium Bandungense*, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menyatakan tanaman uji adalah *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan dan penggilingan menjadi serbuk simplisia.

Karakterisasi Serbuk Simplisia

Karakterisasi serbuk simplisia yang dilakukan meliputi karakterisasi makroskopik dan mikroskopik, penetapan kadar air, susut pengeringan, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar abu total.

Penapisan Fitokimia Simplisia

Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan terhadap alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, dan steroid/triterpenoid.

Ekstraksi dan Pemantauan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode refluks menggunakan tiga pelarut berbeda berturut-turut adalah n-heksana, etil asetat, dan etanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotavapor*. Masing-masing ekstrak dipantau secara kromatografi lapis tipis (KLT). Penampak bercak yang digunakan adalah sinar UV λ 254 nm, sinar UV λ 366 nm, H₂SO₄ 10% dalam metanol, dan DPPH 0,2% dalam metanol.

Penetapan Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak dilakukan penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Masing-masing ekstrak direaksikan dengan larutan DPPH 50 μ g/mL dalam metanol (1:1), diinkubasi selama 30 menit, dan aktivitas peredaman DPPH diukur menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak.

Penetapan Fenol, Flavonoid, dan Tanin Total

Penetapan fenol, flavonoid, dan tanin total dilakukan sebagai data pendukung dalam pemilihan ekstrak yang akan dilanjutkan pada tahap fraksinasi. Pertama, pada masing-masing ekstrak dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui adanya fenol, flavonoid, dan tanin. Terhadap ekstrak yang memberikan hasil penapisan positif terhadap fenol, flavonoid, dan tanin dilakukan penetapan fenol, flavonoid, dan tanin total. Penetapan fenol total dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu, sedangkan penetapan flavonoid total dilakukan dengan metode Chang *et al.* (2002). Penetapan tanin dilakukan berdasarkan metode WHO.

Fraksinasi dan Pemantauan Fraksi

Ekstrak etil asetat difraksinasi dengan menggunakan *chromatotron* dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan elusi secara gradien menggunakan 8 kombinasi pelarut, yaitu n-heksana-etil asetat sebanyak 6 kombinasi dan kloroform-metanol sebanyak 2 kombinasi. Fraksi yang diperoleh dipantau secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan sinar UV λ 254 nm, UV λ 366 nm, penampak bercak H₂SO₄ 10% dalam metanol, dan DPPH 0,2% dalam metanol.

Pemurnian dan Uji Kemurnian

Fraksi yang terpilih kemudian dimurnikan dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLT) dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-metanol (10:1). Kemudian uji kemurnian dilakukan dengan kromatografi lapis tipis pengembangan tunggal dengan tiga pengembang berbeda, serta kromatografi lapis tipis dua dimensi. Penampak bercak yang digunakan adalah H₂SO₄ 10% dalam metanol.

Karakterisasi Isolat

Isolat dikarakterisasi secara kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak spesifik, spektrofotometri UV-sinar tampak, kromatografi kertas dua dimensi dan spektrofotometri inframerah.

Hasil dan Pembahasan

Hasil determinasi menunjukkan bahwa jenis tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Anredera cordifolia* (ten.) Steenis (L.) Penapisan fitokimia menunjukkan simplisia mengandung golongan flavonoid, fenol, tanin, dan steroid/ triterpenoid, seperti yang tertera pada Tabel 1.

Pemeriksaan makroskopik daun binahong menunjukkan bahwa daun binahong ini memiliki warna hijau, berbentuk jantung (cordata), helaian daun tipis lemas, ujungnya runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), bertepi rata, dan permukaannya licin.

Karakterisasi simplisia menunjukkan kadar air 8,29% (v/b), kadar sari larut air 5,65% (b/b), kadar sari larut etanol 3,47% (b/b), susut pengeringan 13,05% (b/b), kadar abu total 25,04 % (b/b).

Bobot jenis untuk masing-masing ekstrak adalah 1,17 gram/mL untuk ekstrak n-heksana, 0,88 gram/mL untuk ekstrak etil asetat, dan 1,29 gram/mL untuk ekstrak etanol.

Dari hasil pemantauan ekstrak, dapat dilihat bahwa kromatogram masing-masing ekstrak yang disemprot dengan DPPH 0,2% memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga ekstrak, yaitu ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol mengandung senyawa antioksidan.

Hasil uji kuantitatif aktivitas peredaman DPPH masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa aktivitas peredaman DPPH ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut $29,44 \pm 2,98$ %, $38,15 \pm 4,56$ %, $40,27 \pm 1,35$ %.

Dari kurva kalibrasi asam galat diperoleh persamaan regresi $y = 0,005093x - 0,0158$ dengan koefisien relasi (R) 0,997. Untuk mengetahui kadar fenol total, absorbansi masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan regresi di atas. Hasil penetapan fenol total menunjukkan bahwa kadar fenol total ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut $0,54 \pm 0,06$ % dan $8,42 \pm 0,49$ %.

Dari kurva kalibrasi kuersetin diperoleh persamaan regresi $y = 6,08.10^{-3} x - 0,0478$ dengan koefisien korelasi (R) sebesar 0,999. Untuk mengetahui kadar flavonoid total, absorbansi masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan regresi di atas. Hasil penetapan flavonoid total menunjukkan bahwa flavonoid total ekstrak ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut $0,24 \pm 0,03$ %, $1,37 \pm 0,04$ % dan $0,70 \pm 0,02$ %.

Dari hasil uji aktivitas antioksidan, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan paling besar bila dibandingkan dengan ekstrak n-heksana dan etil asetat, yaitu dengan aktivitas peredaman 40,27%, kemudian diikuti oleh ekstrak etil asetat dan n-heksana.

Dari data yang diperoleh, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksana. Demikian pula halnya dengan kadar fenol total. Namun pada ekstrak etil asetat, kandungan flavonoidnya memiliki nilai paling tinggi jika dibandingkan dengan kedua ekstrak lainnya.

Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Binahong *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis

Ekstrak	Fenol	Alkaloid	Flavonoid	Steroid/triterpenoid	Tanin
n-Heksana	-	-	+	+	-
Etil asetat	-	-	+	+	-
Etanol	+	-	+	+	+

Tabel 2. Data Aktivitas Peredaman DPPH, Penetapan Kadar Fenol, Flavonoid, dan Tanin Total pada Ekstrak *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis

Parameter	Hasil		
	n-Heksana (%)	Etil asetat (%)	Etanol (%)
Aktivitas peredaman DPPH	29,44	38,15	40,27
Fenol total	-	0,54	8,42
Flavonoid total	0,24	1,37	0,70
Tanin total	-	-	0,45

Pola kromatogram ekstrak etanol menunjukkan adanya aktivitas antioksidan setelah penyemprotan DPPH 0,2%, namun pemisahannya tidak terlalu baik dengan berbagai macam pengembang. Oleh karena itu, ekstrak yang dipilih untuk dilanjutkan ke tahap fraksinasi adalah ekstrak etil asetat. Selain itu, perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol yang tidak terlalu jauh juga menjadi faktor pemilihan ekstrak etil asetat sebagai ekstrak yang akan dilanjutkan ke tahap fraksinasi.

Dari kromatogram yang telah disemprot dengan DPPH 0,2% dalam metanol, diketahui bahwa efek antioksidan muncul pada fraksi ke-10 dan 20. Oleh karena itu, dilakukan pemantauan lebih lanjut pada fraksi-fraksi yang berada di sekitar fraksi 10 dan 20 dengan interval pemantauan yang lebih kecil. Dalam hal ini, pemantauan dilakukan terhadap fraksi ke-8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, dan 24.

Dari pola kromatogram yang telah disemprot dengan DPPH 0,2%, diperoleh hasil bahwa fraksi ke-8 hingga 24 seluruhnya mengandung senyawa antioksidan. Jika diamati lebih lanjut, diketahui bahwa pada fraksi ke-8 dan 10, terdapat 2 bercak yang menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, sedangkan pada fraksi ke-12 hingga 24 hanya terdapat 1 bercak yang menunjukkan aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, fraksi yang dilanjutkan ke tahap pemurnian yaitu fraksi 12-24.

Ternyata pita G belum murni, maka dilakukan pemurnian kembali secara KLT preparatif dengan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-metanol (10:1). Bagian pinggir pelat disemprot dengan DPPH. Terdapat 3 pita yang mengandung senyawa antioksidan, yaitu O, P dan Q. Pita P dikerok dan diekstraksi dengan metanol.

Isolat yang diperoleh kemudian dikarakterisasi dengan penampak bercak spesifik, yaitu FeCl₃, AlCl₃, dan sitroborat. Dari hasil pemantauan menggunakan penampak bercak spesifik, diketahui bahwa senyawa yang diperoleh merupakan senyawa flavonoid.

Selain itu, isolat ini dikarakterisasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-sinar tampak. Hasil karakterisasi dengan spektrofotometri UV-sinar tampak menunjukkan bahwa isolat P memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm dan 367 nm, yang menunjukkan pola spektrum UV-sinar tampak golongan flavonoid (Markham 1988). Pita I isolat P pada 367 nm menunjukkan bahwa isolat P adalah golongan flavonol. Dari hasil uji kemurnian secara KLT, dapat dilihat bahwa isolat P bukan senyawa yang sangat polar. Oleh karena itu, diduga bahwa isolat P adalah flavonol aglikon. Hal ini diperkuat dengan hasil kromatografi kertas dua dimensi dengan pengembang I butanol-asam asetat-air (4:1:5) dan pengembang II asam asetat 15 %, serta penampak bercak sitroborat, yang menunjukkan bahwa bercak berada pada posisi kiri bawah, yaitu daerah flavonol aglikon (Markham 1988). Senyawa flavonol aglikon dengan gugus OH bebas pada C-3 akan memberikan fluoresensi kuning di bawah sinar UV λ 366 nm. Isolat P memberikan fluoresensi biru di bawah sinar UV λ 366 nm. Hal ini menunjukkan bahwa isolat P mempunyai OH pada C-7, OH pada posisi C-3 bukan merupakan OH bebas, tetapi tersubstitusi

Dari hasil karakterisasi menggunakan spektrofotometri inframerah, diketahui bahwa isolat ini menghasilkan puncak pada bilangan gelombang 3478 cm⁻¹ (OH), 2935 cm⁻¹ (CH₂), 1635 cm⁻¹ (C=O), dan

1388 cm^{-1} (C=C aromatik), yang merupakan gugus fungsi yang terdapat pada golongan flavonoid.

Berdasarkan data-data di atas, maka diduga bahwa isolat P adalah senyawa flavonol aglikon yang memiliki gugus OH pada posisi C-7 dan OH tersubstitusi pada C-3.

Kesimpulan

Isolat yang diperoleh dari ekstrak etil asetat daun binahong adalah senyawa antioksidan yang diduga merupakan senyawa flavonol aglikon yang memiliki gugus OH pada posisi C-7 dan OH tersubstitusi pada C-3.

Daftar Pustaka

Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC, 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, J. Food Drug Anal. 10(3): 178-182.

Markham KR, 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, Penerbit ITB, Bandung, 39, 52.

Octavia D R, 2009, Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat, dan Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), skripsi sarjana, Fakultas Farmasi - Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, 3-21.

Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N, 2006, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, Afr. J. Biotechnol. 5(11): 1142-1145.

Rachmawati S, 2007, Studi Makroskopi, dan Skrining Fitokimia Daun *Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis., Skripsi, Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya.

Winarsi H, 2011, Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 15-21, 79-82.

World Health Organization, 1998, Quality Control Methods for Medicinal Plant Material, WHO, Geneva, 28-33.