



Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Potensial Antioksidan dari Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Yadnya-Putra, A. A. G. R.^{1*}, P. O. Samirana¹, D. A. A. Andhini¹

¹Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana,
 Jalan Kampus Unud, Jimbaran, 80364

*Corresponding author e-mail: agungryp@unud.ac.id

Riwayat artikel: Dikirim: 30-09-2019; Diterima: 14-12-2019, Diterbitkan: 21-01-2020

ABSTRAK

Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) adalah salah satu tanaman yang diketahui bagian daunnya memiliki aktivitas farmakologi seperti antiinflamasi, antitukak lambung, antiluka bakar, antiluka eksisi, bahkan antioksidan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa golongan flavonoid dari daun binahong yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Isolasi dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu maserasi, fraksinasi, subfraksinasi menggunakan kromatografi kolom, pemurnian menggunakan KLT-preparatif, dan uji kemurnian isolat secara KLT dan penentuan titik leleh isolat. Potensi antioksidan isolat diuji melalui peredaman DPPH radikal menggunakan metode KLT-bioautografi. Isolat dikarakterisasi struktur kimianya menggunakan spektroskopi IR dan UV-Vis dengan pereaksi geser. Proses isolasi menghasilkan isolat yang mampu meredam DPPH radikal dengan metode KLT-bioautografi. Berdasarkan analisis spektroskopi IR, isolat memiliki gugus fungsi C=O, OH, C-H alifatik, C-H aromatik, dan C-O alkohol. Data spektroskopi UV-Vis memperlihatkan adanya serapan pita I pada panjang gelombang 330nm dan pita II pada 266nm. Berdasarkan data spektroskopi tersebut diduga isolat yang berpotensi sebagai antioksidan dalam daun *A. scandens* (L.) Moq. memiliki struktur kimia parsial 4',7 dihidroksi 3-O-R flavonol.

Kata kunci: Binahong, *Anredera scandens* (L.) Moq., antioksidan, flavonoid.

ABSTRACT

Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) leaves are one of the plants that are known to have pharmacological activities such as anti-inflammatory, anti-ulcer, anti-burn, anti-wound excision, and antioxidant. This study aims to isolate and characterize flavonoid compound which have potential as antioxidants from binahong leaves. Isolation was carried out in several stages, namely maceration, fractionation, subfractionation using column chromatography, purification using preparative-TLC, and purity testing of isolate by TLC and melting point determination. The antioxidant potential of isolate was tested through reducing DPPH radicals using the TLC-bioatography method. Isolates were characterized for its chemical structure using IR spectroscopy and UV-Vis spectroscopy with shifting reagents. The isolation process produces isolate that are able to dampen radical DPPH by TLC-bioautography method. Based on IR spectroscopic analysis, isolate have functional groups such as C=O, OH, C-H aliphatic, C-H aromatic, and C-O alcohol. UV-Vis spectroscopy data showed the absorption of band I at wavelength 330nm and band II at 266nm. Based on those spectroscopic data, it was suspected that the isolate had the potential as an antioxidant in the leaves of *A. scandens* (L.) Moq. has a partial chemical structure of 4', 7 dihydroxy 3-O-R flavonol.

Keywords: Binahong, *Anredera scandens* (L.) Moq., antioxidant, flavonoid.

1. PENDAHULUAN

Daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) adalah salah satu tanaman yang secara empiris digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Tanaman yang tergolong famili Basellaceae ini memiliki berbagai khasiat secara empiris, diantaranya melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, mempercepat pemulihan kesehatan setelah operasi, mengobati

luka dalam, mengobati radang usus, menyembuhkan sariawan, mengatasi maag, mengobati keputihan, menurunkan asam urat, meringankan pembengkakan hati, dan meningkatkan daya tahan tubuh [1], [2]. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa daun *A. scandens* (L.) Moq. memiliki berbagai aktivitas farmakologi diantaranya sebagai antiinflamasi [3], antibakteri [4], antitukak lambung [5], [6], antiluka



eksisi [5], [7], hepatoprotektor dan antioksidan [8]. Ekstrak etanol daun *A. scandens* (L.) Moq. dilaporkan mengandung metabolit sekunder triterpenoid, saponin, polifenol dan tanin, serta flavonoid [9].

Senyawa flavonoid diduga mempengaruhi aktivitas farmakologi ekstrak etanol daun *A. scandens* (L.) Moq. yang ditunjukkan oleh mekanisme kerja berdasarkan kemampuan senyawa flavonoid untuk menimbulkan aktivitas biologis, salah satunya sebagai antioksidan. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan yaitu memiliki kemampuan menangkap radikal bebas (*Reactive Oxygen Species/ROS*) [10]. Aktivitas antioksidan dari golongan flavonoid ini juga diduga bertanggung jawab terhadap kemampuan ekstrak daun *A. scandens* (L.) Moq. ini sebagai peredam CCl_3 -radikal dalam kaitannya sebagai agen hepatoprotektor [8]. Penelitian oleh Subratha (2016) dilaporkan bahwa pada profil kromatogram ekstrak daun *A. scandens* (L.) Moq. terdeteksi adanya senyawa flavonoid yang diduga termasuk golongan flavon dan flavanon yang tidak mengandung 5-OH (dihydroflavonol). Namun struktur kimia dari senyawa flavonoid tersebut belum diketahui secara jelas. Melihat senyawa flavonoid potensial antioksidan yang diperkirakan sebagai senyawa aktif dalam ekstrak etanol daun *A. scandens* (L.) Moq. tersebut belum diketahui struktur senyawanya, maka penting dilakukan isolasi dan menguji potensi aktivitas antioksidannya serta karakterisasi terhadap senyawa tersebut.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang akan digunakan yaitu serbuk simplisia daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.), etanol 70% (Bratachem®) dan akuades (PT. Rusdi Medika) berderajat teknis. Asam oksalat P (Merck®), asam borat P (Merck®), $FeCl_3$ (Merck®), aseton (Merck®), eter (Merck®), *n*-heksan (Merck®), etil asetat (Merck®), asam formiat (Merck®), asam asetat (Merck®), kloroform (Merck®), metanol (Merck®), NaOH (Merck®), HCl 37% (Merck®), NH_3 (Merck®) dan H_2SO_4 (Merck®), aluminium klorida (Merck®), rutin (Merck®), natrium asetat (Merck®), serbuk silika gel (Merck®), dan *2,2-difenil-1-pikribidrazil* (DPPH) (Merck®) yang masing-masing berderajat pro

analisis. Alat yang digunakan adalah toples kaca, sudip, cawan porselen, sendok tanduk, seperangkat alat gelas (IWAKI Pyrex), timbangan analitik (AND®), kertas saring, pinset, spatula, *vacuum rotary evaporator* (Eyela®), pipet kapiler, bejana pengembang (CAMAG *Twin Chamber*), tabung reaksi, corong pisah, pipet ukur, *bulb filler*, botol vial, statif, kuvet, lampu UV (CAMAG), *Buchi Melting Point*, Spektrofotometer UV (GENESIS 10v), mortar, alat kempa, dan Spektroskopi IR (FTIR PRESTIGE-21).

Metode

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Anredera scandens* (L.) Moq.

Serbuk simplisia daun *A. scandens* (L.) Moq. sebanyak 500 g, dimaserasi dalam 5 L etanol 70% selama ± 24 jam dengan dilakukan pengadukan sesekali. Residu hasil maserasi pertama dimaserasi kembali hingga 2 kali pengulangan. Maserat ditampung dan diuapkan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* pada suhu $50^\circ C$, hingga diperoleh ekstrak kental. Persen rendemen ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung dengan persamaan (1).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak (g)}}{\text{Bobol simplisia (g)}} \times 100\% \dots\dots (1)$$

Fraksinasi Ekstrak Daun *A. scandens* (L.) Moq.

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Sebanyak 20 gram ekstrak daun *A. scandens* (L.) Moq. dilarutkan dalam akuades hangat dengan perbandingan 1:10 kemudian ditambahkan dan digojog dalam corong pisah dengan 3 bagian pelarut *n*-heksana. Fraksi *n*-heksan dikeluarkan kemudian fraksi air diambil. Fraksi air difraksinasi kembali dengan menambahkan pelarut kloroform dengan perbandingan 1:1, fraksi kloroform dikeluarkan dari corong pisah kemudian fraksi air diambil. Fraksi air kembali difraksinasi menggunakan etil asetat sama banyak (1:1). Fraksi air disisih dan fraksi etil asetat diambil. Fraksi fraksi yang diperoleh lalu dipekatkan menggunakan alat *vacuum rotary evaporator* pada suhu $50^\circ C$, hingga diperoleh fraksi dalam bentuk kental. Fraksi kental kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu $50^\circ C$



Identifikasi Flavonoid dan Potensi Antioksidan Fraksi

Identifikasi flavonoid dan potensi antioksidan pada fraksi-fraksi ekstrak daun *A. scandens* (L.) Moq. dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis. Sebanyak 20 mg setiap fraksi yang diperoleh pada tahap sebelumnya dilarutkan dalam 10 mL metanol lalu ditotolkan sebanyak 10 µL pada fase diam yaitu plat KLT silika gel GF₂₅₄ (disiapkan 3 plat berbeda). Plat kemudian dielusi dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak yaitu campuran pelarut etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 : 11 : 11 : 26) v/v [12]. Setelah terelusi, plat dikeluarkan dari bejana pengembang dan dikeringkan. Plat KLT yang telah kering diamati di bawah sinar UV 366 nm sesudah direaksikan dengan penampak bercak uap ammonia dan pereaksi sitroborat untuk mengetahui keberadaan senyawa flavonoid. Plat kedua disemprot dengan penampak bercak vanilin-asam sulfat untuk mengetahui keberadaan senyawa lain yang tidak diinginkan dalam fraksi. Untuk mengetahui keberadaan senyawa potensial antioksidan, plat ketiga disemprot dengan larutan DPPH [13], [14]. Pada plat juga ditotolkan senyawa standar rutin sebagai pembanding.

Subfraksinasi dengan Kromatografi Kolom Gravitasi

Fase diam kromatografi kolom disiapkan dengan mensuspensikan serbuk silika gel dengan pelarut *n*-heksana, kemudian suspensi dimasukkan ke dalam kolom berdiameter dalam 2,5 cm yang ujungnya telah diberikan *glass wool* hingga ketinggian 15 cm. Fraksi yang teridentifikasi mengandung flavonoid yang aktif sebagai antioksidan ditimbang sebanyak 2 gram. Kemudian dilarutkan dalam etil asetat dan ditambahkan silika gel dengan perbandingan 1:1 lalu diuapkan hingga diperoleh massa serbuk. Massa kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang telah disiapkan sebelumnya. Proses elusi dilakukan dengan 100 mL fase gerak tiap elusi dengan variasi polaritas yang ditingkatkan secara bertahap yaitu pelarut *n*-heksan, *n*-heksan - etil asetat (4:1 v/v sampai 1:4v/v), etil asetat, etil asetat - metanol (4:1v/v sampai 1:4v/v), dan metanol. Eluat ditampung masing-masing sebanyak 50mL sehingga diperoleh 20 subfraksi. Subfraksi-subfraksi ini kemudian dipisahkan.

Identifikasi Flavonoid dan Potensi Antioksidan Subfraksi

Metode flavonoid dan potensi antioksidan subfraksi-subfraksi hasil kromatografi kolom dilakukan dengan metode yang sama seperti pada metode identifikasi flavonoid dan potensi antioksidan fraksi-fraksi ekstrak daun *A. scandens* (L.) Moq. pada tahapan sebelumnya yaitu menggunakan metode kromatografi lapis tipis namun hanya menggunakan penampak bercak sitroborat diamati dibawah sinar UV 366nm. Subfraksi-subfraksi yang menunjukkan pola kromatogram yang sama digabungkan sebagai satu subfraksi untuk selanjutnya dimurnikan.

Pemurnian Subfraksi

Subfraksi yang teridentifikasi mengandung flavonoid yang aktif sebagai antioksidan diaplikasikan pada plat KLT silika gel GF₂₅₄ sebagai pita. Plat kemudian dielusi dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak yaitu campuran pelarut etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 : 11 : 11 : 26) v/v [12]. Setelah terelusi, plat dikeluarkan dari bejana pengembang dan dikeringkan. Plat KLT yang telah kering diamati di bawah sinar UV 366 nm. Pita yang diduga merupakan senyawa flavonoid kemudian dikerok lalu diekstraksi dengan 3 mL pelarut metanol dengan tiga kali pengulangan. Pelarut kemudian diuapkan pada suhu ruangan hingga terbentuk endapan kristal isolat.

Uji Kemurnian Isolat

Kemurnian isolat yang diperoleh diuji dengan dua metode yaitu menggunakan metode KLT multi eluen dan penentuan titik didih.

- KLT Multi Eluen : Isolat dilarutkan lalu ditotolkan pada tiga plat KLT silika gel GF₂₅₄. Tiap tiap plat dielusi dengan fase gerak yang berbeda polaritasnya yaitu fase gerak 1 (kloroform : metanol : asam asetat glasial (10 : 50 : 0,2) v/v), fase gerak 2 (kloroform : metanol : asam asetat glasial (70 : 3 : 0,2) v/v), dan fase gerak 3 (kloroform : metanol : asam asetat glasial (7 : 60 : 0,2) v/v). Senyawa dikatakan murni apabila hanya terdapat 1 spot pada masing-masing kromatogram.
- Penentuan titik leleh dilakukan dengan alat *Buchi Melting Point*. Isolat dimasukkan ke dalam pipa kapiler, selanjutnya dimasukkan ke dalam alat pengukur titik leleh. Suhu pada saat isolat



mulai meleleh hingga meleleh secara keseluruhan dicatat sebagai jarak leleh. Isolat dikatakan murni apabila memiliki jarak titik leleh yang sempit ($\leq 2^\circ\text{C}$).

Uji Potensi Antioksidan Isolat Secara KLT-Bioautografi

Isolat dilarutkan lalu ditotolkan pada plat KLT silika gel GF₂₅₄. Plat kemudian dielus dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan fase gerak yaitu campuran pelarut etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100 : 11 : 11 : 26) v/v [12]. Setelah terelus, plat dikeluarkan dari bejana pengembang dan dikeringkan. Setelah kering plat kemudian dicelupkan dalam larutan DPPH radikal selama 1 detik. Isolat dikatakan berpotensi sebagai antioksidan apabila warna DPPH radikal pada plat berubah warna dari ungu menjadi kekuningan.

Karakterisasi Isolat

Karakterisasi isolat dilakukan untuk menentukan struktur kimia isolat yang diperoleh. Karakterisasi dilakukan dengan dua metode yaitu menggunakan spektroskopi IR dan spektroskopi UV-Vis dengan pereaksi geser.

a. Karakterisasi Isolat dengan Spektroskopi IR

Isolat digerus bersama KBr hingga homogen, kemudian dikempa sehingga diperoleh pelet KBr dan diperiksa spektrofotometer IR (FTIR PRESTIGE-21). Hasil yang diperoleh berupa pita adsorpsi gugus – gugus fungsional yang ada diamati dengan melihat bilangan gelombang pada spektrum IR.

b. Karakterisasi Isolat dengan Spektroskopi UV-Vis dengan Pereaksi Geser

Karakterisasi dilakukan menurut metode yang tertera pada Markham (1988). Isolat sebanyak 15mg dilarutkan dalam 6mL metanol lalu dimasukkan dalam kuvet untuk melihat spektrum serapannya pada rentang panjang gelombang 200nm hingga 400nm. Pola oksigenasi pada isolat dikarakterisasi menggunakan pereaksi geser seperti NaOH, AlCl₃, HCl, NaOAc dan H₃BO₃. Spektrum-spektrum yang diperoleh kemudian diinterpretasikan sesuai pustaka.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *A. scandens* (L.) Moq.

Daun *A. scandens* (L.) Moq. diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Setelah dipekatkan dan pelarut diuapkan diperoleh ekstrak kental berwarna kehijauan dengan nilai persen rendemen sebesar 15,55% b/b.

Fraksinasi Ekstrak Daun *A. scandens* (L.) Moq.

Hasil fraksinasi ekstrak etanol daun *A. scandens* (L.) Moq. dengan ekstraksi cair – cair menghasilkan beberapa rendemen fraksi terdiri dari fraksi n-heksan sebesar 11,62% (2,32 gram), fraksi kloroform sebesar 42,03% (8,40 gram), fraksi etil asetat diperoleh rendemen 26,10% (5,22 gram), dan fraksi air diperoleh rendemen sebesar 20,11% (4,02 gram). Jumlah fraksinasi yang diperoleh adalah 19,96 gram, sehingga terdapat kehilangan sebesar 0,04 gram (0,20%) ekstrak dalam proses ekstraksi cair – cair tersebut. Pada penelitian ini diperoleh rendemen fraksi kloroform dan etil asetat lebih banyak dibandingkan fraksi n-heksan dan air, diduga karena senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun *A. scandens* (L.) Moq. memiliki sifat cenderung semi polar sehingga mudah terekstraksi ke dalam pelarut kloroform dan etil asetat.

Identifikasi Flavonoid dan Potensi Antioksidan Fraksi

Kromatogram hasil identifikasi ditampilkan pada Gambar 1. Pada fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi kloroform, dan fraksi n-heksana terdapat bercak yang hampir sama pada R_f 0,71 yang diduga merupakan senyawa flavonoid. Dugaan ini muncul sebab bercak tersebut menunjukkan reaksi positif dengan penampak bercak uap amonia dan sitroborat yaitu berwarna lembayung gelap dengan pereaksi uap amonia (Gambar 1A) dan berflourosensi warna hijau atau biru dengan pereaksi sitroborat (Gambar 1B) [8], [16]. Bercak-bercak ini juga menunjukkan potensi sebagai antioksidan, sebab bercak pada R_f 0,71 ini mampu meredam DPPH radikal yang ditandai dengan perubahan warna DPPH radikal menjadi kuning berlatar belakang warna ungu (Gambar 1D), namun pada fraksi n-heksana intensitas peredamannya lebih rendah. Untuk menentukan fraksi yang akan dipisahkan lebih lanjut, maka



kromatogram juga direaksikan dengan pereaksi universal yaitu vanilin-asam sulfat. Dari kromatogram yang telah direaksikan dengan vanilin-asam sulfat (Gambar 1C) terlihat bahwa fraksi etil asetat dan kloroform memiliki jumlah bercak yang lebih sedikit dibandingkan fraksi air sehingga akan memudahkan proses pemurnian senyawa target. Namun pada fraksi kloroform tampak intensitas bercak dari senyawa target lebih rendah dibandingkan pada fraksi kloroform, maka dari itu fraksi yang akan dipisahkan lebih lanjut adalah fraksi etil asetat.

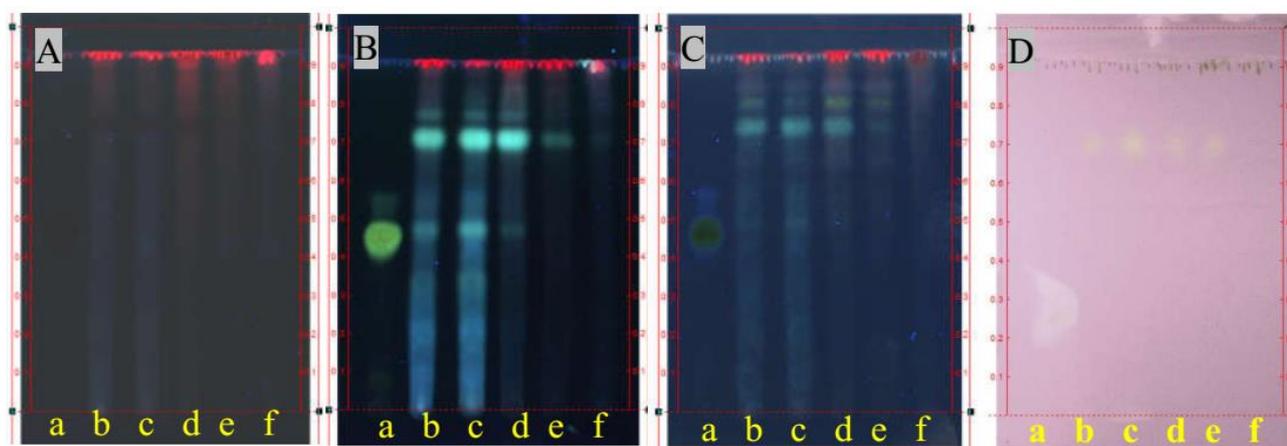
Subfraksinasi dengan Kromatografi Kolom Gravitasi

Pemisahan kembali (subfraksinasi) fraksi etil asetat daun *A. scandens* (L.) Moq. dilakukan dengan metode kromatografi kolom gravitasi. Proses elusi dilakukan secara bergradien, untuk mempersingkat waktu retensi dari senyawa – senyawa yang tertahan kuat pada fase diam dalam kolom. Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi ini menghasilkan 20 subfraksi (F1-F20) dengan warna yang berbeda dan dengan total berat sebesar 1,843 gram (persentase rendemen total sebesar 92,15%).

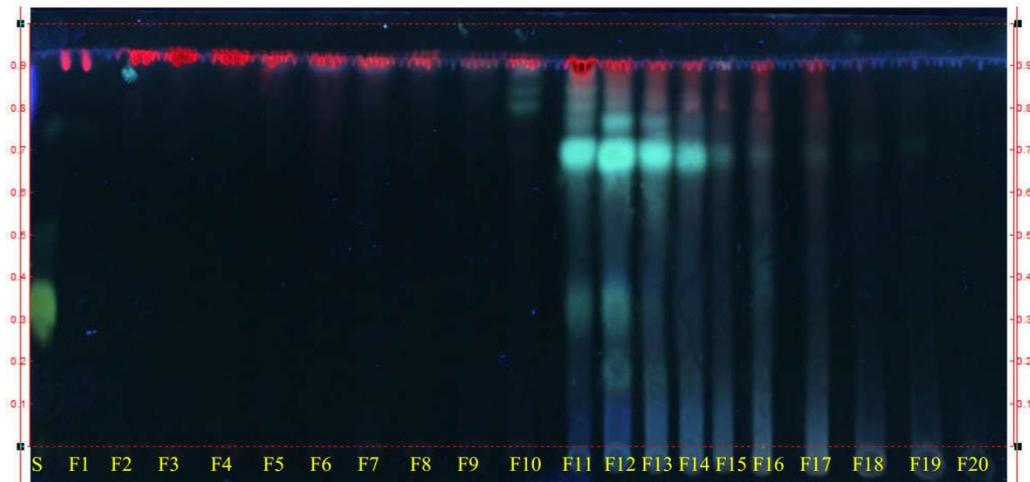
Perbedaan warna dari tiap tampungan subfraksi diduga karena perbedaan kandungan senyawa di dalamnya. Subfraksi-subfraksi ini selanjutnya dianalisis menggunakan KLT untuk menentukan subfraksi yang akan dimurnikan lebih lanjut.

Identifikasi Flavonoid dan Potensi Antioksidan Subfraksi

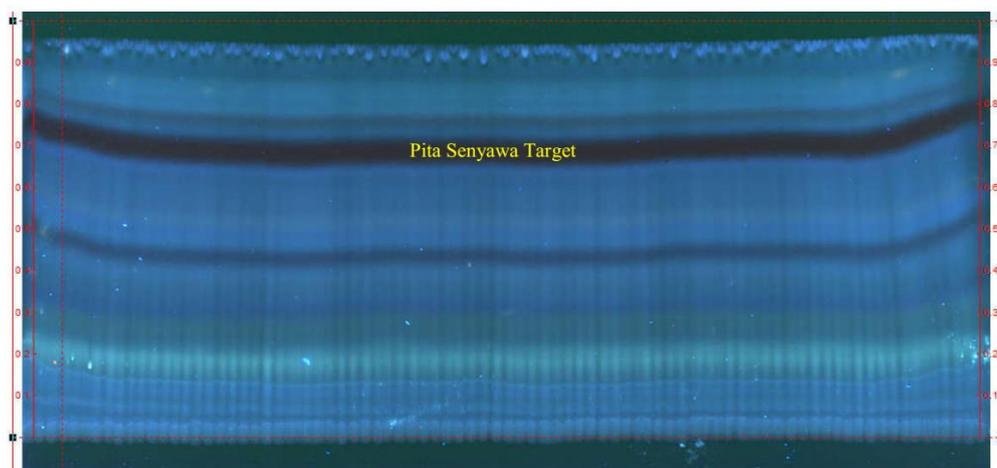
Hasil pengamatan terhadap kromatogram yang telah direaksikan dengan penampak bercak sitroborat (Gambar 2), dapat diketahui bahwa senyawa target yang diduga merupakan senyawa golongan flavonoid (R_f 0,71) terdapat pada subfraksi F11, F12, F13, F14, dan F15. Subfraksi-subfraksi ini menunjukkan adanya bercak berwarna kuning kebiruan di bawah sinar UV 366nm setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat. Subfraksi F13, F14 dan F15 memiliki jumlah bercak yang relatif lebih sedikit dibandingkan dengan F11 dan F12 sehingga dapat dikatakan subfraksi ini lebih sedikit mengandung pengotor sehingga akan lebih mudah dimurnikan. Selanjutnya subfraksi F13, F14, dan F15 digabungkan menjadi 1 subfraksi untuk dilakukan proses pemurnian.



Gambar 1. Kromatogram Fraksi Ekstrak Etanol Daun *A. scandens* (L.) Moq. Dibawah Sinar UV 366nm Setelah Disemprot Penampak Bercak (A) Uap Amonia; (B) Sitroborat; (C) Vanilin-Asam sulfat; (D) DPPH. (a = Standar Rutin; b = Ekstrak Etanol; c = Fraksi Air; d = Fraksi Etil Asetat; e = Fraksi Kloroform; f = Fraksi n-Heksan)



Gambar 2. Kromatogram Hasil Subfraksinasi Fraksi Etil Asetat Daun *A. scandens* (L). Moq. setelah Disemprot Pereaksi Sitroborat Dibawah Sinar UV 366nm. (S = Standar Rutin; F1-F20 = Subfraksi)



Gambar 3. Kromatogram KLT Preparatif Gabungan Subfraksi F13, F14, dan F15 Diamati Dibawah Sinar UV 366nm

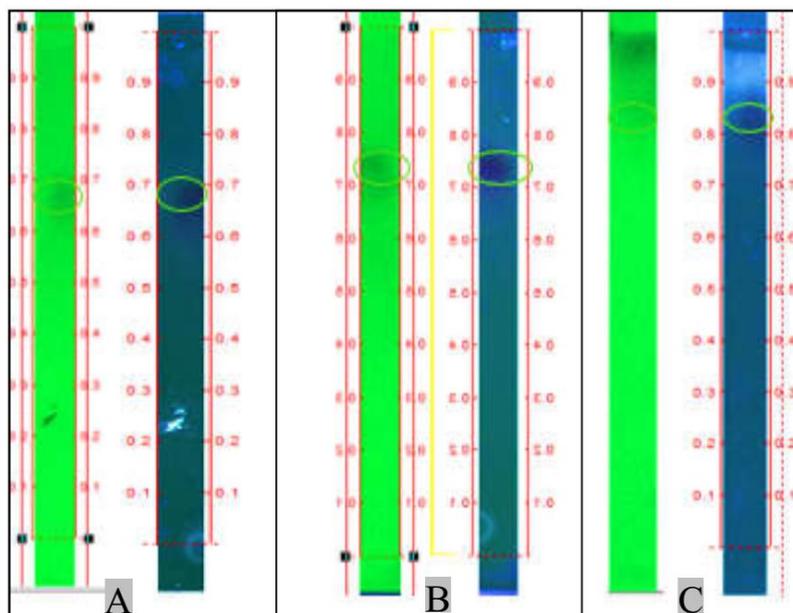
Pemurnian Subfraksi

Pemurnian subfraksi dilakukan dengan metode KLT preparatif dengan fase diam berupa lempeng KLT silika gel 60 GF 254, dan fase gerak merupakan campuran pelarut etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:26 v/v) [12]. Kromatogram ditampilkan pada Gambar 3. Pada kromatogram masih terdapat beberapa pita senyawa lain, namun pita dari senyawa target lebih dominan daripada pita lainnya. Pita senyawa target ini selanjutnya dikerok dan diekstraksi. Dari proses

pemurnian subfraksi ini diperoleh isolat sebanyak 45mg.

Uji Kemurnian Isolat

Hasil uji kemurnian dengan KLT multi eluen menunjukkan bahwa isolat tetap menghasilkan bercak tunggal seperti terlihat pada Gambar 4. Pengujian kemurnian dengan menggunakan parameter titik lebur didapatkan hasil isolat melebur 113 - 117°C. Suatu isolat disebut murni bila memiliki jarak leleh yang sempit ($\leq 2^\circ\text{C}$) [17].



Gambar 4. Kromatogram KLT Multi Eluen (A : fase gerak kloroform : metanol : asam asetat (10 : 50 : 0,2 v/v); B : fase gerak kloroform : metanol : asam asetat (70 : 3 : 0,2 v/v); C : fase gerak kloroform : metanol : asam asetat (7 : 60 : 0,2 v/v).

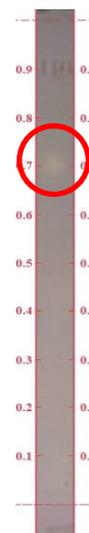
Uji Potensi Antioksidan Isolat Secara KLT-Bioautografi

Isolat dari daun *A. scandens* (L). Moq. yang telah diperoleh selanjutnya diuji potensi antioksidannya. Uji potensi dilakukan dengan metode KLT-bioautografi menggunakan fase diam berupa lempeng KLT silika gel 60 GF 254 dan fase gerak campuran pelarut etil asetat : asam formiat : asam asetat : air (100:11:11:26) [12]. Kromatogram kemudian dicelupkan kedalam larutan DPPH. Kromatogram ditunjukkan pada Gambar 5. Dari kromatogram terlihat isolat mampu meredam DPPH radikal yang ditandai dengan perubahan warna DPPH radikal menjadi kuning (dilingkari merah) berlatar belakang warna ungu. Ini menunjukkan bahwa isolat berpotensi sebagai antioksidan.

Karakterisasi Isolat

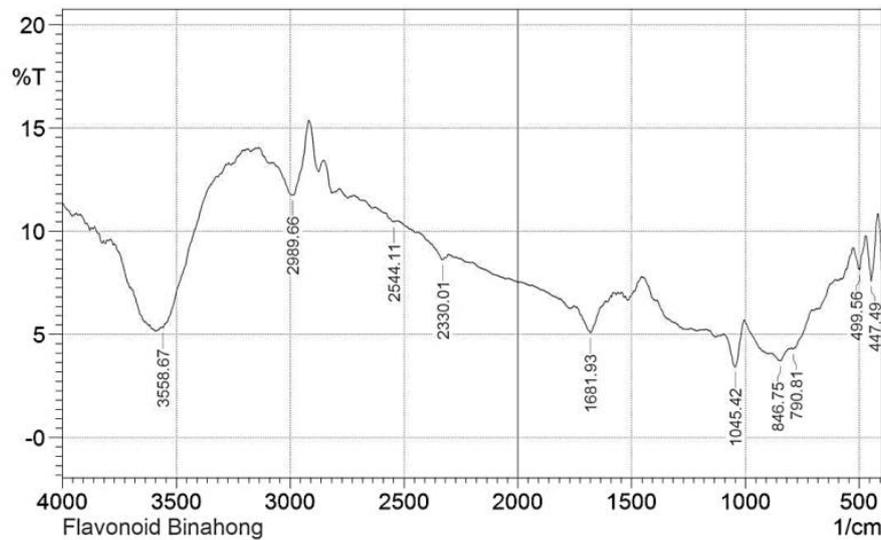
a. Karakterisasi Isolat dengan Spektroskopi IR

Hasil analisis menggunakan spektroskopi inframerah diperoleh data spektrum seperti pada gambar 6. Pada spektrum dapat diketahui bahwa isolat mengandung beberapa gugus fungsi seperti gugus C-H aromatik ditandai dengan adanya



Gambar 5. Kromatogram Isolat Daun *A. scandens* (L). Moq. di bawah Sinar Tampak Setelah Dichelup Dalam Larutan DPPH.

serapan tajam pada daerah bilangan gelombang $846,75\text{ cm}^{-1}$ dan $790,81\text{ cm}^{-1}$. Selain itu, terdapat gugus =C-H (bilangan gelombang $3263,56\text{ cm}^{-1}$). Adanya gugus karbonil ditunjukkan dengan penampilan yang tajam terdapat pada daerah bilangan gelombang $1681,93\text{ cm}^{-1}$. Gugus -OH



Gambar 6. Spektrum Inframerah Isolat Daun *A. scandens* (L.) Moq.

aromatik ditandai dengan serapan pada bilangan gelombang $3558,67\text{ cm}^{-1}$. Muncul pula serapan pada daerah bilangan gelombang $1045,42\text{ cm}^{-1}$ untuk gugus C-O alkohol, serta dugaan pada struktur isolat juga terdapat gugus C-H alifatik (bilangan gelombang $2989,66\text{ cm}^{-1}$ dan $2875,86\text{ cm}^{-1}$).

b. Karakterisasi Isolat dengan Spektroskopi UV-Vis dengan Pereaksi Geser

Dalam pelarut metanol, spektrum isolat menunjukkan adanya dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang 330 nm (pita I) dan pada panjang gelombang 266 nm (pita II). Pereaksi geser NaOH menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik pada pita I sebesar 66 nm tanpa adanya penurunan intensitas, yang dapat diinterpretasikan adanya gugus hidroksil pada posisi 4' pada struktur dasar flavonoid. Penambahan AlCl_3 dan penambahan pereaksi AlCl_3/HCl tidak menghasilkan pergeseran spektrum yang berarti pada pita I yaitu hanya terjadi pergeseran sebesar 6 nm . Pereaksi geser NaOAc menimbulkan pergeseran batokromik pada pita II sebesar 12 nm , yang dapat diinterpretasikan sebagai adanya gugus hidroksil pada posisi 7 pada struktur dasar flavonoid. Pada penggunaan pereaksi geser NaOAc bersama H_3BO_3 tidak menghasilkan pergeseran serapan yang berarti, baik pada pita I maupun pita II.

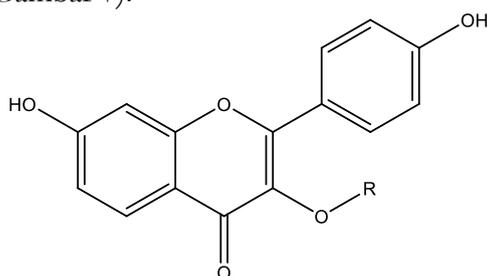
Dalam penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap senyawa flavonoid untuk

memperoleh informasi struktur kimianya secara lebih jelas. Dalam penelitian ini, proses isolasi dipandu dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan penampak bercak uap ammonia dan sitroborat untuk menghantarkan kepada senyawa golongan flavonoid. Selain itu, proses isolasi juga dipandu dengan skrining aktivitas potensi antioksidan menggunakan KLT-bioautografi DPPH untuk memilih senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dipilih sebagai salah satu pemandu dalam proses isolasi ini, sebab diduga mekanisme dari ekstrak daun binahong dalam menimbulkan aktivitas farmakologinya adalah melalui mekanisme penangkapan radikal bebas.

Proses isolasi menghasilkan isolat sebanyak 45 mg yang telah dapat dikatakan murni dan memiliki potensi sebagai antioksidan. Hasil karakterisasi terhadap isolat menggunakan spektroskopi IR diperoleh informasi bahwa isolat memiliki beberapa gugus fungsi seperti fungsi O-H aromatik, C-H aromatik, C=O karbonil, C-H alifatik, =C-H, dan C-O alkohol. spektrum isolat pada rentang sinar UV menunjukkan adanya dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang 330 nm dan 266 nm . Adanya dua puncak serapan tersebut menunjukkan kekhasan pada spectrum senyawa golongan flavonoid terutama pada jenis flavon atau flavonol dengan gugus hidroksi pada posisi 3 yang tersubstitusi [15]. Penggunaan pereaksi geser sangat berguna untuk menentukan pola atau posisi gugus hidroksil pada struktur dasar flavonoid yang telah ditentukan. Dalam penelitian



ini diduga isolate flavonoid yang diperoleh memiliki gugus hidroksil pada posisi 4', dan 7. Berdasarkan hasil interpretasi data-data diatas diduga isolat yang diperoleh cenderung merupakan senyawa flavonoid yang tergolong dalam senyawa flavonol dengan gugus hidroksi pada posisi 3 yang tersubstitusi. Pendugaan adanya gugus pensubstitusi ini diperkuat dengan informasi adanya gugus-gugus C-H alifatik dan C-O alkohol pada spektrum inframerah. Sebagaimana diketahui, flavonoid merupakan senyawa karboaromatik, sehingga adanya gugus-gugus yang bersifat alifatik pada spektrum isolat diduga berasal dari gugus rantai samping (pensubstitusi) yang masih perlu dikaji lebih lanjut menggunakan metode spektroskopi lainnya. Sehingga, sementara dapat diduga isolat merupakan senyawa flavonol dengan gugus hidroksi pada posisi 3 yang tersubstitusi serta memiliki gugus hidroksi yang terikat pada posisi 7 dan 4' (Gambar 7).



Gambar 7. Dugaan Struktur Kimia Isolat Dari Daun *A. scandens* (L). Moq (4',7 dihidroksi 3-O-R flavonol).

4. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa salah satu senyawa yang terkandung dalam daun binahong (*A. scandens* (L). Moq) yang berpotensi sebagai antioksidan dan telah berhasil diisolasi adalah senyawa golongan flavonoid dengan rumus struktur kimia 4',7 dihidroksi 3-O-R flavonol.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Udayana dan Dirjen Kemenristekdikti yang telah membiayai penelitian ini melalui Penelitian Unggulan Program Studi tahun 2018, serta semua pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] F. Manoi, "Binahong sebagai Obat," *War. Penelit. dan Pengemb. Tanam. Ind.*, vol. 15, no. 1, pp. 3–4, 2009.
- [2] Jaerony, *Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Penerbit Swadaya, 2008.
- [3] Y. W. Feybriyanti, "Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak N-Heksan, Kloroform, dan Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) pada Tikus yang Diinduksi Karagenan 1%," (Skripsi) Denpasar: Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana., 2011.
- [4] L. K. Wardhani and N. Sulistyani, "Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis," *J. Ilm. Kefarmasian*, vol. 2, no. 1, pp. 1–16, 2012.
- [5] P. O. Samirana, D. A. Swastini, I. D. G. P. Y. Subratha, and K. A. Ariadi, "Uji Aktivitas Penyembuhan Luka Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) pada Tikus Jantan Galur Wistar," *J. Farm. Udayana*, vol. 5, no. 2, pp. 19–23, 2016.
- [6] D. A. Swastini, P. O. Samirana, N. K. Warditiani, L. Angga, and S. Kusuma, "Anti-Gastric Ulcer Mechanism of *Anredera scandens* (L.) Moq Leaves Extract," *J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 2833–2837, 2019.
- [7] N. P. Puri, "Profil Kandungan Kimia dan Uji Aktivitas Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) dalam Penyembuhan Luka Eksisi," (Skripsi), Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, 2017.
- [8] L. P. D. Hariyanti, A. A. N. Wisnu-Wardhana, N. K. S. Indriyani, and I. A. P. Y. Putri, "Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap Histopatologi Hati Mencit Jantan Galur BALB/C yang Diinduksi dengan Karbon Tertraklorida," *J. Farm. Udayana*, vol. 6, no. 1, pp. 39–42, 2017.



- [9] P. O. Samirana, D. A. Swastini, I. P. R. Ardinata, and I. P. S. D. Suarka, "Penentuan Profil Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)," *J. Farm. Udayana*, vol. 6, no. 1, pp. 23–33, 2017.
- [10] D. Procházková, I. Boušová, and N. Wilhelmová, "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 4, pp. 513–523, Jun. 2011.
- [11] I. D. G. P. Y. Subratha, "Profil Kromatografi Kandungan Fitokimia dan Aktivitas Epitelisasi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) Pada Penyembuhan Luka Eksisi," (Skripsi) Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, 2016.
- [12] E. Reich and A. Blatter, "Modern TLC A Key Technique of Identification and Quality Control of Botanical and Dietary Supplements," *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, vol. 18, no. 101, pp. 16–17, 2004.
- [13] S. Dewanjee, M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra, and T. K. Dua, "Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry," *J. Pharm. Anal.*, vol. 5, no. 2, pp. 75–84, 2015.
- [14] S. Sharif, A. Kitaz, and R. Al-Kayali, "TLC screening and evaluation of antioxidant, antibacterial activity of *Onopordon macrocephalum* by bioautography method," *Iran. J. Pharm. Sci.*, vol. 12, no. 2, pp. 1–8, 2016.
- [15] K. R. Markham, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung, 1988.
- [16] J. B. Harborne, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terjemahan: Kosasih Padmawinata, Soediro Iwang*. Bandung: Institut Teknologi Bandung, 1987.
- [17] Rahmi, N. Herawati, and I. Dini, "Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn)," *J. Chem.*, vol. 17, no. 1, pp. 98–107, 2016.

