

LAPORAN TAHUNAN
PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL



**KAJIAN SENYAWA ANTIOKSIDAN DAN ANTIINFLAMASI TUMBUHAN OBAT
BINAHONG (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ASAL GORONTALO**

Tahun 1 dari rencana 2 tahun

Dr. Yuszda K. Salimi, S.Si.,M.Si
NIDN: 0023037106

Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si
NIDN: 0029056204

UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO

SEPTEMBER 2014

LAPORAN TAHUNAN
PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL



KAJIAN SENYAWA ANTIOKSIDAN DAN ANTIINFLAMASI
TUMBUHAN OBAT BINAHONG (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis)
ASAL GORONTALO

Tahun 1 dari rencana 2 tahun

Dr. Yuszda K. Salimi, S.Si., M.Si
NIDN: 0023037106

Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si
NIDN: 0029056204

UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO

SEPTEMBER 2014

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : Kajian Senyawa Antioksidan dan Antiinflamasi Tanaman Obat Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. YUSZDA K SALIMI S.Si, M.Si
NIDN : 0023037106
Jabatan Fungsional :
Program Studi : Pendidikan Kimia
Nomor HP : 085219453604
Surel (e-mail) : mahirakamal@yahoo.co.id

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : Dra. NURHAYATI BIALANGI M.Si
NIDN : 0029056204
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Gorontalo

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra :
Alamat :
Penanggung Jawab :
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 30.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp. 150.000.000,00

Mengetahui
Dekan FMIPA UNG

(Dr. Ari Arbie, M.Si (Ph))

NIP/NIK 196304171990031003

Gorontalo, 1 - 10 - 2014,
Ketua Peneliti,

(Dr. YUSZDA K SALIMI S.Si, M.Si)

NIP/NIK

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian UNG

(Dr. Fitriyane Lihawa, M.Si)

NIP/NIK 196912091993032001

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah atas berkat rahmat Allah Ta'ala laporan akhir penelitian kami dengan judul "Kajian senyawa antioksidan dan antiinflamasi tumbuhan obat binahong (*androdera cordifolia* (ten.) Steenis) asal Gorontalo" selesai dilaksanakan berkat kerjasama tim peneliti.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada anggota peneliti Suleman Duengo, M.Si atas kerjasama selama penelitian berlangsung. Hal yang sama juga kami sampaikan kepada mahasiswa Rahma Tomayahu, S.Pd dan Friska Makalungsenge yang telah membantu sejak pengambilan sampel hingga laporan ini selesai.

Terima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini. Hal yang sama kami sampaikan kepada ketua lembaga penelitian dan staf yang telah bekerja sama dengan baik.

Kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas bantuan moril dan kerja sama selama penelitian berlangsung. Semoga Allah Ta'ala membalas segala upaya yang telah diberikan sehingga penelitian ini berjalan lancar dan selesai pada waktunya.

Fastabiqul Khairat.

Wasalamualaikum warahmatulahi wabarakatuh

Gorontalo, 8 Oktober 2014

Ketua Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PRAKATA	iii
RINGKASAN	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
BAB IV. METODE PENELITIAN	8
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	11
BABVI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	29
BABVII. KESIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi.....	15
Tabel 2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Binahong (<i>A. cordifolia</i>)	19

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1	Jalur pencarian senyawa aktif dari tanaman obat 6
Gambar 2	Alur kerja penelitian ekstraksi dan fraksinasi..... 10
Gambar 3	Alur kerja penelitian pemisahan dan pemurnian 11
Gambar 4	Rendemen Tahap 1 dan 2 16
Gambar 5	Rendemen Hasil Fraksinasi 16
Gambar 6	Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong Terhadap Kematian Larva <i>Artemia salina</i> Leach 19
Gambar 7	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas 20
Gambar 8	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas 21
Gambar 9	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas 21
Gambar 10	Kandungan fenolik total masing-masing ekstrak 23
Gambar 11	Nilai AEAC pada masing-masing ekstrak 25
Gambar 12	Nilai IC ₅₀ pada masing-masing ekstrak 27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Data Hasil Analisis Pengujian Kandungan Fenolik Total	30
Lampiran 2 Data Hasil Analisis Pengujian Aktivitas Antioksidan ..	42
Lampiran 3 Data Hasil Analisis Pengujian Aktivitas Antioksidan IC ₅₀ tumbuhan binahong.....	44
Lampiran 4 Data hasil statistik dengan menggunakan SPSS	36
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian	38
Lampiran 6 Personalia peneliti dan pembagian kerjs.....	
Lampiran 7 Draft artikel.....	

RINGKASAN

Pengobatan secara tradisional sudah dikenal sejak dahulu sebelum pelayanan kesehatan formal dengan obat-obatan modern berdasarkan ilmu kedokteran menyentuh masyarakat Indonesia. Salah satu cara yang digunakan dalam pengobatan tradisional adalah dengan menggunakan tanaman obat. Pengetahuan tentang tanaman obat ini merupakan warisan budaya bangsa berdasarkan pengalaman beradaptasi dengan lingkungan alam, dan atau diwariskan secara turun-temurun. Di kalangan masyarakat Gorontalo tanaman binahong digunakan oleh warga untuk menyembuhkan luka, radang tenggorokan dan batuk. Secara empiris tanaman obat sudah diketahui manfaatnya terhadap kesehatan namun belum banyak publikasi ilmiah tentang potensi tanaman binahong sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini merupakan upaya eksplorasi/karakterisasi dan mengungkap keunggulan senyawa metabolit sekunder daun binahong yang tumbuh di Gorontalo. Hasil penelitian dapat memberikan tambahan "data base" flavonoid tanaman obat yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan informasi ilmiah potensi senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun binahong yang tumbuh di Gorontalo sebagai antioksidan dan antiinflamasi, sehingga pemanfaatannya sebagai tumbuhan obat dapat dioptimalkan.

Target khusus terfokus pada hubungan aktivitas biologis dengan senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan binahong yang tumbuh di Gorontalo. Warisan tumbuhan obat yang telah turun temurun di kalangan masyarakat Gorontalo secara ilmiah dapat dibuktikan dari pengujian hayati sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Tujuan jangka panjang untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik pemisahan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi akan menjawab secara ilmiah potensi tumbuhan tersebut.

Tahun pertama penelitian ini akan dilakukan ekstraksi & isolasi komponen bioaktif dari daun binahong dengan metode ekstraksi dan fraksinasi. Ekstrak dan fraksi aktif daun binahong selanjutnya akan diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan toksisitas dengan metode BSLT.

Tahun kedua penelitian, pengujian efek antiinflamasi pra-klinis dilakukan secara *in vivo* pada tikus putih jantan galur wistar. Inflamasi menggunakan karagenan sebagai penginduksi bengkak pada telapak kaki kanan tikus putih jantan. Penelitian akan difokuskan pada fraksi yang aktif untuk mendapatkan senyawa aktif antiinflamasi. Fraksi-fraksi aktif yang lebih kuat akan dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi dan HPLC menggunakan variasi adsorben dan sistem pelarut. Setiap tahap pemisahan dipandu dengan uji flavonoid dan uji aktivitas biologi. Isolat murni yang prospektif ditentukan strukturnya melalui studi spektroskopi. Uji spektroskopi yang dilakukan dengan alat UV-Vis, IR, MS, dan NMR akan mengungkap hubungan struktur dengan aktivitas biologisnya.

Hasil penelitian tahun pertama, rendemen ekstrak yang diperoleh paling tinggi diperoleh fraksi etil asetat yaitu 31,6 % dan fraksi n-heksan 9,2%. Hasil uji

toksisitas ekstrak metanol (LC_{50}) adalah 447,96 ppm, ekstrak n-heksan adalah 3728,29 ppm, dan ekstrak etil asetat adalah (LC_{50}) adalah 12414,15 ppm. Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat memberikan penghambatan sebesar 242,68 ppm, ekstrak metanol memberikan penghambatan sebesar 256,88 ppm dan fraksi n-heksan memberikan penghambatan sebesar 308,2 ppm. Ekstrak yang memiliki nilai IC_{50} terendah memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar. Tingginya aktivitas antioksidan pada ekstrak etil asetat didukung oleh uji fitokimia dan kandungan fenolik total. Uji fitokimia pada ekstrak etil asetat positif mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, steroid dan triterpenoid dengan intensitas yang paling tinggi di antara semua fraksi. Hasil analisis kandungan fenolik total tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat memiliki total fenolik yang paling tinggi yaitu $93,98 \pm 0,30$ mg GAE/g . Ekstrak metanol memiliki total fenolik sebesar $90,59 \pm 0,75$ mg GAE/g. Sedangkan n-heksan memiliki total fenolik yang paling kecil yaitu $84,64 \pm 1,59$ mg GAE /g.

BAB I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara terkaya di dunia dalam cadangan plasma nutfah tanaman obat. Terdapat sekitar 30.000 spesies tanaman, 9600 spesies di antaranya berpotensi untuk dikembangkan menjadi tanaman obat, dan kurang lebih hanya 300 spesies yang telah digunakan sebagai bahan obat tradisional oleh industri obat tradisional (Hidayat 2011).

Berdasarkan warisan turun temurun nenek moyang, para ahli mulai merancang dan mengembangkan metode-metode penelitian untuk mengetahui adanya kandungan senyawa kimia dalam tanaman sehingga dapat digunakan sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit. Beberapa tumbuhan obat telah dimanfaatkan masyarakat untuk mengatasi berbagai penyakit, termasuk peradangan. Radang atau inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralkan dan membasmi agen-agen yang berbahaya atau bahan infeksi pada tempat cedera serta untuk mempersiapkan keadaan selanjutnya yang dibutuhkan untuk memperbaiki jaringan. Selama proses inflamasi, biasanya akan menimbulkan bengkak, nyeri, kemerahan, dan panas (Kee & Hayes 1996).

Di antara tumbuhan yang biasa dimanfaatkan sebagai obat adalah binahong (*Anredera cordifolia*[Ten.] Steenis) . Daun binahong sering digunakan oleh masyarakat di Gorontalo sebagai obat-obatan tradisional. Tanaman tersebut sengaja ditanam oleh masyarakat agar mudah diambil saat dibutuhkan. Binahong digunakan oleh masyarakat untuk menyembuhkan luka, batuk, dan penambah darah. Tumbuhan tersebut diambil beberapa pucuk untuk direbus dan air rebusannya untuk diminum. Masyarakat mungkin tidak mengetahui pada tanaman tersebut terdapat kandungan senyawa metabolit sekunder sehingga bermanfaat sebagai obat. Masyarakat di Gorontalo menggunakan tanaman tersebut sebagai obat hanya berdasarkan warisan turun temurun yang kemudian dijadikan kebiasaan.

Untuk mengkaji secara ilmiah senyawa penting yang terdapat pada daun binahong dapat bermanfaat terhadap kesehatan dan berfungsi sebagai obat, maka perlu adanya penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun binahong yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan zat

yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi dalam tubuh. Adanya zat antioksidan dapat melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas yang membahayakan kesehatan tubuh. Pengujian terhadap antiinflamasi perlu dilakukan karena obat-obat sintetis antiinflamasi yang digunakan selama ini masih menimbulkan beberapa efek samping yang tidak diinginkan, contohnya indometasin yang dapat menimbulkan efek samping, seperti keluhan saluran cerna seperti mual, muntah, anoreksia, diare & nyeri abdomen (Mycek 2001). Masyarakat cenderung untuk memakai obat tradisional karena dianggap memiliki keuntungan, antara lain harga yang relatif murah, mudah dalam memperoleh bahan bakunya, dan relatif aman karena adanya anggapan bahwa obat tradisional memberikan efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat sintetis.

Hubungan antara fraksi yang prospektif dengan aktivitas biologis perlu dilakukan dengan metode pemisahan untuk mendapatkan isolat murni sehingga terdapat hubungan erat antara hulu dan hilir. Isolat murni yang prospektif ditentukan strukturnya melalui studi spektroskopi (UV-Vis; IR, MS, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) sehingga komponen aktif yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi dapat diketahui.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Tanaman

2.1.1. Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis)

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) merupakan tanaman yang berasal dari dataran Cina dengan nama asalnya adalah Dheng shan chi dan menyebar ke Asia Tenggara, di Inggris disebut *madeira vine*. Tanaman binahong termasuk dalam famili Basellaceae, merupakan salah satu tanaman obat yang berpotensi dapat mengatasi berbagai jenis penyakit. Tanaman ini berupa tumbuhan menjalar, berumur panjang (perennial), bisa mencapai panjang ± 5 m. Akar berbentuk rimpang, berdaging lunak. Daun tunggal, bertangkai sangat pendek (sessile), tersusun berseling, berwarna hijau, bentuk jantung (cordata), panjang 5-10 cm, lebar 3-7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, permukaan licin, bisa dimakan. Bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5-1 cm, berbau harum. Perbanyak generatif (biji), namun lebih sering berkembang atau dikembangbiakan secara vegetatif melalui akar rimpangnya (Mufid Khunaifi, 2010).

Klasifikasi tanaman binahong (*Anredera Cordifolia*) menurut situs adalah:

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Tracheobionta (berpembuluh)
Superdivisio	:	Spermatophyta (menghasilkan biji)
Divisio	:	Magnoliophyta (berbunga)
Kelas	:	Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Subkelas	:	Hamamelidae
Ordo	:	Caryophyllales
Familia	:	Basellaceae
Genus	:	Anredera
Species	:	<i>Anredera cordifolia</i> (Tenore) Steenis

Manfaat tanaman ini sangat besar dalam dunia pengobatan, secara empiris binahong dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Dalam pengobatan, bagian tanaman yang digunakan dapat berasal dari akar, batang, daun, dan bunga

maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Tanaman ini dikenal dengan sebutan *Madeira Vine* dipercaya memiliki kandungan antioksidan tinggi dan antivirus. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke, wasir, reumatik, pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan, menyembuhkan segala luka dalam dan khitanan, radang usus, melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing-pusing, sakit perut, menurunkan panas tinggi, menyuburkan kandungan, maag, asam urat, keputihan, pembengkakan hati, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh.

Laporan Rachmawati (2007) mengungkapkan skrining fitokimia daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Steenis dengan melakukan maserasi terhadap serbuk kering daun dengan menggunakan pelarut n-heksana dan metanol didapatkan kandungan kimia berupa saponin, triterpenoid, flavanoid dan minyak atsiri. Selain itu, Rochani (2009) melaporkan ekstraksi dengan cara maserasi daun binahong dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan etanol, setelah dilakukan uji tabung ditemukan kandungan alkaloid, saponin dan flavanoid, sedangkan pada analisis secara KLT ditemukan senyawa alkaloid, saponin dan flavanoid. Setiaji (2009) telah melakukan ekstraksi pada rhizoma binahong dengan pelarut etil asetat, petroleum eter, dan etanol 70% di dapatkan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan polifenol. Pada ekstrak dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 2 % dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada ekstrak dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 2% dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* (Desi, 2001).

2.2. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa atau bahan yang digunakan pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi. Aktivitas antioksidan merupakan suatu aktivitas senyawa yang bersifat untuk menghambat terjadinya pembentukan radikal bebas di dalam tubuh. Antioksidan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan

mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan dapat menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid (Moein *et al.* 2007).

Antioksidan dalam pengertian kimia, merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Secara fisiologis senyawa fenolik mempunyai beberapa aktivitas biologis, seperti antialergi, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antitrombotik dan kardioprotektif (Aberoumand & Deokule 2008).

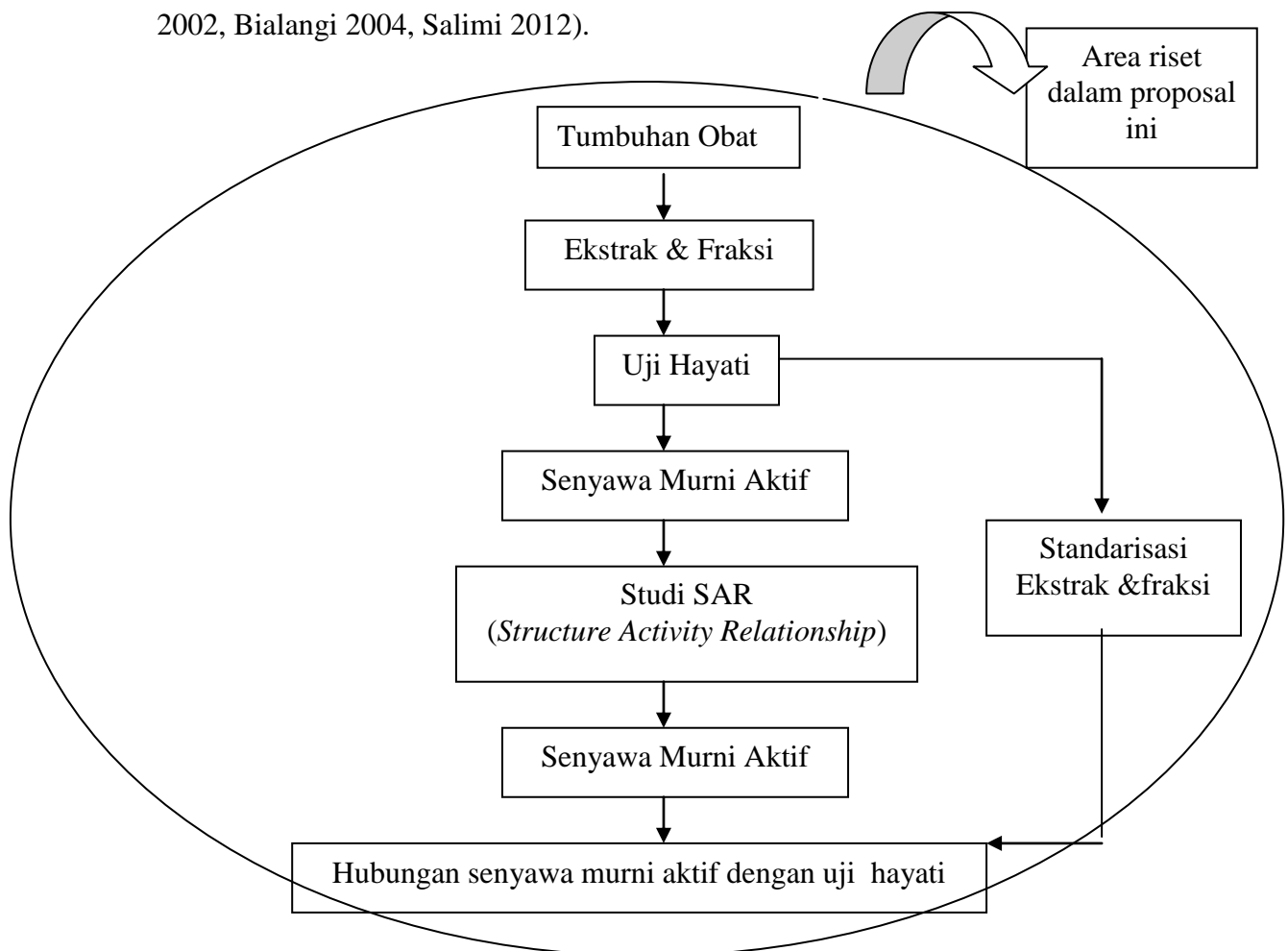
2.3. Inflamasi

Inflamasi atau radang merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralkan dan membasmi agen-agen yang berbahaya atau bahan infeksi pada tempat cedera serta untuk mempersiapkan keadaan selanjutnya yang dibutuhkan untuk memperbaiki jaringan. Inflamasi merupakan sebuah respon protektik normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik yang bersifat patogen. Inflamasi diidentifikasi sebagai suatu reaksi lokal organisme terhadap suatu iritasi atau keadaan non fisiologik. Secara skematis dibedakan 4 fase gejala-gejala inflamasi yaitu: (1) Eritem : vasodilatasi pembuluh darah menyebabkan tertahannya darah oleh perubahan permeabilitas pembuluh sehingga plasma dapat keluar dari dinding pembuluh; (2) Ekstravasasi: keluarnya plasma melalui dinding pembuluh darah dan menyebabkan udem; (3) Suppurasi dan nekrosis: pembentukan nanah dan kematian jaringan yang disebabkan oleh penimbunan lekosit-lekosit di daerah inflasi; (4) Degenerasi jaringan: tidak terdapat pembentukan sel-sel baru untuk

pembentukan pembuluh darah dan makin bertambahnya serat-serat kolage yang tidak berfungsi. Kebanyakan dari gejala tersebut di atas telah dijadikan sebagai dasar berbagai metode percobaan untuk mengevaluasi obat-obat anti inflamasi (Kee & Hayes 1996).

2.4. Peta Jalan Penelitian

Penelitian tentang tumbuhan yang tumbuh di Gorontalo dan tanaman obat tradisional berupa kandungan senyawa metabolit sekunder dan khasiatnya telah dilaksanakan oleh tim peneliti sejak tahun 2004 di Universitas Negeri Gorontalo namun belum dipublikasikan. Beberapa tumbuhan yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang telah diteliti oleh tim kami seperti daun jarak pagar, tumbuhan *Ocimum sanctum* Linn, brotowali, sorgum (Bialangi, 2008, Bialangi 2002, Bialangi 2004, Salimi 2012).



Gambar 1. Jalur pencarian senyawa aktif dari tanaman obat

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Secara rinci tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Mengekstraksi dan fraksinasi senyawa metabolit sekunder daun tanaman binahong
2. Menguji toksisitas ekstrak dan fraksi secara *in vitro*
3. Menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi aktif tanaman binahong secara *in vitro*
4. Mengevaluasi secara *in vivo* (dengan tikus percobaan) aktivitas antiinflamasi fraksi yang prospektif.
5. Mengungkapkan hubungan struktur dan aktivitas biologi flavonoid hasil isolasi dengan metode spektroskopis UV-Vis, IR, dan NMR.

3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan tambahan "data base" metabolit sekunder seperti flavonoid yang berpotensi obat, juga untuk mengeksplorasi sumber senyawa kimia asal tumbuhan Indonesia khususnya yang tumbuh di daerah Gorontalo. Hasil penelitian ini akan diseminarkan dan dipublikasikan di dalam atau luar negeri sehingga karya ilmiah ini bermanfaat.

BAB IV. METODE PENELITIAN

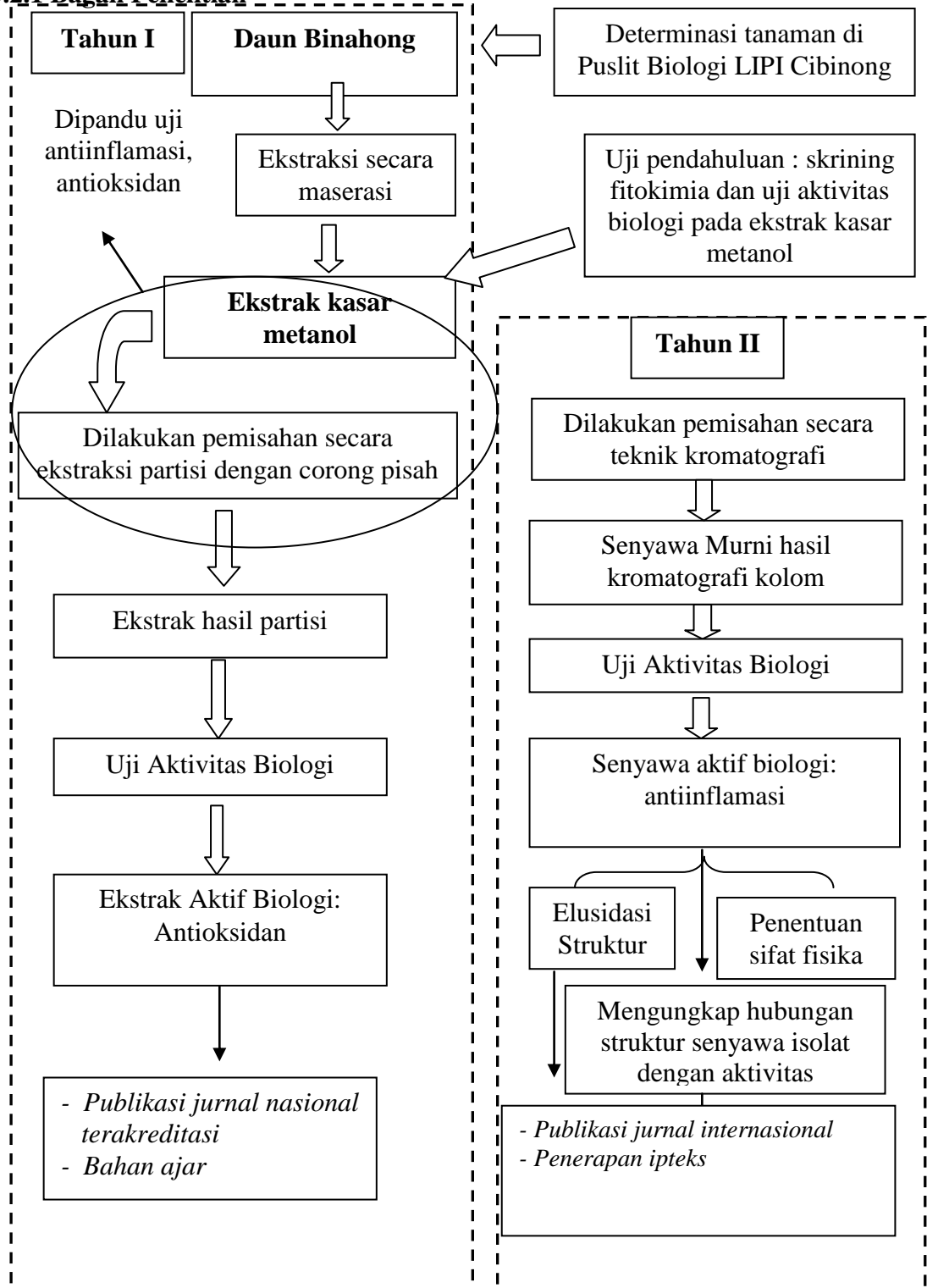
3.1 Pentahapan Kegiatan Penelitian

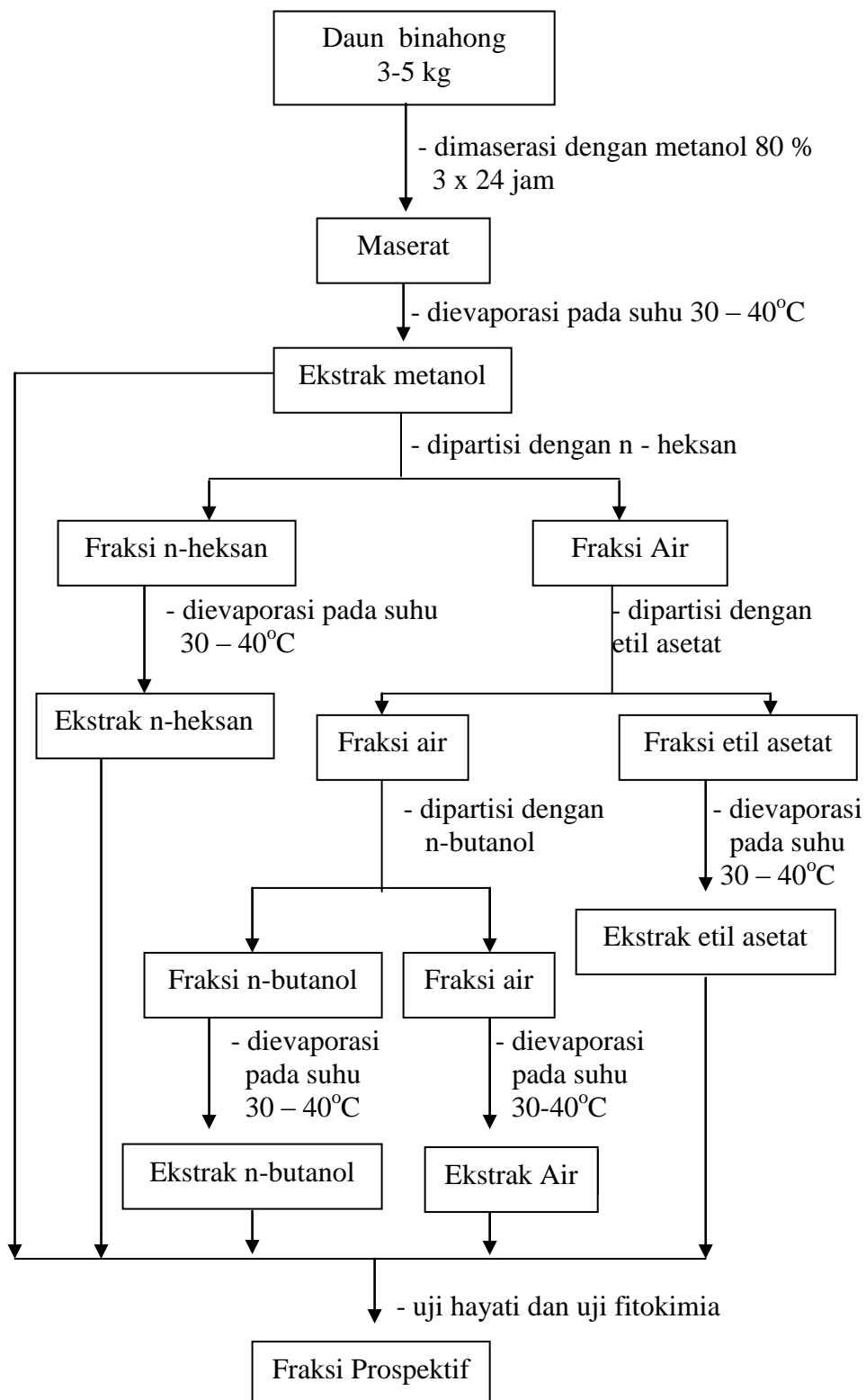
Penelitian ini dirancang dalam delapan tahap percobaan selama periode waktu dua tahun yaitu: **tahap I** penelitian ini diawali dengan pengumpulan dan penyiapan daun tumbuhan binahong yang tumbuh di daerah Gorontalo, dan diikuti dengan ekstraksi dan fraksinasi senyawa bioaktif, **tahap II** pengujian kapasitas antioksidan dengan metode DPPH, **tahap III** uji aktivitas biologi dilakukan uji efek antiinflamasi menggunakan karagenan sebagai penginduksi bengkak pada telapak kaki kanan tikus putih jantan, **tahap V** terhadap fraksi yang prospektif flavonoid dan aktif biologi dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi menggunakan variasi adsorben dan sistem pelarut **tahap VI** elusidasi struktur senyawa aktif berdasarkan data spektrum spektroskopi.

Indikator capaian dari setiap tahap sebagai berikut :

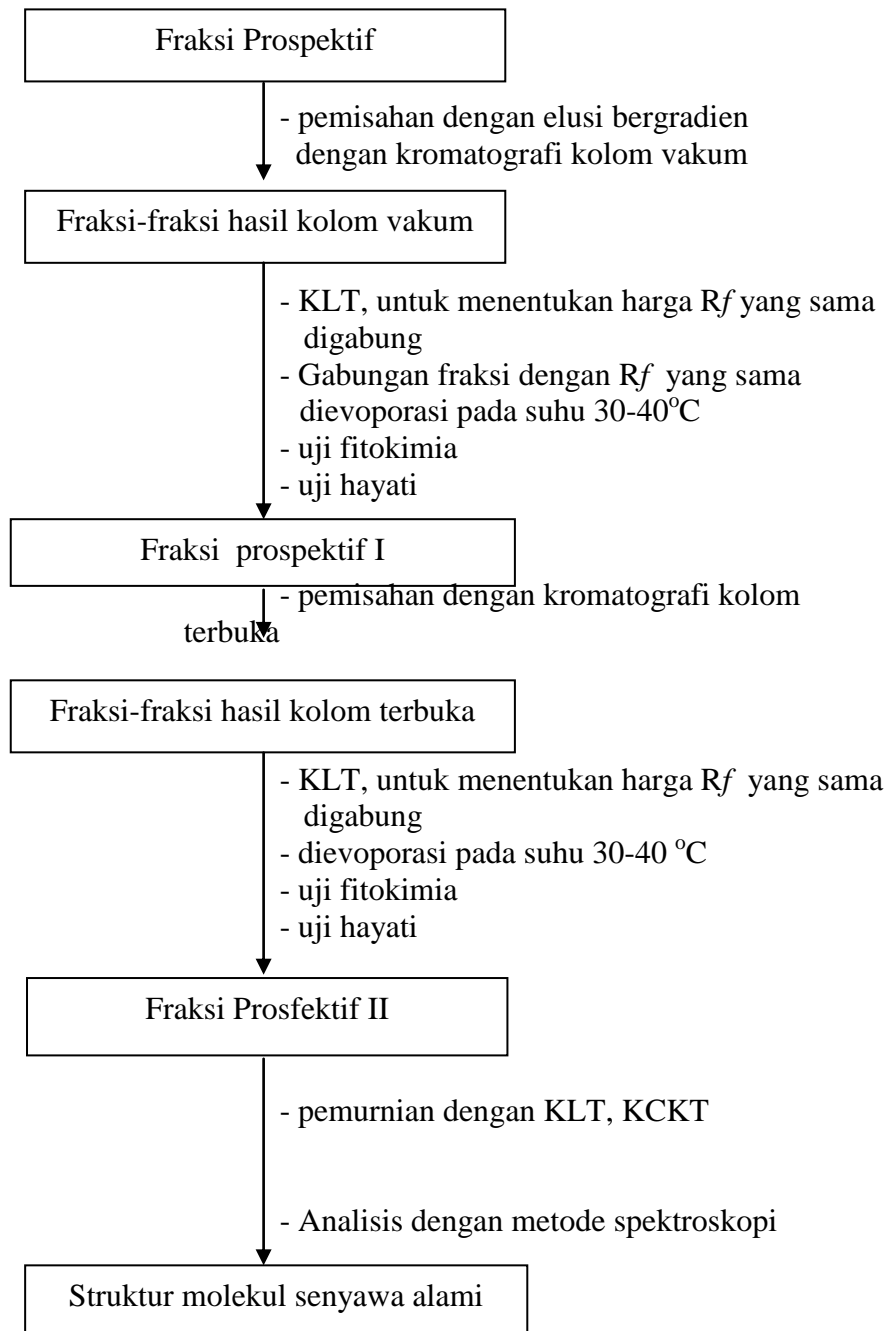
1. Tahap I: Indikator capaian berupa diperolehnya ekstrak dan fraksi-fraksi yang dapat dideteksi secara KLT dan uji fitokimia.
2. Tahap II: Indikator capaian berupa diperolehnya data nilai IC_{50} , semakin rendah nilai IC_{50} menunjukkan aktivitasnya semakin tinggi.
3. Tahap IV: Indikator capaian berupa diperolehnya data ED_{50} dan penurunan efek nyeri pada mencit yang terinduksi asam asetat untuk setiap ekstrak dan fraksi.
4. Tahap V: Indikator capaian berupa diperolehnya isolat yang dapat dideteksi secara KLT
5. Tahap VI : Indikator capaian berupa diperolehnya struktur senyawa yang tepat dan jelas berdasarkan data spektrum dari instrumen spektrometri (UV, IR, LC-MS/GC-MS, dan NMR

3.2.1 Bagan Penelitian





Gambar 2. Alur kerja penelitian ekstraksi dan fraksinasi



Gambar 3. Alur kerja penelitian pemisahan dan pemurnian

3.2. Tempat, Alat, dan Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Kandang Hewan Percobaan FMIPA UNG, bahan dan alat yang digunakan terlampir pada lampiran 1.

3.4 Prosedur Kerja dan Metode Analisis

3.4.1 Uji aktivitas

a. Pengujian kapasitas antioksidan

Aktivitas antioksidan dianalisa berdasarkan kemampuannya menangkap radikal bebas (*radical scavenging activity*) DPPH. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dinyatakan dengan % penghambatan = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100\%$, dimana A_0 adalah absorbansi kontrol saat $t = 0$ detik dan A_t adalah absorbansi antioksidan pada saat t . Nilai IC_{50} ditentukan dari grafik hubungan antara aktivitas menangkap radikal bebas versus konsentrasi ekstrak atau fraksi-fraksinya.

b. Uji Aktivitas Efek Antiinflamasi pada Hewan Percobaan

Uji aktivitas efek antiinflamasi ekstrak metanol dan fraksi daun binahong, menggunakan metode penginduksi bengkak dengan karagenan pada telapak kaki kanan tikus putih jantan. Persentase radang dihitung menggunakan persamaan:

$$\frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100\%$$

V_o = volume kaki tikus sebelum penyuntikan karagenan

V_t = volume kaki tikus setelah penyuntikan karagenan pada jam ke- t

Persentase inhibisi dihitung menggunakan persamaan:

$$\frac{\% \text{ radang kontrol} - \% \text{ radang uji}}{\% \text{ radang kontrol}} \times 100\%$$

3.4.5. Metoda Analisis

Identifikasi/elusidasi struktur yang positif sebagai antioksidan dan antiinflamasi dianalisis dengan berbagai instrumen yaitu UV, IR, dan NMR.

Data pengujian dianalisis dengan prosedur sidik ragam (ANOVA) dengan bantuan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versi 17. Apabila hasil analisis sidik ragam menunjukkan ada perbedaan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Duncan New Multiple Range Test/DMRT) pada taraf 5%.

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengambilan dan Preparasi Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tanaman binahong (*A. cordifolia*) yang tumbuh di desa Toimadan Luwuk, Batudaa dan Gorontalo sekitarnya. Daun binahong dipilih yang baik dan dipisahkan dari yang rusak atau berwarna kehitaman lalu dicuci bersih agar kotoran yang melekat pada daun hilang. Daun binahong dipotong-potong kasar agar proses pengeringan menjadi lebih cepat. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara diangin-anginkan tanpa paparan sinar matahari secara langsung. Hal ini bertujuan agar senyawa aktif dalam sampel tidak mengalami kerusakan dan kadar air dalam sampel berkurang. Selain sampel lebih awet, pengurangan kadar air akan memudahkan pelarut menarik komponen bioaktif dalam sampel saat maserasi (Sudirman dkk, 2011). Berat sampel segar yang diambil adalah 6,4 kg. Pengeringan daun binahong setelah pengambilan sampel selama ± 60 hari.

Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan blender untuk mendapatkan serbuk halus. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama (pengawetan) dan tidak mudah rusak sehingga komposisi kimianya tidak mengalami perubahan. Penghalusan dapat mempermudah

proses ekstraksi. Semakin kecil bentuknya semakin besar luas permukaannya maka interaksi zat cairan ekstraksi akan semakin besar, sehingga proses ekstraksi akan semakin efektif. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut (Octavia, 2009 dalam Sriwahyuni, 2010). Berat serbuk halus yang diperoleh adalah 400 gr. Sampel diekstraksi dengan metanol dan difraksinasi dengan pelarut yang berbeda kepolarannya.

2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemisahan secara maserasi. Tujuan maserasi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam sampel, dimana pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel. Sampel daun binahong yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 250 gr dan dimaserasi dengan metanol 1 x 24 jam. Maserat dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum. Evaporasi dengan menggunakan bantuan pompa vakum akan menurunkan tekanan uap pelarut sehingga pelarut akan menguap di bawah titik didih normalnya. Tujuannya adalah agar komponen fitokimia yang terdapat dalam ekstrak tidak mengalami kerusakan akibat pemanasan yang berlebihan. Adanya tekanan yang diberikan oleh pompa vakum mengakibatkan pelarut menguap dari campuran kemudian terkondensasi dan masuk dalam labu penampung. Ekstrak kental metanol yang diperoleh seluruhnya adalah 24,04 gr .

3. Fraksinasi

Tahap selanjutnya, ekstrak kental metanol sebanyak 10 gr disuspensi dengan campuran metanol:air 150 ml dengan perbandingan (1:2). Fraksinasi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat bertujuan untuk memisahkan senyawa-

senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar. Pada saat dipartisi dengan pelarut n-heksan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas pelarut n-heksan dan lapisan bawah adalah air. Hal ini karena massa jenis n-heksan (0,4 g/ml) lebih kecil dibandingkan dengan massa jenis air (1 g/ml). Hal yang sama dilakukan pada pelarut selanjutnya yaitu etil asetat. Setelah dipartisi dengan pelarut n-heksan, bagian air selanjutnya dipartisi dengan etil asetat. Bagian atas merupakan pelarut etil asetat sedangkan bagian bawahnya merupakan pelarut air. Pelarut etil asetat memiliki massa jenis (0,66 g/ml) lebih kecil dibandingkan dengan massa jenis air (1 gr/ml). Hasil dari partisi masing-masing pelarut kemudian dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum sehingga menghasilkan ekstrak kental n-heksan dan etil asetat (Tabel 1).

Tabel 1. Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi

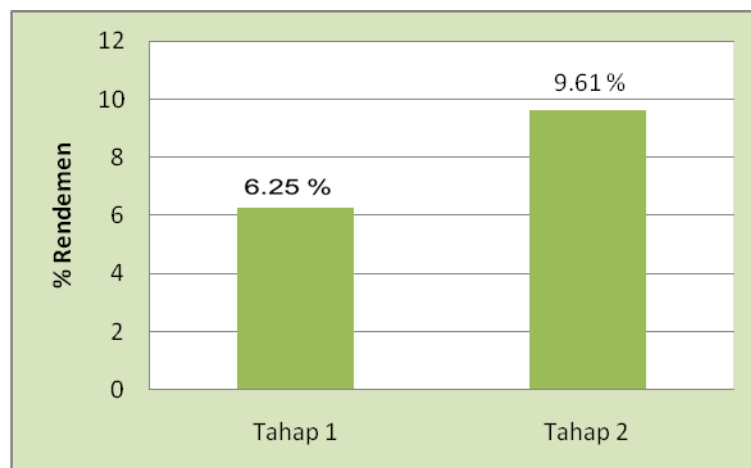
No	Fraksi	Berat (gram)
1	n-Heksan	0,92
2	Etil asetat	3,16

Berdasarkan tabel hasil fraksinasi tersebut dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat beratnya lebih besar dari ada fraksi n-heksan. Ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa polar dan semipolar dalam tanaman binahong lebih besar dibandingkan senyawa yang bersifat nonpolar. Etil asetat bersifat semipolar sehingga dapat melarutkan senyawa aktif semipolar dan polar, berdasarkan prinsip *like dissolve like*.

4. Rendemen

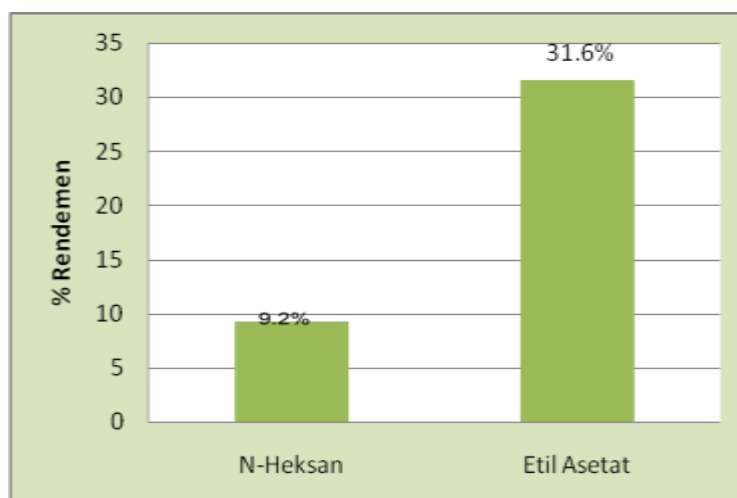
Rendemen merupakan persentase bagian bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dengan total bahan baku. Kusumawati dkk, (2008) dalam Sudirman dkk, (2011) mengatakan bahwa semakin tinggi nilai rendemen menandakan bahwa bahan baku tersebut memiliki peluang untuk dimanfaatkan lebih besar. Rendemen merupakan persentase sampel sebelum dan setelah perlakuan. Rendemen setelah pengeringan 6,4 kg daun binahong adalah sebesar 6,25%. Artinya, setelah melalui proses pengeringan, daun binahong kehilangan berat sebesar 93,75%. Pada tahap kedua (proses ekstraksi), dari 250 gr daun

binahong menghasilkan rendemen ekstrak kental metanol sebesar 9,61%. Rendemen yang dihasilkan sangat kecil sehingga untuk menghasilkan ekstrak metanol memerlukan sampel banyak. Persentase rendemen tahap pertama dan kedua terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Rendemen Tahap 1 dan 2

Setelah difraksinasi dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, dihitung persen rendemen dari masing-masing fraksi. Perhitungan persen rendemen terlihat pada Lampiran 2. Hasil fraksinasi yang diperoleh, fraksi etil asetat memiliki rendemen yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksan. Rendemen fraksi etil asetat yaitu 31,6 % dan fraksi n-heksan 9,2% (Gambar 5).



Gambar 5. Rendemen Hasil Fraksinasi

Fraksi etil asetat menghasilkan rendemen yang lebih besar, karena sifatnya yang semipolar menyebabkan senyawa yang sifatnya polar lebih terkonsentrasi pada fraksi tersebut. Nur dan Astawan (2011) mengemukakan bahwa tingginya rendemen ekstrak pada pelarut polar dikarenakan makromolekul gula sederhana seperti monosakarida dan oligosakarida ikut terlarut dalam pelarut polar namun tidak larut dalam pelarut nonpolar.

5. Uji Fitokimia

Fitokimia bertujuan untuk menguji golongan kimia yang ada dalam sampel (Rahmawati dkk, 2012). Ekstrak kental metanol dan hasil fraksinasi n-heksan dan etil asetat diuji fitokimia yang meliputi uji flavonoid, alkaloid, saponin, steroid dan terpenoid. Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan, senyawa flavonoid terdeteksi pada semua ekstrak yaitu ekstrak metanol, n-heksan dan etil asetat. Senyawa alkaloid tidak terdeteksi pada semua ekstrak, baik pada ekstrak metanol, n-heksan maupun etil asetat. Senyawa steroid positif pada semua ekstrak sedangkan terpenoid hanya terdeteksi pada ekstrak metanol. Senyawa saponin positif pada fraksi etil asetat. Skrining fitokimia terhadap daun binahong telah dilaporkan oleh Astuti (2012), bahwa pada daun binahong memiliki senyawa fitokimia saponin, terpenoid, steroid, fenol, flavonoid dan alkaloid. Ekstrak etanol positif mengandung flavonoid (Rahmawati dkk, 2012). Ekstrak etanol dan n-heksan positif mengandung alkaloid (Titis dkk, 2013). (Murdiyanto, 2012), ekstrak n-heksan positif mengandung senyawa golongan triterpenoid. Ekstrak etil asetat daun binahong mengandung senyawa polifenol dan saponin (Sulistiyani dkk, 2012).

Senyawa flavonoid positif ditandai dengan perubahan warna, alkaloid positif jika terbentuk endapan ketika ditambahkan pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Hager, Wagner, Mayer dan Dragendrof. Positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa/buih yang bertahan selama 15 menit, terpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah, ungu, hingga kecokelatan, dan steroid ditandai dengan perubahan warna dari hijau hingga kebiruan.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Binahong (*A. cordifolia*)

No	Pereaksi	Fraksi			Standar (warna)
		M	N	E	
1	HCl + Serbuk Mg	+++	++	+++	Perubahan warna
2	H ₂ SO ₄	+++	++	+++	Perubahan warna
3	NaOH	++	+	++	Perubahan warna
4	Dragendroff	-	-	-	Endapan merah-jingga
5	Hager	-	-	-	Endapan putih
6	Mayer	-	-	-	Endapan putih kekuningan
7	Wagner	-	-	-	Endapan coklat
8	Saponin	-	-	+	Terbentuk busa/buih
9	Steroid	+	++	++	Warna hijau
10	Terpenoid	++	-	-	Warna merah - coklat

Keterangan : (M) metanol, (N) n-heksan, (E) etil asetat

(+++) intensitas kuat, (++) sedang, (+) lemah, (-) tidak terdeteksi

6. Uji Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan uji pendahuluan yang mengarah pada uji sitotoksik senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji yang bertujuan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang memiliki sifat toksik. Korelasinya adalah jika mortalitas terhadap *A. salina* Leach yang ditimbulkan memiliki harga LC₅₀ < 1000 µg/mL.

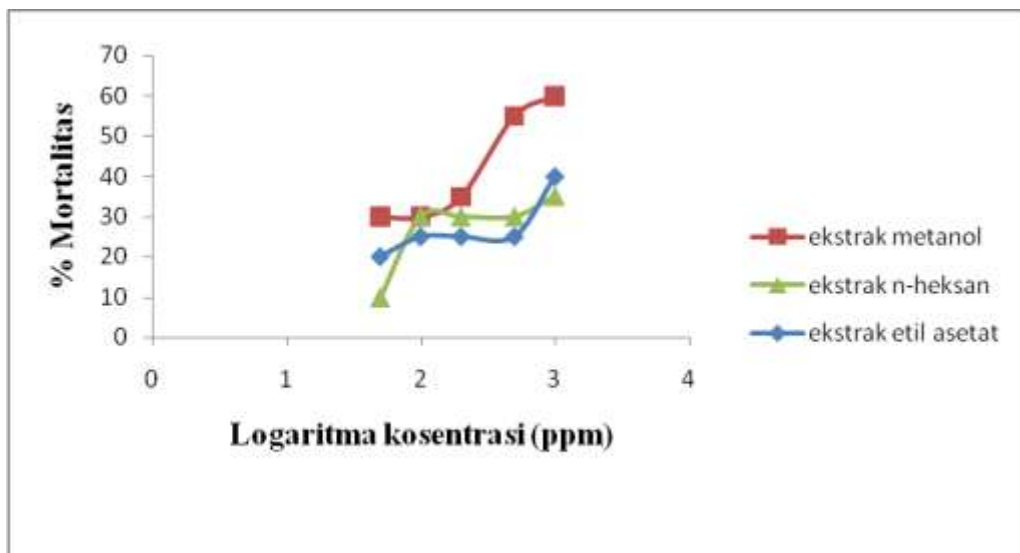
Beberapa kelebihan dari *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ini adalah mudah dan relatif tidak mahal serta tidak membutuhkan suatu spesialisasi tertentu

dalam pelaksanaannya. Metode ini juga merupakan metode yang telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas suatu senyawa di dalam ekstrak tanaman (Lisdawati dkk, 2006).

Toksistas suatu ekstrak dinilai berdasarkan tingkat mortalitas larva udang yang digunakan sebagai bahan uji. Data dianalisis untuk memperoleh nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*) adalah tingkat konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji. Sehingga, apabila jumlah mortalitas lebih dari 50% dapat dipastikan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ atau 1000 ppm. ketentuan ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut aktif (Hidayati, 2000). Tingkat toksistas suatu ekstrak mengikuti pedoman nilai berikut:

$LC_{50} \leq 30 \text{ ppm}$: sangat toksik
$31 < LC_{50} \leq 1000 \text{ ppm}$: toksik
$LC_{50} > 1000 \text{ ppm}$: tidak toksik

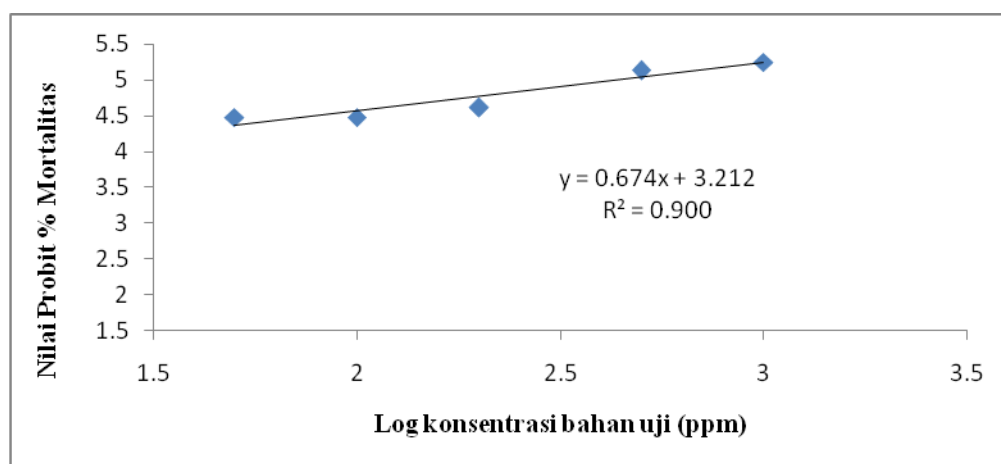
Konsentrasi ekstrak memberikan pengaruh yang berbeda-beda pada kematian larva udang. Pada umumnya, semakin besar konsentrasi suatu larutan uji mengakibatkan naiknya angka kematian larva udang. Hal ini terlihat pada Gambar 6 di bawah ini.



Gambar 6. Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong Terhadap Kematian Larva *Artemia salina* Leach

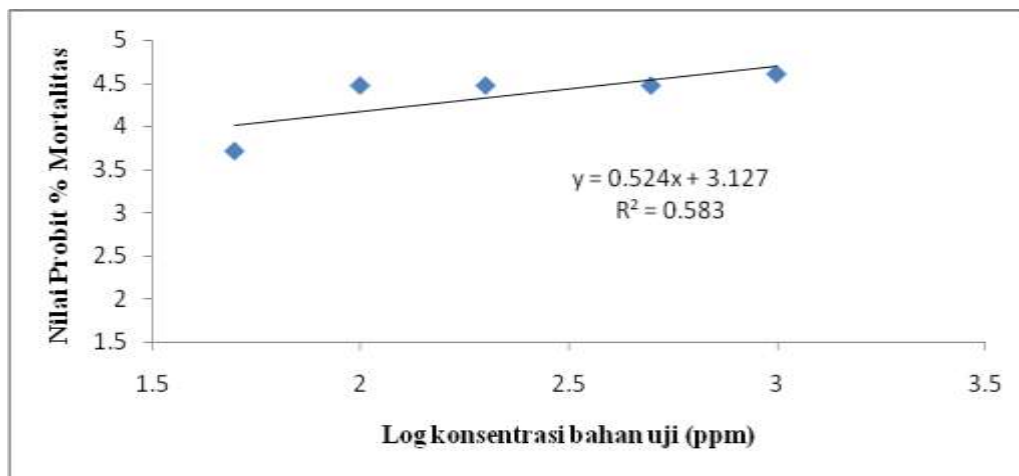
Dari gambar 6 tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi ekstrak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva udang, dimana kenaikan konsentrasi ekstrak diikuti dengan kenaikan persentase rata-rata kematian larva udang (hewan uji).

Hasil ujitoksitas masing-masing ekstrak daun binahong berdasarkan analisis probit untuk menentukan nilai LC_{50} dimana hubungan nilai logaritma konsentrasi bahan toksik uji dan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linear $y = a + bx$, terlihat pada gambar 7, 8 dan 9 di bawah ini:



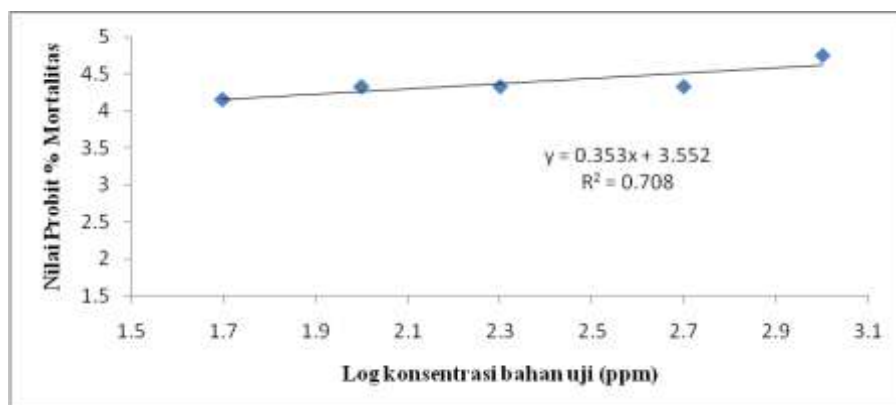
Gambar 7. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 7 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak metanol (x) sebagai berikut: $y = 3,212 + 0,6744x$. Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,948, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak metanol berkorelasi positif dan korelasinya erat ($R^2 = 0,9005$) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak metanol sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 90,05 %. Tingkat konsentrasi ekstrak metanol daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji (LC_{50}) adalah 447,96 ppm.



Gambar 8. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 8 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan (x) sebagai berikut: $y = 3,1271 + 0,5244x$. Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,763, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan berkorelasi positif dan korelasinya erat ($R^2 = 0,5831$) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 58,31 %. Tingkat konsentrasi ekstrak n-heksan daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji (LC_{50}) adalah 3728,29 ppm.



Gambar 9. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 9 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat (x) sebagai berikut: $y = 3,5528 + 0,3535x$. Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,41, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat berkorelasi positif dan korelasinya erat ($R^2 = 0,7082$) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 76,48 %. Tingkat konsentrasi ekstrak etil asetat daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji (LC_{50}) adalah 12414,15 ppm.

Suatu zat dikatakan aktif atau toksik jika nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik dengan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm (447,96 ppm). Sedangkan ekstrak n-heksan dan etil asetat bersifat tidak toksik dengan nilai $LC_{50} > 1000$ ppm, yaitu 3728,29 ppm dan 12414,15 ppm.

Penelitian Carballo *et al* (2002) menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara sitotoksisitas dan letalitas larva *Artemia salina* Leach pada ekstrak tanaman. Apabila harga LC_{50} suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut metode BSLT, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker (Widianti, 2009).

7. Penentuan Kandungan Fenolik Total

Penentuan kandungan fenolik total pada penelitian ini dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik dapat bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Penggunaan asam galat sebagai pembanding dalam analisis kandungan Fenolik total tumbuhan binahong bertujuan agar hasil pengukuran total senyawa fenolik dapat dinyatakan dalam satuan mg asam galat ekuivalen. Kurva standar asam galat beserta persamaan liniernya terlihat pada lampiran 1.

Dari kurva standar tersebut dapat ditentukan kandungan Fenolik total dengan menggunakan persamaan $\hat{Y} = ax + b$. diperoleh persamaan regresi linier

yang digunakan untuk menentukan kandungan fenolik total pada masing-masing ekstrak yaitu ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol. Data hasil analisis total fenol terlihat pada Gambar 1.



Ket. : Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan $\alpha=5\%$). *(rata-rata \pm SD).

Gambar 10. Kandungan fenolik total masing-masing ekstrak

Dari data hasil perhitungan, ekstrak etil asetat memiliki total fenolik yang paling tinggi yaitu $93,98 \pm 0,30$ mg GAE/g . Hal ini mengindikasikan bahwa setiap gram ekstrak etil asetat setara dengan 93,98 mg asam galat. Ekstrak metanol memiliki total fenolik sebesar $90,59 \pm 0,75$ mg GAE/g. Sedangkan n-heksan memiliki total fenolik yang paling kecil yaitu $84,64 \pm 1,59$ mg GAE /g.

Pengujian statistik dengan menggunakan anova satu jalur dilakukan untuk melihat perbedaan kandungan fenolik total dari setiap ekstrak. Dari hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan bahwa nilai probabilitas (Sig. $\leq 0,05$), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada $\alpha = 0,05$, taraf kepercayaan 95%. Hasil uji lanjut Duncan terhadap total fenol masing-masing ekstrak terlihat lampiran 4. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak etil asetat memberikan perbedaan yang nyata terhadap ekstrak methanol dan ekstrak n-heksan. Perbedaan yang nyata yang dimaksud adalah kadar kandungan fenolik total yang terdapat pada masing-masing ekstrak. Sehingga dapat di urutan

kandungan fenolik total dalam ekstrak secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat = ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Senyawa fenolik yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan menghasilkan kandungan fenolik total yang tinggi pada ekstrak (Ukieyanna dkk., 2012).

Kandungan fenolik total yang terdapat di dalam ekstrak dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan saat ekstraksi (Jang dkk., 2007). Ekstrak metanol memiliki kandungan fenolik total lebih kecil dibanding dengan ekstrak etil asetat walaupun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Kemungkinannya adalah senyawa fenolik yang terdapat di dalam ekstrak metanol masih memiliki ikatan dengan senyawa lain seperti protein, polisakarida, terpen, klorofil, lemak dan komponen organik lainnya. Dan hal ini membutuhkan penanganan khusus untuk memisahkan ikatan tersebut misalnya dengan menggunakan pelarut yang cocok untuk mengekstrak komponen-komponen tersebut (Koffi dkk., 2010).

Fraksi n-heksan memiliki kandungan fenolik total yang paling rendah di antara semua fraksi. Hal ini dikarenakan senyawa *nonpolar* seperti lemak, lilin, dan minyak terlarut dalam pelarut n-heksan (Nurdyana dkk., 2012). Senyawa-senyawa tersebut bukan merupakan golongan fenolik.

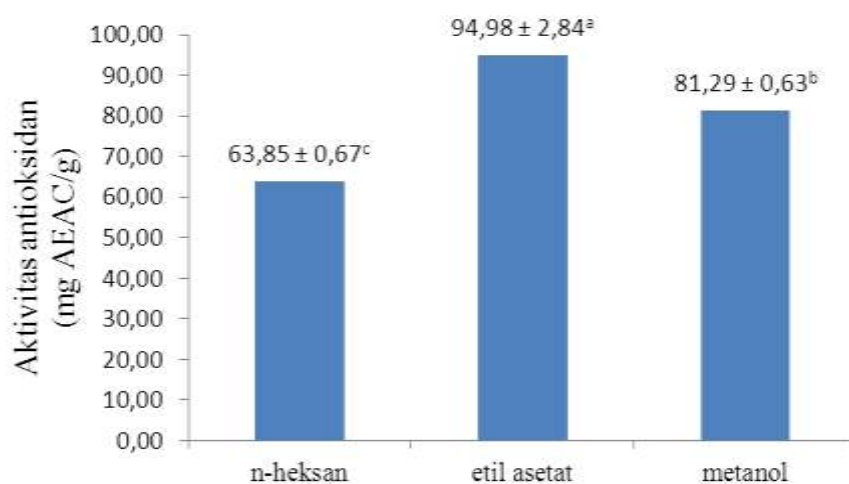
8. Uji Aktivitas Antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih atom hidrogen pada radikal bebas sehingga aktivitas radikal bebas tersebut dapat diredam. Antioksidan memiliki peranan yang cukup penting bagi kesehatan khususnya dalam mempertahankan tubuh dari kerusakan sel akibat adanya spesies radikal bebas. Berdasarkan sumbernya, terdapat antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif. Antioksidan alami umumnya memiliki gugus fenolik dalam struktur molekulnya (Sunarni 2005). Antioksidan sintetik seperti butil hidroksi toluena (BHT), butil hidroksi anisol (BHA) dan t-butil hidroksi kuinon (TBHQ) dapat memberikan dampak negatif bagi kesehatan. Selain itu, antioksidan

sintetik mempunyai kelarutan yang rendah dibandingkan dengan antioksidan alami (Barlow 1990).

Dalam penelitian ini, uji aktivitas antioksidan menggunakan asam askorbat (vitamin C) untuk membuat kurva standar. Sehingga satuan pengukuran dinyatakan sebagai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*) (Kurva standar asam askorbat dapat dilihat pada Lampiran 4).

Kurva standar asam askorbat dibuat untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan (mg AEAC/g sampel). Perhitungan aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Lampiran 4. Berikut ini adalah aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak rambut jagung yang dinyatakan dalam AEAC.



Ket. : nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan $\alpha=5\%$). *(Rata-rata \pm SD).

Gambar 11. Nilai AEAC pada masing-masing ekstrak

Aktivitas antioksidan yang paling tinggi terdapat dalam fraksi etil asetat yaitu sebesar 94,98 (mg AEAC/g). Artinya adalah 1 gram ekstrak kering etil asetat setara dengan 47,75 mg vitamin C. Ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan 81,29 (mg AEAC/g), sedangkan aktivitas antioksidan yang paling rendah yaitu pada ekstrak n-heksan sebesar 63,85 (mg AEAC/g).

Hasil uji statistik menggunakan anova satu jalur (Lampiran), mendapatkan bahwa ada perbedaan yang signifikan (berarti) antara besar aktivitas antioksidan masing-masing fraksi, nilai probabilitas (Sig. $\leq 0,05$). Untuk melihat perbedaan

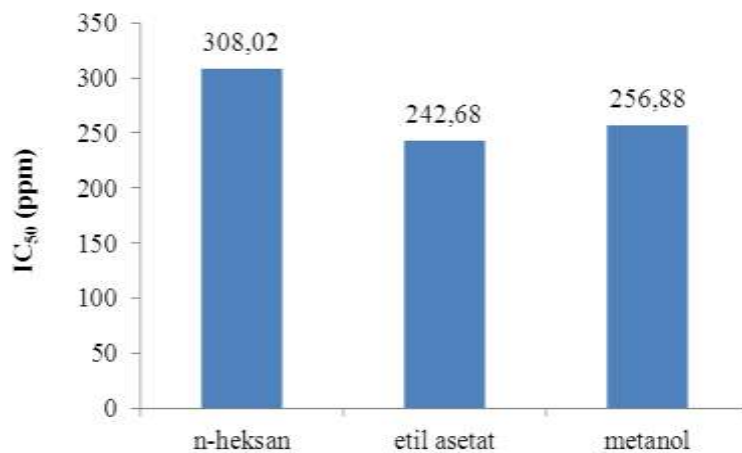
dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Berdasarkan hasil analisis terdapat perbedaan yang nyata antara fraksi n-heksan, etil asetat, dan methanol. Perbedaan yang dimaksud adalah aktivitas antioksidan. Urutan aktivitas antioksidan secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat > ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Selain itu, perbedaan jumlah kapasitas antioksidan pada tumbuhan binahong disebabkan komponen antioksidan yang terekstrak pada pelarut n-heksan memiliki jumlah gugus -OH yang sedikit untuk mendonorkan atom hidrogen dibandingkan dengan komponen antioksidan yang terekstrak dengan menggunakan pelarut etilasetat dan methanol yang memiliki jumlah gugus -OH yang lebih banyak. Senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya untuk meredam dan menstabilkan radikal bebas.

Salah satu sumber antioksidan alami dari tanaman adalah golongan fenol. Senyawa fenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Oleh karena itu, proses ekstraksi menggunakan berbagai pelarut akan menghasilkan komponen polifenol yang berbeda pula. Setiap tumbuh-tumbuhan memiliki struktur komponen fenolik yang berbeda. Ada komponen fenolik yang memiliki gugus -OH banyak dan ada pula komponen fenolik yang memiliki gugus -OH yang sedikit. Perbedaan jumlah dan posisi gugus hidroksil pada suatu senyawa antioksidan seperti fenol dan flavonoid, dapat mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Gugus -OH berperan dalam proses transfer elektron untuk menstabilkan dan meredam radikal bebas. Semakin banyak gugus -OH pada suatu senyawa fenol, maka kemampuan untuk meredam radikal bebas semakin tinggi.

Aktivitas peredaman radikal bebas biasanya dinyatakan sebagai persen inhibisi dari DPPH, tetapi dapat juga dinyatakan sebagai konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (IC_{50}). Nilai IC_{50} dianggap sebagai ukuran yang baik dari efisiensi antioksidan senyawa-senyawa murni ataupun ekstrak. Nilai IC_{50} dapat didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas, yaitu menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan aktivitas

antioksidan pada bahan yang diuji semakin besar (Molyneux, 2003). Nilai IC_{50} pada masing-masing ekstrak disajikan dalam Gambar 4.



Gambar 12. Nilai IC_{50} pada masing-masing ekstrak

Dari data hasil perhitungan persen inhibisi pada masing-masing ekstrak (Lampiran 5), diketahui bahwa fraksi etil asetat memberikan penghambatan paling besar yang ditandai dengan IC_{50} yang paling kecil di antara semua fraksi. Fraksi etil asetat memberikan penghambatan sebesar 242,68 ppm, ekstrak metanol memberikan penghambatan sebesar 256,88 ppm dan fraksi n-heksan memberikan penghambatan sebesar 308,2 ppm.

BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana tahapan berikutnya adalah ekstrak binahong yang potensial sebagai antioksidan akan diuji aktivitas antiinflamasi. Pengujian efek antiinflamasi praklinis dilakukan secara *in vivo* pada tikus putih jantan galur wistar. Inflamasi menggunakan karagenan sebagai penginduksi bengkak pada telapak kaki kanan tikus putih jantan. Penelitian akan difokuskan pada fraksi yang aktif untuk mendapatkan senyawa aktif antiinflamasi. Fraksi-fraksi aktif yang lebih kuat akan dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi dan HPLC menggunakan variasi adsorben dan sistem pelarut. Setiap tahap pemisahan dipandu dengan uji flavonoid dan uji aktivitas biologi. Isolat murni yang prospektif ditentukan strukturnya melalui studi spektroskopi. Uji spektroskopi yang dilakukan dengan alat UV-Vis, IR, MS, dan NMR akan mengungkap hubungan struktur dengan aktivitas biologisnya.

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan tahapan penelitian hingga laporan kemajuan ini dibuat, maka dapat disimpulkan :

1. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun binahong (*Anrederacordifolia* Ten. Steenis) adalah flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin.
2. Hasil uji toksisitas menunjukkan ekstrak methanol daun binahong (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis) bersifat toksik dengan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm (447,96ppm), ekstrak n-heksan dan etil asetat daun binahong bersifat tidak toksik dengan nilai $LC_{50} > 1000$ ppm (3728,29 ppm dan 12414,15 ppm). Kenaikan konsentrasi ekstrak diikuti dengan kenaikan rata-rata kematian larva udang (hewan uji).
3. Fraksi etil asetat memberikan penghambatan paling besar yang ditandai dengan IC_{50} yang paling kecil di antara semua fraksi. Fraksi etil asetat memberikan penghambatan sebesar 242,68 ppm, ekstrak metanol memberikan penghambatan sebesar 256,88 ppm dan fraksi n-heksan memberikan penghambatan sebesar 308,2 ppm.

7.2. Saran

Perlu dilanjutkan ke tahap berikutnya pada tahun kedua untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi. Perlu dilakukan isolasi fraksi yang aktif untuk mengetahui hubungan strukturnya dengan aktivitas antiinflamasi melalui studi spektroskopi .

DAFTAR PUSTAKA

- Aberoumand A, Deokule SS. 2008. Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan J of Nutr* 7: 582-585
- Bialangi, N., (2002), *Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Ocimum sanctum Linn (Labiatae).*, Laporan Hasil Penelitian dibiayai Dana DIKS tahun Anggaran 2002-2003. FPMIPA, IKIP Negeri Gorontalo
- Bialangi, N., (2004), *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Ocimum sanctum L. Asal Gorontalo.* Laporan Hasil Penelitian Dosen Muda Tahun Anggaran 2003-2004. FMIPA Universitas Negeri Gorontalo
- Bialangi, N., Musa, W.J.A., Subarnas,A., Ischak, N., (2008), *Studi Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologi Flavonoid dari Daun Tumbuhan Jarak Pagar (Jatropha curcas Linn) Asal Gorontalo.* Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Tahun Anggaran 2007-2008. FMIPA Universitas Negeri Gorontalo
- Harborne JB.1996. *Metode Fitokimia.* Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hidayat, (2011), *Prospek Obat Tradisional.* Available at <http://www.Pantonanews.com/418-prospej-obat-tradisional> [diakses tanggal 5 januari].
- Kee JL., Hayes ER. 1996. *Farmakologi.* Jakarta: EGC
- Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L.2003. the role of antioxidant phytonutrients in prevention of diseases. *Acta Biol Szeg* 47: 119-125
- Mufid Khunaifi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak daun binahong terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. UIN Malang
- Muhtadi, A., Subarnas, A., Sumiwi, S.A., (2008), *Penuntun Farmakologi.* Fakultas Farmasi Univ. Padjadjaran. Bandung.
- Mycek. 2001. *Farmakologi Ulasa Bergambar Edisi ke 2.* Jakarta : Widya medika.
- Rachmawati, S. 2007. *Studi Makroskopi, Dan Skrining Fitokimia Daun Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis.* Skripsi Tidak Diterbitkan Surabaya: Fakultas Farmasi UNAIR Surabaya.
- Syamsuhidayat, S.S dan Hutapea, J.R, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia,* edisi kedua, Departemen Kesehatan RI, Jakarta
- Wahyudin E., (2003). *Analgetika, Kursus Singkat “ Teknik Uji In Vivo Senyawa Bioaktif” untuk Dosen Perguruan Tinggi Negeri Kawasan Timur Indonesia di Makassar,* 16-28 Juni 2003. FMIPA UNHAS.
- Salimi YK., Zakaria FR., Priosoerjanto BP. (2012). Akitvitas Proliferasi Sel Limfosit (splenosit) dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Sorghum. Prosiding Seminar Nasional Aspek Budaya, kebijakan dan Filosofi Sains Jamu. ISSN No. 978-602-17935-0-3

Lampiran 1. Data Hasil Analisis Pengujian Kandungan Fenolik Total
Table 1. Data Kurva Standar Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
20,6	0,1297
41,2	0,3154
61,8	0,5323
82,4	0,7546
103	0,9315

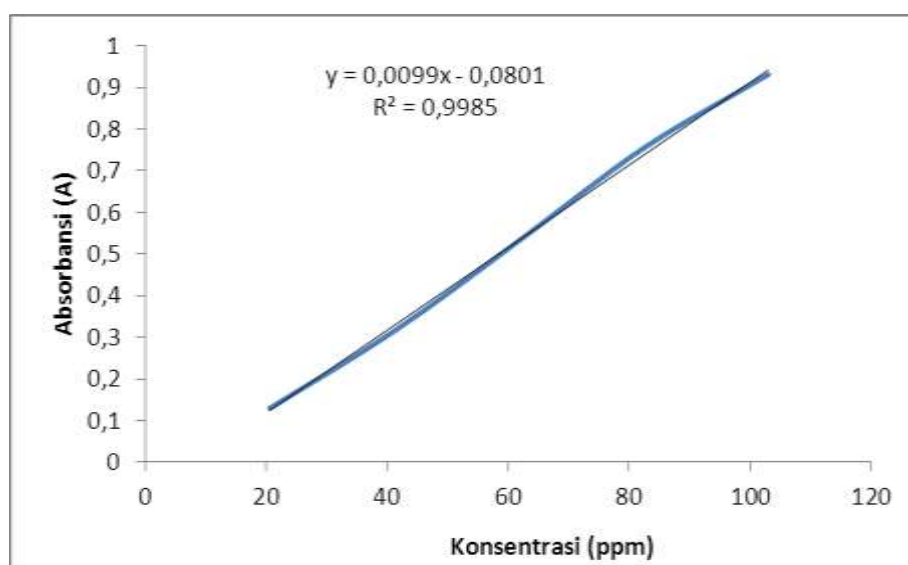


Table 1. Data Hasil Analisis Kandungan Fenolik Total pada tumbuhan binahong

Kode	B. Sampel (g)	Volume Larutan	Absorbansi	FP	Konsentrasi dari Kurva	Total Fenol (mg As galat/gr sampel)	Rata-rata ± SD
Fraksi n heksana	0,0255	10	0,7632	2,5	85,1818	83,51	84,6383 ± 1,59 ^b
	0,0243	10	0,7452	2,5	83,3636	85,77	
Fraksi etil asetat	0,0229	10	0,7703	2,5	85,8990	93,78	93,9852 ± 0,30 ^a
	0,0216	10	0,7256	2,5	81,3838	94,19	
fraksi metanol	0,0154	10	0,4756	2,5	56,1313	91,12	90,5901 ± 0,75 ^a
	0,0178	10	0,5547	2,5	64,1212	90,06	

Keterangan : Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Dukan $\alpha = 5\%$)

*Rata-rata ± SD

Contoh perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Total fenol fraksi air (TPC)} &= \frac{C \cdot V \cdot f}{g} \\
 &= \frac{85,18 \mu\text{g/ml} \times 10\text{ml} \times 2,5}{0,0255 \text{ g}} \\
 &= 83,51, \mu\text{ g/g sampel}
 \end{aligned}$$

Lampiran 2. Data Hasil Analisis Pengujian Aktivitas Antioksidan
Tabel 3. Data Kurva Standar Asam Askorbat

Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi yang sebenarnya (mg/ml) = x	Absorbansi Blanko	Absorbansi Standar	Abs B - Abs Std y
25	27,8	0,9957	0,9213	0,0744
50	55,6	0,9957	0,8421	0,1536
100	111,2	0,9957	0,6874	0,3083
200	222,4	0,9957	0,4987	0,497
400	444,8	0,9957	0,0965	0,8992

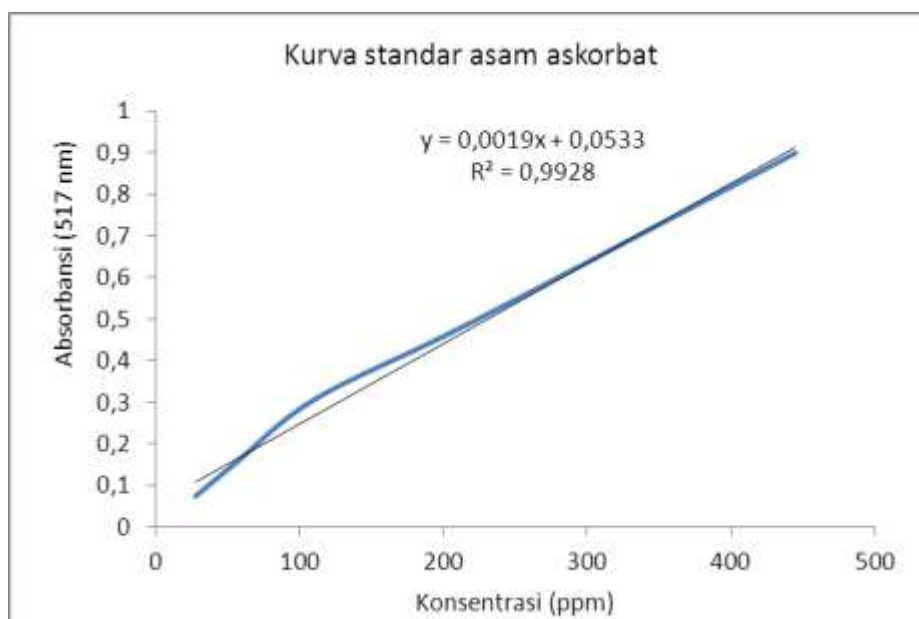


Table 4. Data Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Tumbuhan Binahong

Kode	Berat Sampel (g)	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Abs Blanko - Abs Sampel	Aktiv Antioksidan (AAEmg)	Aktiv Antioksidan (AEAC mg/g)	Rata-rata ± SD
n-heksan	0,0255	0,9957	0,8291	0,1666	161,6000	63,3725	63,85 ± 0,67
	0,0243	0,9957	0,8344	0,1613	156,3000	64,3210	
Etil asetat	0,0229	0,9957	0,7778	0,2179	212,9000	92,9694	94,98 ± 2,84
	0,0216	0,9957	0,7812	0,2145	209,5000	96,9907	
Metanol	0,0154	0,9957	0,8662	0,1295	124,5000	80,8442	81,29 ± 0,63
	0,0178	0,9957	0,8452	0,1505	145,5000	81,7416	

Keterangan : Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Ducan $\alpha = 5\%$)

*Rata-rata ± SD

Contoh perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas antioksidan (AEAC } \mu\text{g/g)} &= \frac{C.V}{g} \\
 &= \frac{161,6 \mu\text{g/ml} \times 10 \text{ ml}}{0,0255 \text{ g}} \\
 &= 63.372,5 \mu \text{ g/g sampel}
 \end{aligned}$$

Lampiran 3. Data Hasil Analisis Pengujian Aktivitas Antioksidan IC₅₀ tumbuhan binahong

Table 6. Data analisis Antioksidan fraksi n-heksan

Konsentrasi	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Peredaman Radikal bebas (% ASE)
25 ppm	0,9957	0,9012	9,49
50 ppm	0,9957	0,8321	16,43
100 ppm	0,9957	0,7511	24,57
200 ppm	0,9957	0,6031	39,43
400 ppm	0,9957	0,3954	60,29

Table 7. Data hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi etil asetat

Konsentrasi	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Peredaman Radikal bebas (% ASE)
25 ppm	0,9957	0,8512	14,51
50 ppm	0,9957	0,8041	19,24
100 ppm	0,9957	0,66622	33,09
200 ppm	0,9957	0,5321	46,56
400 ppm	0,9957	0,2856	71,32

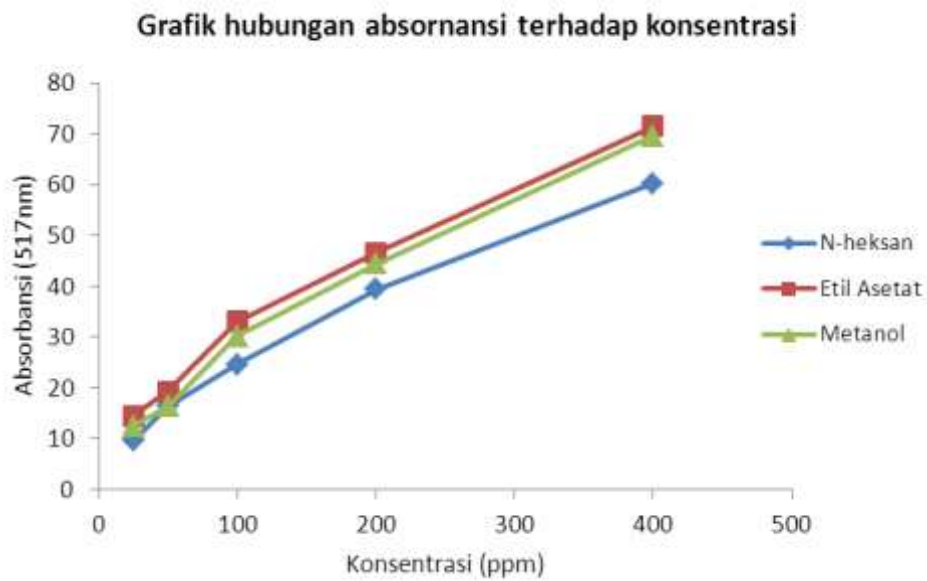
Table 8. Data hasil analisis aktivitas antioksidan ekstrak methanol

Konsentrasi	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Peredaman Radikal bebas (% ASE)
25 ppm	0,9957	0,8712	12,50
50 ppm	0,9957	0,8321	16,43
100 ppm	0,9957	0,6954	30,16
200 ppm	0,9957	0,5531	44,45
400 ppm	0,9957	0,3022	69,65

Contoh : Perhitungan % Inhibisi

- 25 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{0,9957 - 0,9012}{0,9957} \times 100\% \\ &= 9,49 \% \end{aligned}$$



1. Perhitungan IC_{50} (fraksi n-heksan)

$$\hat{Y} = 0.131x + 9,965$$

$$X = IC_{50} = (50 - 9.65) / 0.131 = 308.02 \text{ ppm}$$
2. Perhitungan IC_{50} (fraksi Etil Asetat)

$$\hat{Y} = 0.149x + 13,84$$

$$X = IC_{50} = (50 - 13.84) / 0.149 = 242.68 \text{ ppm}$$
3. Perhitungan IC_{50} (fraksi Metanol)

$$\hat{Y} = 0.151x + 11,21$$

$$X = IC_{50} = (50 - 11.21) / 0.151 = 256.88 \text{ ppm}$$

Lampiran 4. Data hasil statistik dengan menggunakan SPSS

1. Hasil Pengolahan Statistik Data Perhitungan Penentuan kandungan Fenolik total

ANOVA

Fenolik

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	89.505	2	44.753	41.960	.006
Within Groups	3.200	3	1.067		
Total	92.705	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Fenolik

Duncan^a

Fraksi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Fraksi Air	2	84.6400		
Fraksi Etil asetat	2		90.5900	
Fraksi N-heksan	2			93.9850
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

2. Hasil Pengolahan Statistik Data Perhitungan Aktivitas Antioksidan daun tanaman binahong

ANOVA

AEAC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	974.088	2	487.044	163.503	.001
Within Groups	8.936	3	2.979		
Total	983.025	5			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

AEAC

Duncan^a

Fraksi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Fraksi Air	2	63.8450		
Fraksi Etil asetat	2		81.2900	
Fraksi N-heksan	2			94.9800
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

LAMPIRAN 5. Dokumentasi Penelitian

Gambar 1. Pengambilan sampel daun binahong



Gambar 2. Tahap ekstraksi sampel dengan pelarut metanol



Gambar 3. Tahap fraksinasi dengan pelarut n-heksan (kiri) dan etil asetat (kanan)



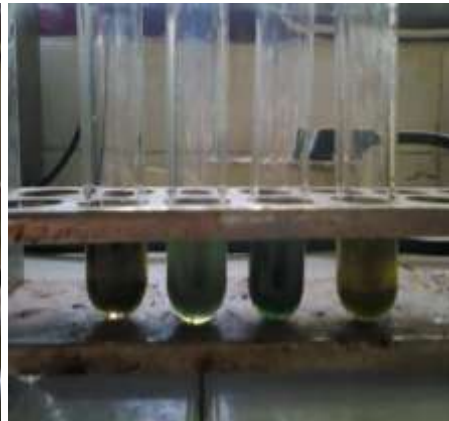
Gambar 4. Ekstrakkentalmetanol



Gambar 5. Hasil fraksinasi-heksandanetilasetat



(1)

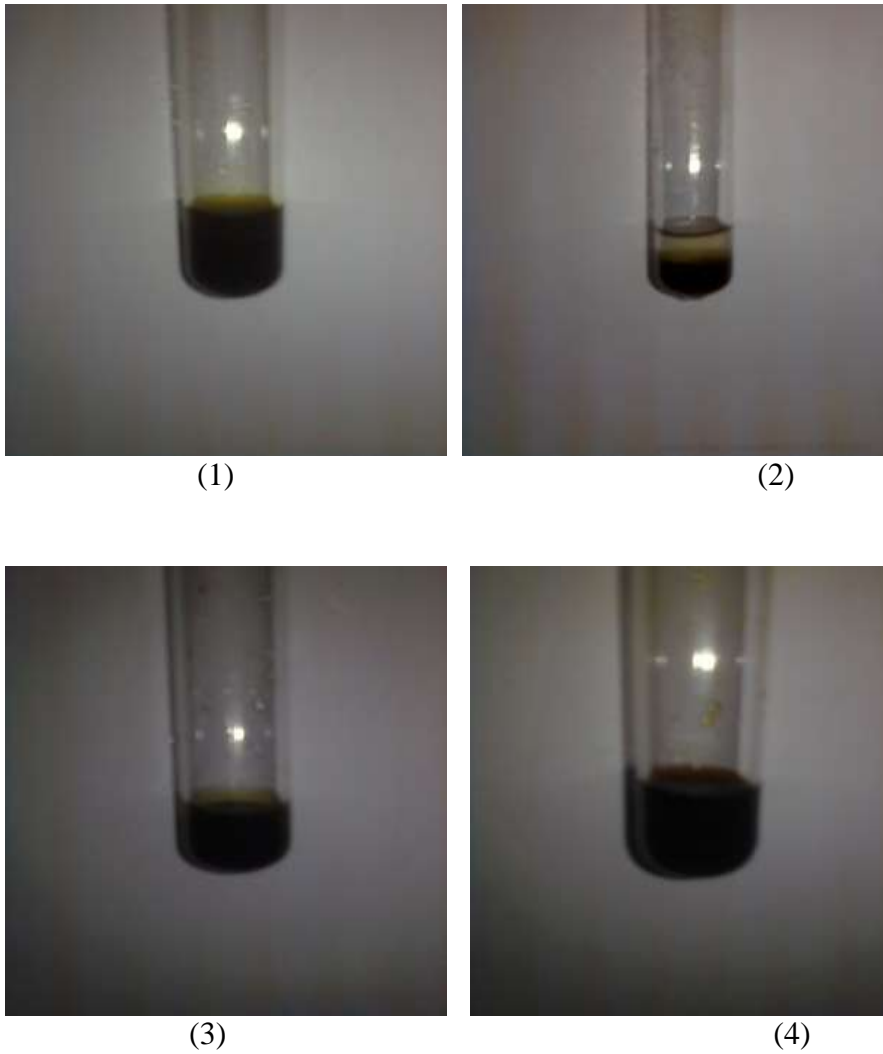


(2)



(3)

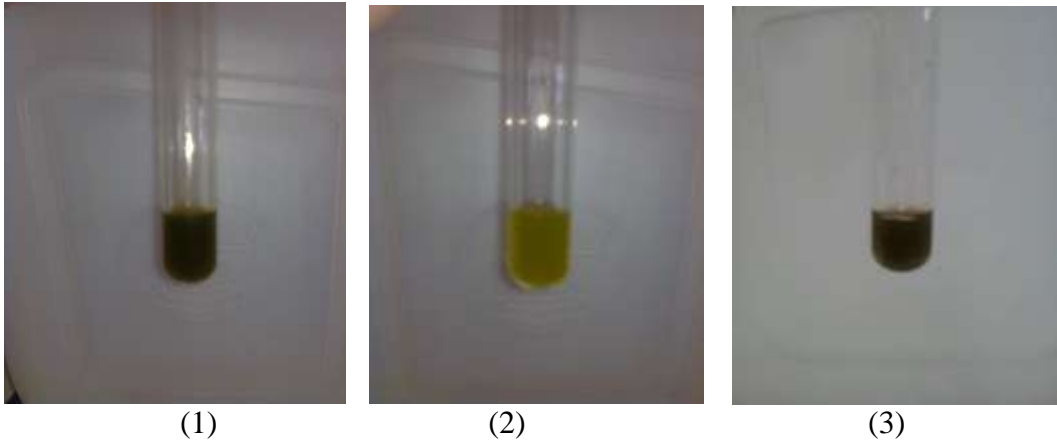
Gambar 6. Hasil uji flavonoid:(1) ekstrakmetanol, (2) fraksin-heksan, (3) fraksietilasetat.



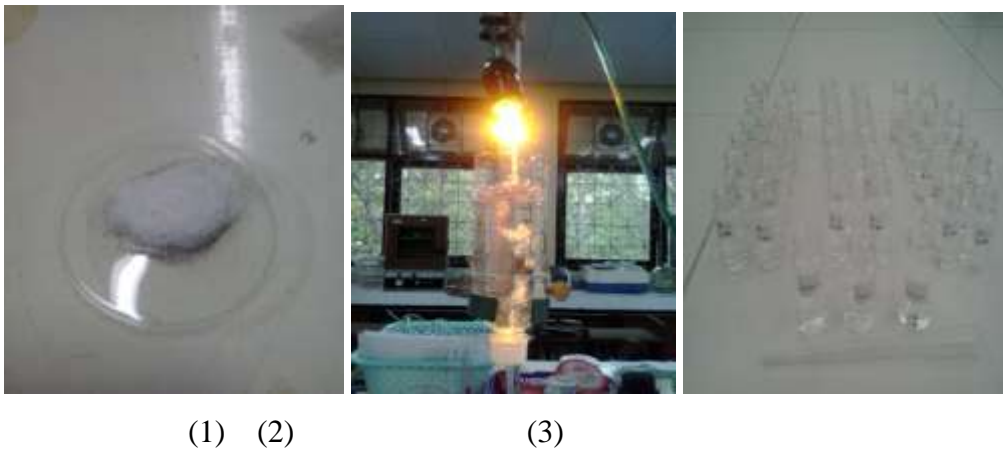
Gambar 6. Uji alkaloid : (1) penambahanreagen Hager, (2) penambahanreagen Meyer, (3) penambahanreagen Wagner, (4) penambahandragendrof.



Gambar 7. Uji fitokimia steroiddanterpenoid: Ekstrak metanol, fraksi n-heksandanfraksi etil asetat



Gambar 8. Uji fitokimia Saponin: (1) Ekstrak methanol, (2) fraksi n-heksan, (3) fraksi etil asetat



Gambar 9. Uji toksisitas (1) benih larva *Artemia Salina* L,(2) proses penetasan telur,(3) wadah uji.

LAMPIRAN 6
PERSONALIA TENAGA PENELITI DAN KUALIFIKASI

No	Nama dan Gelar Akademik	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi waktu Jam/ minggu	Uraian Tugas
1.	Dr. Yuszda K. Salimi M.Si./ 0023037106	Universitas Negeri Gorontalo	Biokimia	10/minggu Th. Ke-1,2	Isolasi, Uji Antioksidan dan antiinflamasi, Uji Hayati
2	Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si./ 0029056204	Universitas Negeri Gorontalo	Kimia Organik	8/minggu Th. Ke-1,2	Isolasi, Uji Hayati, Elusidasi Struktur

LAMPIRAN 7. DRAFT PUBLIKASI JURNAL

**Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Binahong
(*Anrederacordifolia* Ten. Steenis) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Yuszda K. Salimi, Nurhayati Bialangi
Universitas Negeri Gorontalo

Abstract: Binahong leave is traditional herb to cure wound, hemorrhoids, renal damage, diabetes, and Uric acid/Urate. It was already conducted a research that aimed to identify active compound contained in binahong leaves and analysis of toxicity characteristic through *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method in shrimp larvae of. It was preceded by extracting powder of binahong leaves (*A. cordifolia*) with methanol solvent. The technique used was maceration. Methanol extract was thickened and fractionated then phytochemical and toxicity test. The result of phytochemical test in binahong leaves showed that positive binahong contained flavonoid compound, steroid, terpenoid and saponin. Infrared analysis showed spectrophotometer OH functional group, C-H aromatic, C=C aromatic and C-OH of suspected flavonoid compounds. The result of toxicity test showed that methanol extract of binahong leaves was characterized by toxic for $LC_{50} \leq 1000$ ppm (447,96 ppm). Meanwhile, extract of n-hexane and ethyl acetate was not characterized by toxic for $LC_{50} > 1000$ ppm (3728,29 ppm and 12414,15 ppm). The increase of extract concentration was followed by the averaged increase of average mortality of shrimp larvae *Artemia Salina* Leach.

Keywords: *Anredera cordifolia*, fitokimia, BSLT, *Artemia salina* Leach.

Abstrak: Daun binahong merupakan obat tradisional untuk menyembuhkan luka, penyakit wasir, kerusakan ginjal, diabetes dan asam urat. Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam daun binahong dan analisis sifat toksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada larva udang *Artemia salina* Leach. Penelitian ini diawali dengan mengekstrak serbuk daun binahong (*A. cordifolia*) dengan pelarut metanol. Teknik yang digunakan adalah maserasi. Ekstrak metanol dipekatkan dan difraksinasi, dilakukan uji fitokimia dan uji toksisitas. Hasil uji fitokimia ekstrak daun binahong positif mengandung senyawa aktif flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin. Hasil analisis spektrofotometer IR menunjukkan gugus fungsi O-H, C-H aromatik, C=C aromatik, dan C-OH yang diduga adalah senyawa flavonoid. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik dengan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm (447,96 ppm). Sedangkan ekstrakn-heksan dan etil asetat bersifat tidak toksik dengan nilai $LC_{50} > 1000$ ppm (3728,29 ppm dan 12414,15 ppm). kenaikan konsentrasi ekstrak diikuti dengan kenaikan rata-rata kematian larva (hewan uji).

Kata Kunci : *Anredera cordifolia*, fitokimia, BSLT, *Artemia salina* Leach.

PENDAHULUAN

Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat modern. Hal ini disebabkan karena obat tradisional

memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada obat modern (Sari, 2006).

Tanaman yang biasa dimanfaatkan sebagai obat di antaranya adalah binahong (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis). Tanaman ini sering digunakan

oleh masyarakat Desa Toima Kecamatan Bunta Kabupaten Luwuk Banggai sebagai obat-obatan tradisional. Tanaman tersebut sengaja dibudidayakan oleh warga di pekarangan rumah mereka agar mudah diambil saat dibutuhkan. Binahong digunakan untuk menyembuhkan luka. Cara tradisional yg dilakukan adalah mengambil beberapa pucuk daun lalu direbus dan air rebusannya diminum.

Daun binahong memiliki ciri-ciri seperti: berdaun tunggal, memiliki tangkai yang pendek (*subsessile*), tersusun berseling-seling, daun berwarna hijau, bentuk daun menyerupai jantung (*cordata*), panjang daun 5-10 cm sedangkan lebarnya 3-7 cm, helaian daun tipis lemas dengan ujung yang meruncing, memiliki pangkal yang berlekuk (*emerginatus*), tepi rata, permukaan licin, dan bisa dimakan (Suseno, 2013).

Kandungan tanaman binahong belum banyak diketahui. Namun berdasarkan manfaat dan efek farmakologisnya jika dikonsumsi, binahong diduga memiliki kandungan antioksidan dan antivirus yang cukup tinggi. Ekstrak metanol daun binahong dapat menurunkan kadar glukosa darah (Sukandar, 2011., Makalalag, 2013). Salep ekstrak daun binahong memiliki efektivitas pada penyembuhan luka yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* (Paju, 2013). Hasil uji fitokimia ekstrak daun binahong ditemukan senyawa polifenol, alkaloid dan flavonoid. Pada konsentrasi 25 % dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, pada konsentrasi 50% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Khunaifi, 2010), juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* (Ainurrochmah dkk, 2013).

Senyawa bioaktif umumnya hampir selalu toksik pada dosis tinggi. Toksisitas tanaman berkaitan erat dengan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya. Meyer (1982) mengemukakan bahwa salah satu metode awal yang sering dipakai untuk mengamati toksisitas

senyawa dan merupakan metode penapisan untuk aktivitas anti kanker senyawa kimia dalam ekstrak tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dengan menggunakan cara Meyer. Metode ini ditujukan terhadap tingkat mortalitas larva udang *Artemia salina L.* yang disebabkan oleh ekstrak uji. Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC_{50} (*lethal concentration*) ekstrak uji, yaitu jumlah dosis atau konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan kematian larva udang sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam. Senyawa dengan $LC_{50} < 1000$ $\mu\text{g/ml}$ dapat dianggap sebagai suatu senyawa aktif (Lisdawati dkk, 2006).

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam daun binahong dan toksisitas senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun binahong dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

METODE

Bahan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun dari tanaman binahong (*Androdera cordifolia*) yang diperoleh dari Desa Toima Kecamatan Bunta Kabupaten Luwuk. Bahan kimia yang digunakan terdiri dari akuades, metanol, n-heksan, etil asetat, reagen Hager, reagen Dragendorf, reagen Mayer, reagen Wagner, asam asetat glacial, HCl pekat, serbuk Mg, NaOH, H₂SO₄ pekat, kloroform, dietil eter, kloroform amonikal.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, blender, seperangkat alat gelas, pipet mikro, pengaduk kaca, aluminium foil, statif, klem, lampu dan aerator.

Cara Kerja

Serbuk	halus
daun binahong sebanyak	250 gram
diekstraksi dengan cara	maserasi
menggunakan metanol.	Maserasi

dilakukan selama 3x24 jam, dimana setiap 24 jam ekstrak disaring, dan dimaserasi lagi dengan metanol yang baru. Ekstrak disatukan, sehingga diperoleh filtrat metanol. Filtrat metanol dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan menggunakan penguap vakum, diperoleh ekstrak kental metanol.

Ekstrak kental metanol disuspensi dengan metanol:air (1:2) dan dipartisi dengan menggunakan pelarut n-heksan, menghasilkan fraksi n-heksan. Fraksi n-heksan dievaporasi diperoleh ekstrak n-heksan. Fraksi air dipartisi dengan etil asetat sehingga diperoleh fraksi air dan fraksi etil asetat. Hasil partisi dari fraksi-fraksi tersebut dievaporasi pada suhu 30-40°C sampai diperoleh ekstrak air dan etilasetat. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh diuji fitokimia.

Ujitoksitasdilakukanterhadap larva udang *Artemiasalina* Leach. Telur *Artemia* sebanyak 2 gram dimasukkan dalam 400 ml air laut yang telah diaerasi dan diberi penerangan dengan cahaya lampu. Telur akan menetas dalam waktu 24-48 jam dan disiapkan untuk digunakan sebagai target uji toksisitas.

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Larutan stok dibuat dengan konsentrasi 2000 ppm. Daril larutan stok dibuat pengenceran hingga konsentrasi larutan menjadi 1000, 500, 200, 100, dan 50 ppm. 10 ekor larva udang dimasukkan dalam wadah uji yang berisi 5 ml larutan uji. Kontrol dibuat dengan memasukkan 10 ekor larva udang dalam 5 ml air laut tanpa penambahan ekstrak. Pengamatan dilakukan selama 24

jam dengan selang waktu 8 jam terhadap jumlah kematian larva udang. Analisis data dilakukan untuk mencari LC_{50} dengan analisis probit menggunakan program MC excel, dimana hubungan nilai logaritma konsentrasi bahan toksik uji dan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linear $y = a + bx$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi dan Fraksinasi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemisahan secara maserasi. Sampel daun binahong yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 250 gr dan dimaserasi dengan metanol 1 x 24 jam. Maserat dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum. Ekstrak kental metanol yang diperoleh seluruhnya adalah 24,04 gr dengan persentase rendemen 9,61%. Fraksinasi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat menghasilkan rendemen 9,2% dan 31,6% dengan berat masing-masing 0,92 gr dan 3,16 gr. Masing-masing ekstrak kental yang diperoleh dilakukan uji fitokimia (terlihat pada tabel 1).

Skrining fitokimia terhadap daun binahong telah dilaporkan oleh Astuti (2012), bahwa pada daun binahong memiliki senyawa fitokimia saponin, terpenoid, steroid, fenol, flavonoid dan alkaloid. Ekstrak etanol positif mengandung flavonoid (Rahmawati dkk, 2012). Ekstrak etanol dan n-heksan positif mengandung alkaloid (Titis dkk, 2013). (Murdiyanto, 2012), ekstrak n-heksan positif mengandung senyawa golongan triterpenoid. Ekstrak etil asetat daun binahong mengandung senyawa polifenol dan saponin (Sulistiyani dkk, 2012).

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Berbagai Ekstrak Daun Binahong

Ekstrak	Uji Fitokimia	Pereaksi	Standar	Hasil Uji
Metanol	Flavonoid	Mg-HCl	Perubahanwarna (hijau muda)	+++
		H ₂ SO ₄	Perubahanwarna (hijau tua)	++
		NaOH	Perubahanwarna (kuning muda)	-
	Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan	-
		Wagner	Tidak terbentuk endapan	+
		Hager	Tidak terbentuk endapan	++
	Saponin	Aquades panas	Terbentuk busa	
	Steroid	Liebarman Bauchar	Warna hijau	
	Terpenoid	Liebarman Bauchar	Warna merah kecoklatan	
	n- Heksan	Flavonoid	Mg-HCl	Perubahanwarna (hijautua)
H ₂ SO ₄			Perubahanwarna (hijautua)	++
NaOH			Perubahanwarna (hijautua)	+
Alkaloid		Mayer	Perubahanwarna (kuning)	-
		Wagner		-
		Hager		-
Saponin		Aquades panas	Tidak terbentuk endapan	-
Steroid		Liebarman Bauchar	Tidak terbentuk endapan	++
Terpenoid		Liebarman Bauchar	Tidak terbentuk endapan	-
		Liebarman Bauchar	Tidak ada busa/buih	
		Warna hijautua		
		Tidak terbentuk warna merah kecoklatan		

Etilasetat	Flavonoid	Mg-HCl	Perubahanwarna	+++
		H ₂ SO ₄	(hijaumuda)	+++
		NaOH	Perubahanwarna	++
	Alkaloid	Mayer	Perubahanwarna	-
		Wagner	(kuning)	-
		Hager		-
	Saponin	Aquades	Tidak terbentuk	
		panas	endapan	-
	Steroid		Tidak terbentuk	
			endapan	++
Terpenoid	Liebarman	Tidak terbentuk		
	Bauchar	endapan	-	
	Liebarman			
	Bauchar	Terbentuk		
		busa/buih		
		Warna hijautua		
		Tidak terbentuk		
		warna merah		
		kecoklatan		

Ket: (+++): IntensitasKuat, (++): Sedang, (+): Lemah, (-): TidakTerdeteks

Bagi manusia, kandungan metabolit sekunder dari tumbuhan dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit. Beberapa metabolit sekunder lainnya digunakan juga dalam memproduksi sabun, parfum, minyak herbal, pewarna, permen karet, dan plastik alami seperti resin, antosianin, tanin, saponin, dan minyak volatil.

Aktivitas flavonoid sebagai antimikroba yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka disebabkan oleh kemampuannya untuk menumbuk kompleks denganprotein ekstraseluler dan terlarut, dan dengan dinding sel. Flavonoid yang bersifat lipofolik mungkin juga akan merusak membran sel mikroba. Rusaknya membran dan dinding sel akan menyebabkan metabolit penting di dalam sel akan keluar, akibatnya terjadi kematian sel (Noorhamdani dkk, 2012).

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel

tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1995 dalam Khunaifi, 2010).

Terpenoid disebut sebagai terpene, adalah kelompok terbesar dari senyawa alami. Banyak terpen memiliki aktivitas biologis dan digunakan untuk pengobatan penyakit manusia. Terpenoid memiliki aktivitas biologis untuk melawan kanker, malaria, peradangan, dan berbagai penyakit menular (virus dan bakteri) (Wang dkk, 2005).

Saponin memiliki sifat antimikroba, baik triterpen maupun steroidal (Naidu, 2000 dalam Kusuma, 2012). Saponin memiliki rasa pahit menusuk dan menyebabkan bersin serta iritasi pada selaput lender (Kusuma, 2012).

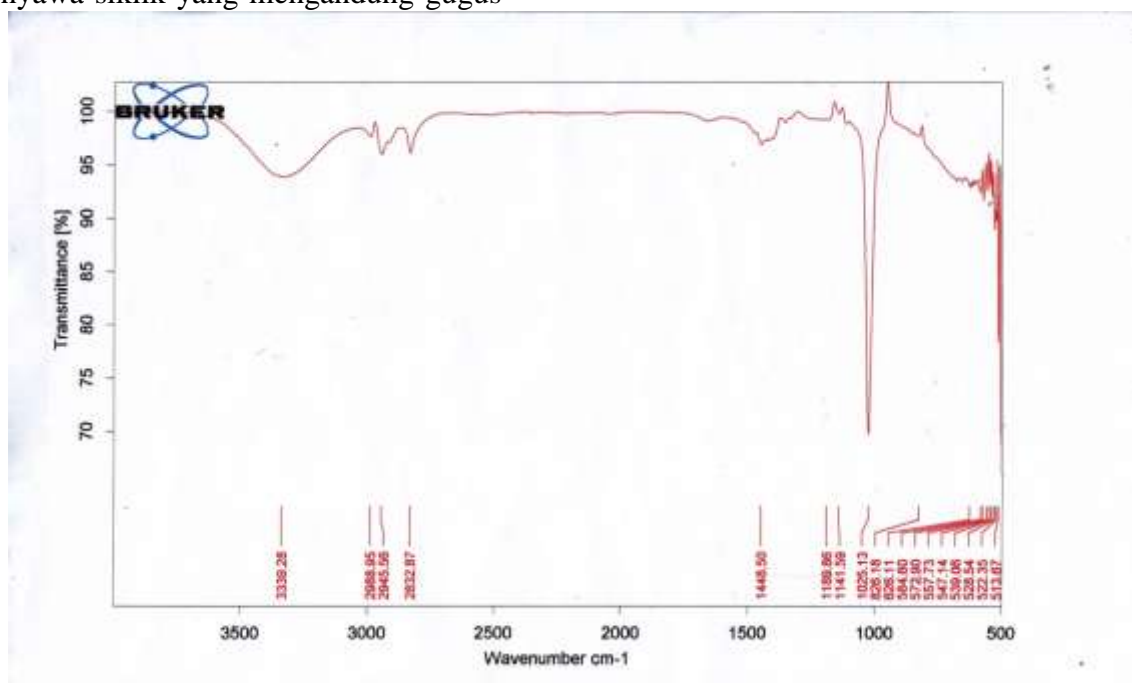
Identifikasi Gugus Fungsi

Gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak daun binahong diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer IR, yang merupakan alat untuk mengukur resapan radiasi inframerah pada pelbagai panjang gelombang. Skala pada spektra adalah bilangan gelombang, yang

berkurang dari 4000 cm^{-1} ke sekitar 670 cm^{-1} atau lebih rendah.

Spektrum inframerah pada gambar 1 memperlihatkan bahwa senyawa yang terkandung dalam daun binahong menunjukkan serapan melebar pada daerah bilangan gelombang $3339,28\text{ cm}^{-1}$ yang diduga adalah serapan uluran O-H. Serapan pada bilangan gelombang $1025,13\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya uluran C-OH siklik dengan pita yang kuat dan tajam ($990\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$). Pita serapan pada daerah bilangan ini dapat memberikan gambaran bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun binahong merupakan senyawa siklik yang mengandung gugus –

OH. Hal ini diperkuat oleh adanya serapan tajam dan lemah tekukan O-H aromatik pada panjang gelombang $1141,59\text{ cm}^{-1}$. Serapan uluran C-H alifatik yang tajam dan lemah muncul pada daerah bilangan gelombang $2988,95\text{ cm}^{-1}$ dan $2832,87\text{ cm}^{-1}$. Hal ini diperkuat oleh tekuk C-H aromatik pada serapan $626,18\text{ cm}^{-1}$. Serapan tajam dan lemah pada cincin aromatik C=C muncul pada daerah bilangan gelombang $1448,50\text{ cm}^{-1}$. Dengandemikian, senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol daun binahong diduga adalah senyawa aktif flavonoid.



Gambar 1. Spektrum Inframerah dari Ekstrak Daun Binahong

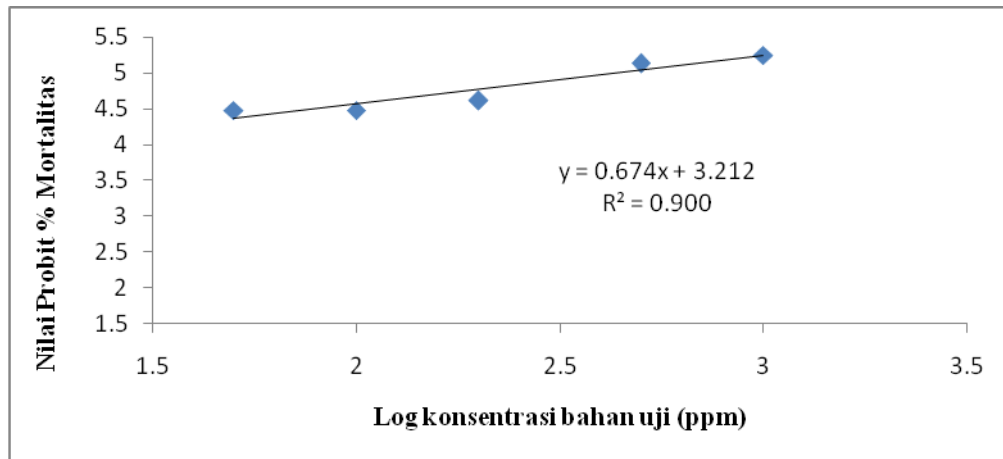
Uji Toksisitas

Toksisitas suatu ekstrak dinilai berdasarkan tingkat mortalitas larva udang yang digunakan sebagai bahan uji. Data dianalisis untuk memperoleh nilai LC_{50} . LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*) adalah tingkat konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji. Sehingga, apabila jumlah mortalitas lebih dari 50% dapat dipastikan nilai $LC_{50} < 1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ atau 1000 ppm . ketentuan ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut aktif (Hidayati, 2000). Hasil uji toksisitas ketiga ekstrak

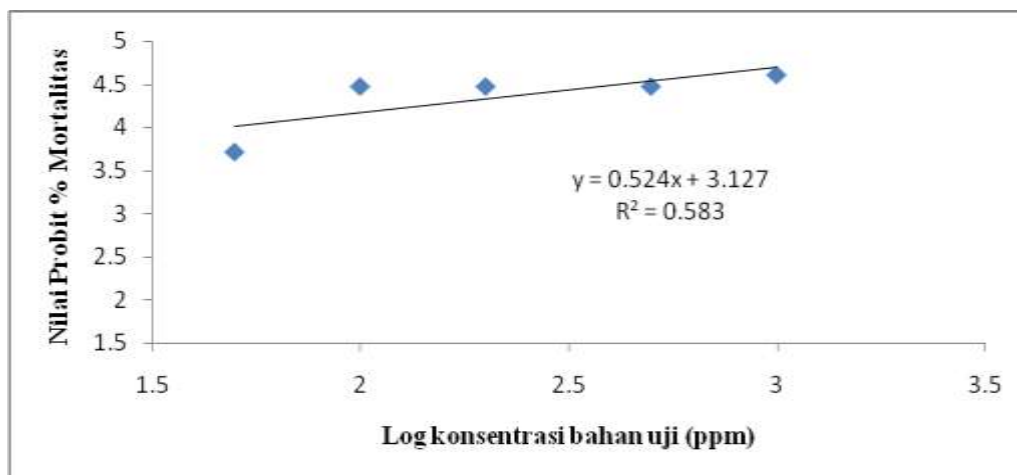
daun binahong dapat dilihat pada gambar 1, 2 dan 3 di bawah ini. Berdasarkan gambar tersebut dapat dilihat bahwa hasil analisis regresi linier pengaruh log konsentrasi terhadap nilai probit mortalitas didapatkan persamaan regresi linier untuk ekstrak metanol (gambar 2), n-hexsan (gambar 3) dan etil asetat (gambar 4) berturut-turut adalah: $y = 3,212 + 0,6744x$, $y = 3,1271 + 0,5244x$, $y = 3,5528 + 0,3535x$. Tingkat konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji (LC_{50}) untuk ekstrak

metanol, n-heksan dan etil asetat masing-masing adalah 447,96ppm, 3728,29ppm dan 12414,15 ppm. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik jika nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik dengan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm sedangkan ekstrak n-heksan dan etil asetat bersifat tidak toksik dengan nilai

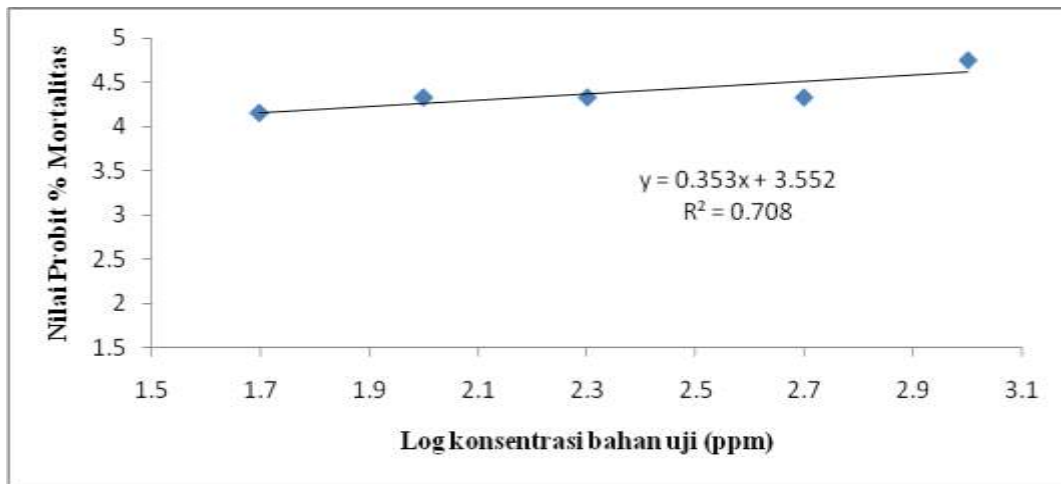
$LC_{50} > 1000$ ppm. Konsentrasi ekstrak memberikan pengaruh yang berbeda-beda pada kematian larva udang. Pada umumnya, semakin besar konsentrasi suatu larutan uji mengakibatkan naiknya angka kematian larva (hewan uji).



Gambar 2. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Binahong terhadap Probit Mortalitas.



Gambar 3. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Binahong terhadap Probit Mortalitas



Gambar 4. Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong terhadap Probit Mortalitas

Sifat toksik dari suatu tanaman berkaitan dengan kandungan senyawa aktif di dalamnya. Dari hasil uji fitokimia sebelumnya menunjukkan bahwa pada ekstrak daun binahong positif mengandung senyawa aktif flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut diduga toksik pada kadar tertentu. Cara kerjanya adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa ini juga menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Akibatnya, larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan (Padua, 1999 dalam Widiyanti, 2009). Pada manusia, senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik pada kadar tertentu, dapat mengakibatkan gangguan pada sistem metabolisme tubuh, dimana senyawa aktif tersebut dapat menjadi inhibitor pada enzim sehingga mengganggu proses replikasi DNA.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* Ten Steenis) adalah flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin.
2. Hasil analisis spektrofotometer IR menunjukkan gugus fungsi O-H, C-H aromatik, C=C aromatik, dan C-OH yang diduga adalah senyawa flavonoid.
3. Hasil uji toksisitas berdasarkan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menunjukkan ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik dengan nilai $LC_{50} \leq 1000$ ppm (447,96 ppm), ekstrak n-heksan dan etil asetat daun binahong bersifat tidak toksik dengan nilai $LC_{50} > 1000$ ppm (3728,29 ppm dan 12414,15 ppm). Kenaikan konsentrasi ekstrak diikuti dengan kenaikan rata-rata kematian larva (hewan uji).

Saran

Dengan adanya hasil penelitian yang menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik, maka perlu adanya penelitian lanjutan tentang isolasi senyawa aktif dari uji BSLT yang terdeteksi dari uji fitokimia serta uji toksisitas isolat murni pada tikus atau mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainurrochma, A., Evie, R., Lisa, L. 2013. *Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia) terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Shigella flexneri dengan Metode Sumuran*. LenteraBio. 3(2): 233-237.
- Astuti, Sri Murni. 2012. *Skrining Fitokimia dan Uji Aktifitas Antibiotika Ekstrak Etanol Daun, Batang, Bunga dan Umbi Tanaman (Anredera cordifolia (Ten) Steenis)*. Universitas Malaysia Pahang (UMP).
- Hidayati, L. Fitroh. *Penelusuran Bioaktivitas Senyawa Kandungan Tubuh Buah Ganoderma Lucidum Asal Kaliurang dan Lembang Berdasarkan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Skripsi. Teknologi Pertanian; Institut Pertanian Bogor.
- Khunaifi, Mufid. 2012. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. Malang. Sains dan Teknologi; Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim.
- Kusuma, R.A., Andrawulan, N. 2012. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Tokokak (Solanum torvum S.)*. Skripsi. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan. Institut Pertanian Bogor.
- Lisdawati, V., S. Wiryowidagdo, Broto, K. 2006. *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa*. Bul. Penel. Kesehatan. 3(34): 111-118.
- Makalalag, I. Wirasuasty., Adeanne, W., Weny, W. 2013. *Uji Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia Steen.) Terhadap Kadar Gula Darah Pada Tikus Putih Jantan*

Galur Wistar (Rattus norvegicus) yang Diinduksi Sukrosa. Jurnal Ilmiah Farmasi.1(2): 2302-2493.

- Murdianto, Agus Ria., Enny, F. Dewi, K. *Isolasi, Identifikasi Serta Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Dari Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steen) Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.* Universitas Diponegoro.
- Noorhamdani, As., R. Setyohadi, Akmal Fawzi Y.U. 2012. Uji Efektifitas ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia (Ten.) Steenis*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Klebsiellapneumoniae* sesara In Vitro. Pendidikan Dokter FKUB.
- Paju, Niswah., Yamlean, V.Y. Paulina., Kojong, Novel. 2013. *Uji Efektivitas Salep Ekstrak Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) pada Kelinci (Oryctolagus cuniculus) yang Terinfeksi Bakteri Staphylococcus aureus.* Jurnal Ilmiah Farmasi. 1(2): 2302-2493.
- Rahmawati, Lina., Enny, F. Dewi, K. 2012. *Isolasi, Identifikasi dan Uji Antioksidan Senyawa Flavonoid Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis).* Semarang. Universitas Diponegoro.
- Sari, Lusia Oktora Ruma Kumala. 2006. *Pemanfaatan Obat Tradisional Dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya.* Majalah Ilmu Kefarmasian. 1(3):01-07.
- Sukandar, E.Y., Atun, Q., Lady, L. 2011. *Efek Ekstrak Metanol Daun Binahong (Anredera cordifolia (TEN.) STEENIS) Terhadap Gula Darah Pada Mencit Model Diabetes Melitus.* Universitas Garut. Jurnal Medika Planta.4(1).
- Sulistiyani, Nanik., Lilies, K.W. 2012. *Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (Anredera scandens (L). Moq.) Terhadap Shigella flexneri Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis.*Jurnal Ilmiah Kefarmasian. 1(2): 1-16.
- Titis, Muhammad., Enny, F. Dewi, K. 2013. *Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktifitas Senyawa Alkaloid Daun Binahong (Anredera cordifolia (Tenore) Steenis).* Universitas Diponegoro. Chem Info. 1(1): 196-201.
- Widianti, Andika., Suhardjono. 2009. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Cabai Rawit (Capcisum frutescens) Terhadap Larva Artemia salina Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).* Semarang. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

ARTIKEL 2

PENENTUAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN BINAHONG ASAL GORONTALO

Yuszda K. Salimi, Nurhayati Bialangi

Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas MIPA, Universitas Negeri Gorontalo

Abstract :Binahong has been used traditional medicine to treat illnesses such as diabetes, gout, and kidney stones. The aim of this study was testing the activity of corn silk's herb extracts as natural antioxidant and measured the total phenolic content and their correlation. The sample used in the form of methanol extract, this fractionated to result n-hexane fraction, ethyl acetate and water. Extracts obtained by maceration method and test the total phenolic content and antioxidant activity. Total phenolic content of the methanol extract, n-hexane, ethyl acetate and water respectively was 94.45 ± 0.42 mg GAE / g, 2.27 ± 0.03 mg GAE / g, 140.25 ± 1.43 mg GAE / g, and 82.23 ± 0.12 mg GAE / g and antioxidant activity 46.44 ± 0.02 mg AEAC/g, 24.62 ± 0.30 mg AEAC/g, 47.57 ± 0.77 mg AEAC/g, and 29.81 ± 0.66 mg AEAC/g. IC₅₀ values of the extract was successively 131.20 ppm, 147.10 ppm, 159.85 ppm and 269.63 ppm. Correlation of total phenolic content and antioxidant activity of 93%.

Keywords: Phenolic, Antioxidant, GAE, AEAC, IC₅₀

Abstrak: Binahong merupakan obat tradisional untuk mengobati penyakit seperti diabetes, asam urat, dan batu ginjal. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak herba binahong sebagai antioksidan dan mengukur kandungan fenolik total serta korelasinya. Sampel yang digunakan berupa ekstrak metanol yang difraksinasi menghasilkan fraksi n-heksan, etil asetat dan air. Ekstrak diperoleh dengan metode maserasi dan dilakukan uji kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan. Kandungan fenolik total ekstrak metanol, n-heksan, etil asetat dan air secara berturut-turut adalah $94,45 \pm 0,42$ mg GAE/g, $2,27 \pm 0,03$ mg GAE/g, $140,25 \pm 1,43$ mg GAE/g, dan $82,23 \pm 0,12$ mg GAE/g dan hasil uji aktivitas antioksidannya adalah $46,44 \pm 0,02$ mg AEAC/g, $24,62 \pm 0,30$ mg AEAC/g, $47,57 \pm 0,77$ mg AEAC/g, dan $29,81 \pm 0,66$ mg AEAC/g. Nilai IC₅₀ pada ekstrak tersebut secara berturut-turut adalah 131,20 ppm, 147,10 ppm, 159,85 ppm dan 269,63 ppm. Korelasi kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan sebesar 93%.

Kata Kunci: Fenolik, antioksidan, GAE, AEAC, IC₅₀.

Pendahuluan

Radikal bebas sering dikaitkan dengan berbagai peristiwa fisiologis seperti peradangan, penuaan, dan penyebab kanker (Bhaigyabati dkk., 2011). Radikal bebas (*free radical*) adalah atom atau molekul yang mempunyai

elektron tidak berpasangan, terbentuk sebagai hasil antara (*intermediet*) dalam suatu reaksi organik melalui proses homolisis dari ikatan kovalen. Karena reaktivitasnya, senyawa radikal bebas akan segera mungkin menyerang komponen

seluler yang berada disekelilingnya, baik berupa senyawa lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, RNA, maupun DNA. Akibat lebih jauh dari reaktivitas radikal bebas adalah terjadinya kerusakan struktur maupun fungsi sel (Winarsi, 2007).

Tanpa disadari, dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus-menerus, baik berupa proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok dan lain-lain (Winarsi, 2007). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh ini bisa dihambat oleh antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh. Namun, dengan bertambahnya usia seseorang, sel-sel tubuh mengalami degenerasi yang berdampak pada menurunnya respon imun di dalam tubuh. Akibatnya radikal bebas yang terbentuk didalam tubuh tidak lagi diimbangi oleh produksi antioksidan. Oleh karena itu, tubuh kita memerlukan suatu antioksidan eksogen yang dapat diperoleh dari buah-buahan dan sayur-sayuran.

Konsumsi antioksidan dalam jumlah memadai dilaporkan dapat menurunkan kejadian penyakit degeneratif, seperti kardiovaskular, kanker, aterosklerosis, osteoporosis, dan lain-lain (Winarsi, 2007).

Penggunaan antioksidan sintetik Seperti BHT (*butylatedhydroxytoluen*), BHA (*butylatedhydroxyanisole*), dan

TBHQ (*tertbutylhydroxy quinone*) telah dibatasi pada produk-produk makanan karena dianggap memiliki efek karsinogenik (Andrawulan dkk., 1996). Hal ini yang mendorong berbagai penelitian untuk menemukan sumber antioksidan baru yang berasal dari alam yang diharapkan dapat mengganti antioksidan sintetik.

Binahong telah digunakan sejak dahulu sebagai obat tradisional. Sebagian masyarakat di daerah Gorontalo menggunakan binahong untuk mengobati penyakit diabetes, kolesterol, asam urat dan batu ginjal. Cara pengobatannya adalah binahong muda direbus dengan air, hingga air rebusan binahong tersisa sepertiga dari volume awalnya kemudian disaring dan diminum secara langsung.

Sholihah dkk., (2012) melaporkan bahwa binahong mengandung senyawa metabolit sekunder seperti fenol, flavonoid, tanin, alkaloid, terpenoid, saponin, dan glikosida. Senyawa-senyawa tersebut berdasarkan beberapa penelitian diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Atmoko dan Ma'ruf, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak herba binahong sebagai antioksidan dan mengukur kandungan fenolik total serta menganalisis korelasi kandungan fenolik

total terhadapaktivitasantioksidan. Pada penelitian ini binahong diekstraksidengan pelarut metanolkemudian dipartisi dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannyayaitu n-heksan dan etil asetat, selanjutnya dilakukan skrining fitokimia, penentuan kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan padamasing-masingekstrak.

METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia, Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Negeri Gorontalo selama ±4 bulan.

Alat dan Bahan

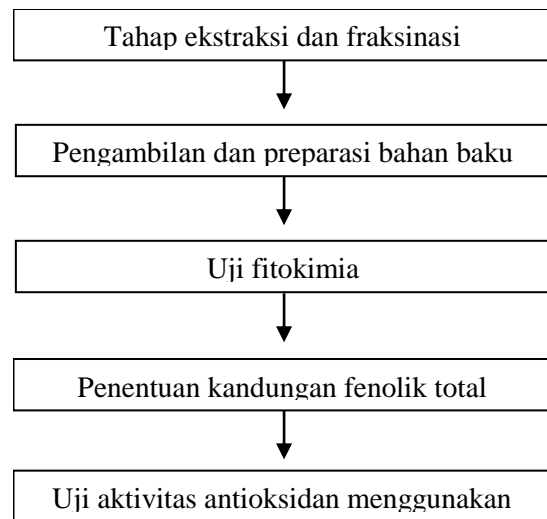
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah evaporator vakum,seperangkat alat gelas, spektrofotometer UV-VIS.

Bahan tumbuhan yang digunakan adalah binahong muda yang berumur ± 70 hari yang berasal dari daerah Gorontalo. Bahan kimia yang digunakan terdiri dari akuades, metanol, n-heksan, etil asetat, pereaksi alkaloid, FeCl_3 3%, asam asetat glacial, HCl pekat, serbuk Mg, NaOH, H_2SO_4 pekat, kloroform, dietil eter, kloroform amonikal, analisis antioksidan (DPPH, metanol p.a dan vitamin C sebagai antioksidan pembanding), dan analisis total fenolik

(asam galat, aquadest, Na_2CO_3 , reagen Follin-Ciocalteu, dan etanol p.a).

Tahap-Tahap Penelitian

Tahap-Tahap Penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:



Pengambilan dan Preparasi Bahan Baku

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah binahong dari binahong lokal Gorontalo. Tempat pengambilan sampel yaitu di pasar lokal Kota Gorontalo (pasar sentral). Binahong diambil yang masih segar dan dipisahkan ke dalam kantong plastik kemudian, segera dipreparasi di laboratorium kimia, Universitas Negeri Gorontalo (UNG). Umur binahong diperkirakan berumur 60 ± 70 hari, karena binahong tersebut dipanen saat masih muda. Kemudian binahong dipotong-potong kasar dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara

terbuka yang terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah kering, binahong dihaluskan dengan menggunakan penggiling hingga menjadi serbuk kasar. kemudian, dihitung randemen dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Randemen \%} = \frac{\text{Bobot Contoh (g)}}{\text{Bobot Total (g)}} \times 100\%$$

Serbuk binahong yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan pelarut metanol yang telah disiapkan.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Simplisia sebanyak 350 g dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol selama 4 x 24 jam, dimana setiap 24 jam ekstrak disaring dan residunya dimaserasi kembali dengan menggunakan metanol yang baru. Proses maserasi dibantu dengan pengadukan sesekali agar proses ekstraksi berlangsung dengan maksimal. Filtrat metanol hasil maserasi seluruhnya digabungkan kemudian dievaporasi dengan menggunakan alat penguap vakum pada suhu 30-40°C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol.

Tahap selanjutnya, Ekstrak kental metanol disuspensi dengan campuran metanol-air (1:2). Kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Hasil partisi dievaporasi pada suhu 30-40°C sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksan, etil asetat dan air. selanjutnya dihitung randemen saat hasil ekstraksi dan rendemen masing-masing fraksi.

Uji Fitokimia

Uji flavonoid

Ekstrak sebanyak 0,1 gr dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung ke dua, ke tiga dan ke empat berturut-turut ditambahkan NaOH, H₂SO₄ pekat dan serbuk Mg-HCl pekat. Perubahan warna mengindikasikan positif mengandung flavonoid (Harborne, 1987).

Uji alkaloid

Ekstrak kental sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan 10 ml kloroform amoniakal dan hasilnya di bagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung pertama diuji dengan pereaksi Hager, tabung kedua ditambahkan dengan 5 ml asam sulfat (H₂SO₄) 2 N. Bagian asam dipisahkan kedalam 3 buah tabung reaksi kemudian masing-masing diuji dengan tiga pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, dan pereaksi Wagner. Terbentuknya endapan positif mengandung alkaloid (Harborne, 1987).

Uji triterpenoid dan steroid

Sejumlah sampel dari masing-masing ekstrak dilarutkan dengan 2 ml dietil eter. Kemudian ditambahkan dengan 10 tetes asam asetat anhidrat (CH₃COOH) dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid, sedangkan warna merah atau ungu

menunjukkan adanya triterpenoid (Harborne, 1987).

Uji saponin

Ekstrak dari berbagai pelarut sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan alkohol kemudian perlahan-lahan ditetesi dengan dengan akuades panas sebanyak 10 tetes. Tabung reaksi dikocok sehingga terbentuk busa. Busa yang stabil selama 15 menit dan tidak hilang saat penambahan HCl menunjukkan adanya saponin (Harborne, 1987).

Uji fenol hidrokuinon

Sejumlah sampel dilarutkan 3 ml metanol kemudian ditambahkan FeCl₃ 3%, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru dan hitam yang kuat positif mengandung fenol hidrokuinon(Harborne, 1987).

Penentuan Kandungan Fenolik Total

Analisis kandungan fenolik total menggunakan metode Folin-Ciocalteu yang absorbansinya diukur pada panjang gelombang 765 nm (Pourmorad dkk; 2006).

Standar asam galat dibuat dengan variasi konsentrasi 5-125 ppm dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm. Prosedur pengukuran sampel dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 100-150 mg lalu ditambahkan dengan 0,5 ml metanol, 2,5 ml aquadest dan 2,5 ml reagent Folin-Ciocalteu 50%. Campuran didiamkan selama 5 menit

kemudian ditambahkan dengan 2 ml Na₂CO₃ 7,5% dan divorteks lalu diinkubasi selama 15 menit pada suhu 45°C. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 765 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Perhitungan kandungan fenolik total menggunakan rumus berikut :

$$TPC = \frac{C.V.f_p}{g}$$

Ket. :

c=konsetrasi Fenolik (nilai x)

v=volume ekstrak yang digunakan (ml)

fp =Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan mudah untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat, efektif dan praktis (Molyneux, 2003).

Antioksidan standar asam askorbat digunakan sebagai pembanding dibuat dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 ppm. Larutan ekstrak dan antioksidan pembanding asam askorbat (vitamin C) yang telah dibuat, masing-masing sebanyak 2,5 ml direaksikan dengan 2,5 ml larutan DPPH 1 mM dalam tabung reaksi. Sedangkan untuk larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 2,5 ml metanol dengan 2,5 ml larutan DPPH 1 mM. Semua campuran tersebut diinkubasi

pada suhu 37°C selama 30 menit dan terlindungi dari cahaya matahari. Kemudian, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm.

Perhitungan AEAC menggunakan rumus berikut :

$$AEAC = \frac{c \cdot v}{g}$$

Ket.:

AEAC= aktivitas antioksidan (mg as. askorbat/g sampel)

c = nilai AEAC (mg/L) = nilai x

v = volume larutan ekstrak (ml)

g = berat sampel yang digunakan (g)

Aktivitas antioksidan juga dinyatakan dalam IC₅₀, yaitu konsentrasi sampel yang dapat menurunkan/menangkap setengah radikal bebas. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidan sampel. Sampel dari masing-masing ekstrak dibuat dalam konsentrasi 25, 50, 100, 200, 400 ppm. Larutan ekstrak sebanyak 2,5 ml dicampurkan dengan 2,5 ml DPPH 1mM. Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan terlindungi dari cahaya matahari, diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm (Bhaigyabati dkk., 2011., Sudirman dkk., 2011). Persentase penghambatan radikal bebas (*persen inhibisi*) dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs blanko} - \text{abs sampel}}{\text{abs blanko}} \times 100\%$$

Analisis Statistik

Analisis statistik yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan program SPSS 19 dan MS excel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan dan Preparasi Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah binahong (*Zeamays L.*) yang berasal dari binahong lokal yang tumbuh di daerah Gorontalo. Binahong diambil dari binahong muda yang telah berumur 60-70 hari atau setelah binahong dipanen saat masih muda. Binahong dipotong-potong kasar agar proses pengeringan menjadi lebih cepat. Pengeringan binahong setelah pengambilan sampel selama ±3 hari.

Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara diangin-anginkan tanpa paparan sinar matahari secara langsung. Hal ini bertujuan agar senyawa fitokimia dalam sampel tidak mengalami kerusakan dan kadar air dalam sampel berkurang. Selain sampel lebih awet, pengurangan kadar air akan memudahkan pelarut menarik komponen bioaktif dalam sampel saat maserasi (Sudirman dkk, 2011).

Berat sampel segar yang diambil adalah 2,3 kg. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan alat penggiling untuk mendapatkan serbuk halus. Penghalusan sampel bertujuan untuk memaksimalkan

proses maserasi. Berat serbuk halus yang diperoleh adalah 386.92 gr.

Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemisahan secara maserasi. Sampel binahong yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 350 gr dan dimaserasi dengan metanol 4 x 24 jam dan setiap 1 x 24 jam pelarut metanol diganti dengan yang baru, penggantian pelarut setiap 24 jam dilakukan karena pelarut yang telah jenuh tidak akan menarik komponen fitokimia lagi. Maserat dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum. Ekstrak kental metanol yang diperoleh seluruhnya adalah 29,92 gr.

Fraksinasi

Tahap selanjutnya, ekstrak kental metanol sebanyak 10 gr disuspensi dengan campuran metanol:air (1:2) dan difraksinasi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat. Hasil dari partisi masing-masing pelarut kemudian dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum sehingga menghasilkan ekstrak kental n-heksan, etil asetat dan air (Tabel 1).

Tabel 1. Berat ekstrak kental hasil fraksinasi

No	Fraksi	Berat (gram)
1	N-heksan	0,68
2	Etil Asetat	2.11
3	Metanol-air	4.1

Rendemen

Rendemen merupakan persentase bagian bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dengan total bahan baku. Menurut Kusumawati dkk, (2008) Semakin tinggi nilai rendemen menandakan bahwa bahan baku tersebut memiliki peluang untuk dimanfaatkan lebih besar. Rendemen merupakan persentase sampel sebelum dan setelah perlakuan. Rendemen setelah pengeringan yaitu sebesar 16,82%. Pada tahap kedua (proses ekstraksi), rendemen ekstrak kental metanol sebesar 8,55%. Rendemen yang dihasilkan sangat kecil sehingga untuk menghasilkan ekstrak metanol memerlukan sampel banyak.

Hasil fraksinasi yang diperoleh, fraksi air memiliki rendemen yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksana dan etil asetat (Tabel 2). Hal ini dikarenakan, karena senyawa polar lebih terkonsentrasi pada fraksi tersebut. Nur dan Astawan (2011) mengemukakan bahwa tingginya rendemen ekstrak pada pelarut polar dikarenakan makromolekul gula sederhana seperti monosakarida dan oligosakarida ikut terlarut dalam pelarut polar namun tidak larut dalam pelarut *nonpolar*.

Tabel 2. Rendemen hasil perlakuan

Fraksi	% Rendemen
N-heksan	6,8
Etil Asetat	21,1
Metanol-air	41

Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Hasil uji fitokimia didapatkan bahwa binahong positif mengandung

flavonoid, alkaloid, triterpenoid, steroid, saponin dan fenol hidrokuinon. Namun, memiliki tingkat intensitas yang berbeda-beda pada setiap fraksi (Tabel 3). Standar intensitas warna dirujuk dari Harborne (1987).

Tabel 3. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Binahong (*Zeamays* l.)

No	Pereaksi	Fraksi				Standar (warna)
		M	N	E	A	
1	HCl + Serbuk Mg	+++	-	+++	+++	Perubahan warna
2	H ₂ SO ₄	+++	-	+++	+++	Perubahan warna
3	NaOH	++	-	++	++	Perubahan warna
4	Dragendroff	+	+	+	+	Endapan merah-jingga
5	Hager	++	+	++	++	Endapan putih
6	Mayer	+	+	+	+	Endapan putih kekuningan
7	Wagner	+	+	+	+	Endapan coklat
8	Saponin	++	-	++	+	Terbentuk busa/buih
9	Steroid	++	+	++	+	Warna hijau
10	Triterpenoid	++	-	++	+	Warna merah-coklat
11	Fenol Hidrokuinon	+++	-	+++	++	Warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat

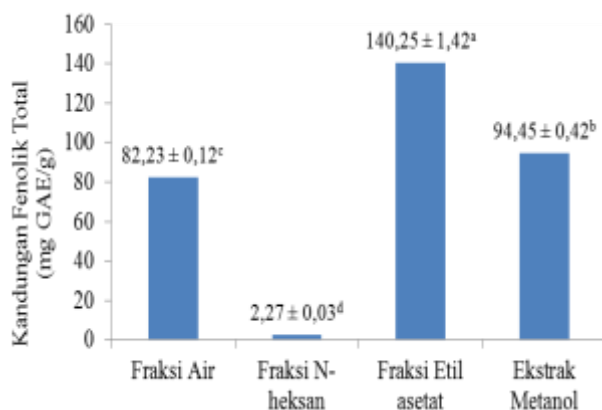
Keterangan : (M) metanol, (N) n-heksan, (E) etil asetat, (A) air.

(+++) intensitas kuat, (++) sedang, (+) lemah, (-) tidak terdeteksi

Penentuan Kandungan Fenolik Total

Penentuan kandungan fenolik total pada penelitian ini dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik dapat bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu (Mongkolsilp dkk., 2004).

Kandungan fenolik total pada masing-masing ekstrak dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE). GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan (Mongkolsilp dkk., 2004).



Ket.: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan $\alpha=5\%$). *(rata-rata \pm SD).

Dari data hasil perhitungan, ekstrak etil asetat memiliki total fenolik yang paling tinggi yaitu $140,25 \pm 1,42$ mg GAE/g. Artinya, dalam setiap gram ekstrak setara dengan $140,25$ mg asam galat.

Hasil uji statistik didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata kandungan fenolik total pada masing-masing fraksi ($\text{Sig.} \leq 0,05$). Hasil uji lanjut Duncan terhadap total fenol masing-masing ekstrak diketahui bahwa ekstrak etil asetat memberikan perbedaan yang nyata terhadap ekstrak metanol, fraksi air dan fraksi n-heksan. Perbedaan yang nyata yang dimaksud adalah kadar kandungan fenolik total. Urutan kandungan fenolik total dalam ekstrak secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat > ekstrak metanol > fraksi air > fraksi n-heksan.

Kelarutan senyawa fenolik bergantung pada pelarut yang digunakan. Komponen polifenol memiliki spektrum yang luas dengan sifat kelarutan yang berbeda-beda (Nur dan Astawan, 2011). Hal inilah yang menyebabkan sulitnya prosedur ekstraksi yang cocok untuk mengekstrak fenolik pada tanaman (Naczka dan Shahidi, 2004). Tingginya total polifenol pada pelarut etil asetat diduga adanya golongan polifenol yang memiliki berat molekul yang sama dengan pelarut etil asetat seperti tanin dan flavanol (Nur dan Astawan, 2011). Rohman, dkk (2006) melaporkan bahwa pelarut etil asetat sangat cocok untuk mengekstraksi senyawa fenolik, sehingga pelarut etil asetat digunakan untuk mengekstraksi senyawa fenolik yang terdapat dalam buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Rahman

dkk, (2012) juga melaporkan bahwa kandungan fenolik total yang terdapat di dalam ekstrak etil asetat Indian Plum (*Flacourtia jangomas* L.) lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol dan kloroform.

Perbedaan total fenolik pada masing-masing ekstrak dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan saat ekstraksi (Jang dkk., 2007). Ekstrak metanol memiliki kandungan fenolik total lebih kecil dibanding dengan ekstrak etil asetat. Hal ini disebabkan senyawa fenolik yang terdapat di dalam ekstrak metanol masih berhubungan dengan biomolekul (protein, polisakarida, terpen, klorofil, lemak dan komponen organik lainnya) dan harus menggunakan pelarut yang cocok untuk mengekstraknya (Koffi dkk., 2010).

Sementara Fraksi n-heksan memiliki kandungan fenolik total yang paling rendah di antara semua fraksi. Hal ini dikarenakan senyawa *nonpolar* seperti lemak, lilin, dan minyak terlarut dalam pelarut n-heksan (Nurdyana dkk., 2012). Senyawa-senyawa tersebut bukan merupakan golongan fenolik.

Senyawa fenolik yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan menghasilkan kandungan fenolik total yang tinggi pada ekstrak (Ukieyanna dkk., 2012). Pada penelitian ini kandungan fenolik total dari binahong terfokus pada fraksi etil asetat

yaitu $140,25 \pm 1,42$ (mg GAE/g ekstrak). Kandungan fenolik binahong di daerah Gorontalo ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan kandungan fenolik yang terdapat dalam binahong dari Iran dan Malaysia. Binahong Iran memiliki kandungan fenolik total sebesar $118,95 \pm 2,78$ (mg GAE/g sampel) pada ekstrak etanol (Ebrahimzadeh dkk, 2008). Sementara kandungan fenolik total pada binahong Malaysia sebesar 101,99 (mg GAE/g sampel) pada ekstrak metanol. Kandungan fenolik total pada suatu tanaman sering dihubungkan dengan aktivitasnya sebagai antioksidan. Kandungan fenolik total yang tinggi diharapkan dapat memberikan aktivitas antioksidan yang lebih baik.

Uji Aktivitas Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*elektron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal (Winarsi, 2007).

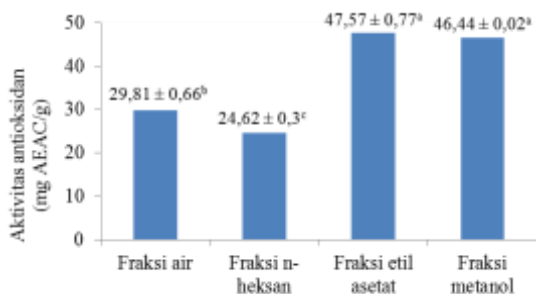
Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, mudah untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, efektif dan praktis (Molyneux, 2003).

Aktivitas diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas cahaya ungu DPPH yang sebanding dengan

pengurangan konsentrasi DPPH. Perendaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul difenil pikri hirazil dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Zuhra et al., 2008).

Uji aktivitas antioksidan menggunakan asam askorbat (vitamin C) sehingga satuan pengukuran dinyatakan sebagai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioksidant Capacity*).

Berikut ini adalah aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak binahong yang dinyatakan dalam AEAC.



Ket.: Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidakberbeda nyata (Uji Duncan $\alpha=5\%$). *(Rata-rata \pm SD).

Kapasitas antioksidan yang paling tinggi terdapat dalam fraksi etil asetat yaitu sebesar $47,57 \pm 0,769$ (mg AEAC/g). hal ini dapat diartikan bahwa 1 gram ekstrak kering setara dengan 47,75 mg vitamin C.

Hasil uji statistik menggunakan Anova satu jalur, mendapatkan bahwa ada perbedaan yang signifikan (berarti) antara

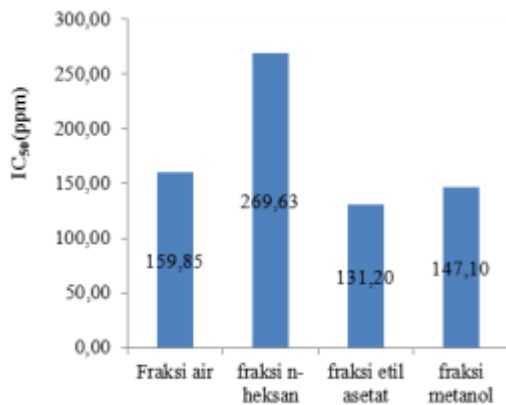
besar aktivitas antioksidan masing-masing fraksi, nilai probabilitas ($\text{Sig.} \leq 0,05$).

Untuk melihat perbedaan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Berdasarkan hasil analisis urutan aktivitas antioksidan secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat = ekstrak metanol > fraksi air > fraksi n-heksan.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan parameter IC_{50} dilakukan untuk memperkuat dugaan adanya aktivitas antioksidan dari binahong yang tumbuh di daerah Gorontalo. *Persen inhibisi* pada peredaman radikal bebas merupakan kemampuan suatu bahan dalam menghambat radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi bahan yang diuji, sedangkan IC_{50} merupakan parameter yang sering digunakan dalam menyatakan hasil dari pengujian DPPH.

Nilai IC_{50} yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin besar (Molyneux, 2003).

Dari data hasil perhitungan, diketahui bahwa fraksi etil asetat memberikan penghambatan paling besar yang ditandai dengan IC_{50} yang paling kecil di antara semua fraksi. Menurut Jun dkk, (2003) tingkat kekuatan antioksidan adalah kuat ($IC_{50} < 50$ ppm), aktif (IC_{50} 50-100 ppm), sedang (IC_{50} 101-250 ppm), Lemah (IC_{50} 250-500 ppm), dan tidak aktif ($IC_{50} > 500$ ppm).



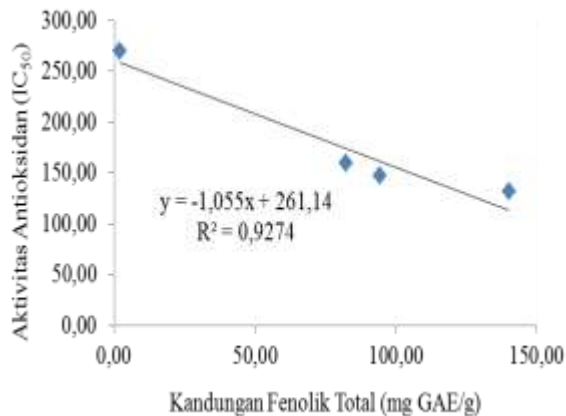
Senyawa kimia yang mempunyai aktivitas antioksidan ekstrak pada pelarut metanol dan etil asetat. Kemungkinan besar senyawa kimia tersebut adalah golongan flavonoid, terpenoid, saponin, dan fenol hidrokuinon. Seperti diketahui, senyawa-senyawa tersebut positif kuat pada kedua ekstrak tersebut melalui uji fitokimia (Tabel 3).

Penelitian terhadap aktivitas antioksidan dari binahong telah dilaporkan oleh Nurhanan dan Rosli (2012). Binahong yang telah diteliti adalah binahong muda yang tumbuh di daerah Malaysia. Berdasarkan hasil penelitian tersebut diketahui bahwa aktivitas antioksidan binahong Malaysia tergolong sedang. Persen inhibisi ekstrak metanol binahong yang berasal dari Malaysia yaitu 140,89 ppm lebih kecil jika dibandingkan dengan ekstrak metanol binahong yang berasal dari Gorontalo yaitu 147,1 ppm. Namun, dari segi aktivitasnya keduanya masih tergolong sedang. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas antioksidan binahong yang

berasal dari Gorontalo bisa menyamai kualitas binahong yang berasal dari Malaysia.

Hubungan Kandungan Fenolik Total Terhadap Aktivitas Antioksidan

Hubungan antara kandungan fenolik total (mg GAE/g sampel) total terhadap aktivitas antioksidan (IC₅₀) berdasarkan beberapa penelitian mempunyai korelasi yang sangat kuat. Beberapa penelitian tersebut di antaranya adalah: 1) Hadriyono dkk, (2011) melaporkan kandungan fenolik total pada buah magis memiliki korelasi yang sangat kuat terhadap aktivitas antioksidan dengan nilai korelasi sebesar 84%; 2) Angkasa dan Suleman (2012) melaporkan nilai korelasi antara kandungan polifenol dan aktivitas antioksidan adalah 99% pada tumbuhan daun hantap; dan 3) Ukieyanna dkk, (2012) menegaskan bahwa kandungan fenolik total memberikan kontribusi sebesar 77% terhadap aktivitas antioksidan pada tumbuhan suruhan. Hubungan kandungan fenolik total terhadap aktivitas antioksidan pada penelitian ini di tunjukan pada gambar di bawah ini.



Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa kandungan fenolik total memiliki hubungan yang sangat kuat terhadap aktivitas antioksidan. Kandungan fenolik total memberikan kontribusi sebesar 93% terhadap aktivitas antioksidan. Sisanya sebesar 7% ditentukan oleh variabel lain yang tidak diketahui. Kemungkinan besar 7% tersebut merupakan sumbangan dari senyawa lain yang bukan termasuk dalam golongan senyawa fenolik namun memiliki aktivitas antioksidan. Di antara senyawa-senyawa tersebut adalah triterpenoid, betakaroten, kartenoid dan vitamin di mana senyawa-senyawa tersebut diketahui terdapat pada binahong.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan tertinggi di antara semua fraksi yaitu $140,25 \pm 1,42$ mg GAE/g dan $47,57 \pm 0,76$ mg AEAC/g. Persen inhibisi (IC₅₀) fraksi etil asetat, ekstrak metanol, fraksi air, fraksi n-heksan secara

berturut-turut adalah 131,20 ppm, 147,10 ppm, 269,63 ppm. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat, metanol dan air tergolong sedang sementara fraksi n-heksan tergolong lemah. Kandungan fenolik total memberikan kontribusi sebesar 93% terhadap aktivitas antioksidan.

SARAN

Dengan diketahui bahwa binahong yang tumbuh di daerah Gorontalo memiliki aktivitas antioksidan yang hampir setara dengan aktivitas antioksidan binahong yang berasal dari Malaysia, maka peneliti menyarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut memurnikan senyawa antioksidan tersebut yang diduga merupakan senyawa golongan fenolik. Sehingga dapat menghasilkan suatu produk antioksidan alami yang diharapkan dapat mengganti antioksidan sintetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrawulan, N., H, Wijaya., Cahyono. 1996. *Aktivitas Antioksidan Dari Daun Sirih (Piper betle L.)*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 7(1):29-30.
- Angkasa, Dudung dan Sulaeman, Ahmad. 2012. *Pengembangan Minuman Fungsional Sumber Serat dan Antioksidan dari Daun Hantap (Sterculia oblongata R. Brown.)*.

- Skripsi. Bogor: Departemen Gizi Masyarakat Institut Pertanian Bogor.
- Astawan, Made., Kasih, A.L. 2008. *Khasiat warna-warni makanan*. Jakarta: Gramedia
- Atmoko, Tri., Ma'ruf, Amir. 2009. *Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan Orangutan Terhadap Larva Artemia salina L*. Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Samboja. 6(1):37-45.
- Bhaigyabati, T., T, Kirithika., J, Ramya., K, Usha. 2011. *Phytochemical constituents and Antioxidant Activity of Various Extracts Of Corn Silk (Zea mays. L)*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2(4):986-993
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., 2008 Iron Chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plant from iran. African Journal of Biotechnology. 7(18): 3188-3192
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung; Institut Teknologi Bandung
- Jang, H.D., Chang, K.S., Huang, C.L., Lee S.H., Su, M.S. 2007. *Principal Phenolic Phytochemical and Antioxidant Activities of Three Chinese Medicial Plants*. Food Chem. 103: 749-756.
- Jun, M.H.Y., J., Fong, X., Wan, C.S., Yang, C.T., Ho. 2003. *Camparison of Antioxidant Activities of Isoflavones Form Kudzu Root (Pueraria lobata O)*. Journal Food Science Institute of Technologist. 68:2117-2122.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. 2006. *Correlation between the in vitro antioxidant capacity and polyphenol content of aqueous extracts form Bulgarian herbs*. Phytother Res. 20:961-965.
- Koffi. E., Sea, T., Dodehe, Y., Singh, B. 2010. *Effect of Solvent Type on Extraction of Polyphenols form Twenty Three Ivorian Plants*. J Anim. Plant SCI 5(3): 550-558.
- Hadriyono, K. R. P., Kurniawati, A. 2011. *KarakterKulit Manggis, Kadar Polifenol dan Potensi Antioksidan Manggis Pada Berbagai Umur Buah dan Setelah Buah Dipanen*. Skripsi. Bogor: Departemen Agronomi dan Hortikultura Institut Pertanian Bogor.
- Kusuma, R.A., Andrawulan, N. 2012. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Tokokak (Solanum torvum S.)*. Skripsi. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan; Institut Pertanian Bogor.

- Molyneux, P. 2003. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.* Journal Science of Technology. 26(2):211-219.
- Mongkolsilp, S., Pongbupakit, I., Sae-lee, N., Sitthithaworn, W. 2004. *Radical Scavenging activity and total phenolic content of medical plants used in primary health care.* Jurnal of Pharmacy and Science. 9(1) :32-35.
- Naczka, M., Shahidi, F. 2004. *Extraction and Analysis of Phenolic in Food.* Journal of Chromatography A. 1054: 95-111.
- Nur, A.M., Astawan, M. 2011. *Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia) Dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik, Pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar.* Skripsi. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor.
- Nurdyana, M., Syafii, W., Sari, R.K. 2012. *Aktivitas Antioksidan Zat Ekstraktif dari Pohon Mindi (Melia azedarach L.).* Skripsi. Bogor: Departemen Hasil Hutan Institute Pertanian Bogor.
- Nurhanan, A.R., Wan Rosli W.I. 2012. *Evaluation of Polyphenol Content and Antioxidant Activities of Some Selected Organic and Aqueous Extracts of Cornsilk (Zea Mays Hairs).* Journal of Medicial and Bioengineering. 1(1): 48-51.
- Pourmorad, F., Hossenimehr, S.J., Shahabimajid, N. 2006. *Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants.* African Journal of Biotechnology. 5(11):1142-1145.
- Rahman, M., Habib, R., Hasan, R., Islam, A.M.T., Khan, I.N. 2012. *Comparative Antioxidant Potential Of Different Extracts Of Flacourtia Jangomas Lour Fruits.* Asian Journal of pharmaceutical and Clinical Research. 5(1):73-75.
- Rohman, A., Riyanto, S., Utari, D. 2006. *Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total dan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Buah Mengkudu Serta Fraksi-fraksinya.* Jurnal MFI. 17(3), 136-142.
- Sholihah, M.A., Nurhanan, A.R. Wan Rosli, W.I. 2012. *Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysian Zea mays hair extracts.* International Food Research Journal. 19(4): 1533-1538.
- Sudirman, S., Nurhjanah., Abdullah, A. 2011. *Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif kangkung air.*