

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI *n*-BUTANOL DAUN TIN (*Ficus carica* L.) VARIETAS BROWN TURKEY

Noveri Rahmawati^{1*}, Haris Nanda Prayoga¹, Musyirna Rahmah Nst¹
¹*Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Jl. Kamboja Simpang Baru-Panam, Pekanbaru, Riau 28928*
^{1*}*e-mail : ira11001@gmail.com*

ABSTRAK

Daun tin (*Ficus carica* L.) merupakan salah satu obat tradisional yang berpotensi sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder dan menguji aktivitas antioksidan senyawa isolat murni dari fraksi *n*-butanol daun tin. Ekstraksi dilakukan dengan metode fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Kemudian dilakukan pemisahan fraksi *n*-butanol dengan kromatografi kolom dan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Senyawa isolat murni diberi label HNF-3, berupa kristal, berwarna putih dengan titik leleh 189-191°C. Berdasarkan analisis data pemeriksaan fitokimia, spektroskopi UV, FT-IR dan ¹H-NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa HNF-3 merupakan senyawa golongan flavonoid glikosida dan memiliki aktivitas antioksidan kategori sedang dengan nilai IC₅₀ sebesar 160,613 µg/mL.

Kata Kunci: Flavonoid, Antioksidan, IC₅₀, *Ficus carica* L.

ABSTRACT

Tin leaf (*Ficus carica* L.) is one of the traditional medicines that has potential as an antioxidant. The purpose of this study was to isolate secondary metabolites and to test the antioxidant activity of pure isolates from the *n*-butanol fraction of tin leaves. Extraction was carried out by the fractionation method using *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. Then the *n*-butanol fraction was separated by column chromatography and antioxidant activity was tested using the DPPH method. Pure isolate compounds labeled HNF-3, in the form of crystals, white with a melting point 189-191 ° C. Based on phytochemical examination data analysis, UV spectroscopy, FT-IR and ¹H-NMR it can be concluded that the HNF-3 compound is a flavonoid glycoside group and has a moderate category of antioxidant activity with an IC₅₀ value of 160.613 µg / mL.

Keywords: Flavonoids, Antioxidants, IC₅₀, *Ficus carica* L.

PENDAHULUAN

Tumbuhan dan tanaman obat merupakan sumber bahan obat yang sejak dahulu dipergunakan secara tradisional untuk penyembuhan penyakit oleh masyarakat Indonesia secara turun temurun. Pengobatan dengan menggunakan bahan obat alami dipercaya lebih aman, karena mempunyai kadar toksik dan efek samping yang lebih rendah dibandingkan dengan menggunakan obat sintesis (Rustaman *et al.*, 2006). Meskipun telah banyak tumbuhan dan tanaman berkhasiat obat yang telah dilaporkan, namun diperkirakan masih banyak yang belum teridentifikasi berpotensi sebagai sumber obat baru dan perlu dilakukan penelitian ilmiah untuk mengetahui kandungan kimia dan bioaktivitas tumbuhan dan tanaman tersebut (Tjitrosoepomo, 1994).

Salah satu tumbuhan dan tanaman yang berpotensi sebagai bahan obat adalah spesies dari tanaman tin (*Ficus carica* L.). Tanaman tin merupakan anggota dari genus *Ficus* yang termasuk salah satu dari tanaman famili *Moraceae* yang banyak tersebar luas di daerah tropis dan sub tropis (Tian *et al.*, 2014). Di Indonesia salah satu varietas yang banyak dibudidayakan dari tanaman tin yaitu varietas Brown Turkey. Varietas Brown Turkey ini memiliki ciri ciri ukuran daun yang besar dengan warna buah ungu kecoklatan (Stover and aradhya, 2007). Secara tradisional daun tin (*Ficus carica* L.) digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan seperti, peluruh batu

ginjal, diabetes, mengurangi sesak nafas, diuretik, bisul, antitumor dan antikanker (Sirisha *et al.*, 2010).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan pada daun tanaman tin (*Ficus carica* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, fenolik, terpenoid, steroid dan saponin (Joseph and Raj, 2011). Dari hasil isolasi yang dilakukan terhadap tanaman *Ficus carica* L, terdapat beberapa kelompok senyawa bioaktif seperti senyawa asam fenolik seperti asam 3-O-caffeoylquinic dan 5-O-caffeoylquinic, kuersetin 3-O-rutinosida dan kuersetin 3-O-glukosida (Oliveira *et al.*, 2009). Menurut Solomon *et al.*, 2006 *Cyanidin-3-rhamnoglucoside* (C3R) sebagai antosianin utama dalam semua buah tanaman tin. dimana antosianin memberikan warna kuning, merah hingga coklat. Warna dari tanaman tin berkorelasi dengan jumlah total polifenol, total flavonoid dan total antosianin yang menunjukkan aktifitas antioksidan yang baik.

Senyawa-senyawa polifenol, flavonoid mempunyai potensi sebagai antioksidan, karena dapat mendonorkan hidrogen dari gugus hidroksilnya kepada radikal bebas (Sayuti dan Yanrina, 2015 ; Nicotra *et al.*, 2010). Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Khatimah, 2018 bahwa pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dari ekstrak tin (*Ficus carica* L.) varietas Brown Turkey diperoleh nilai IC₅₀ untuk ekstrak metanol adalah 78,13 µg/mL, fraksi *n*-heksan 492,80 µg/mL, fraksi etil asetat 16 µg/mL, fraksi *n*-butanol 40 µg/mL dan fraksi air

129,18 µg/mL. Pengujian aktivitas antioksidan juga dilakukan dari sepuluh varietas daun tanaman tin dengan nilai $IC_{50} < 50$ µg/mL secara keseluruhan menunjukkan bahwa ekstrak daun tin memiliki potensi antioksidan yang sangat kuat (Mahmoudi *et al.*, 2016).

Penelitian mengenai isolasi senyawa metabolit sekunder dari daun tanaman tin yang diyakini memiliki aktivitas antioksidan belum begitu banyak diteliti. Berdasarkan hasil skrining fitokimia daun tin fraksi *n*-butanol mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, fenolik dan terpenoid. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk mengisolasi dan uji aktivitas senyawa metabolit sekunder dari fraksi *n*-butanol daun tin (*Ficus carica* L.) varietas Brown Turkey.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan dari fraksi *n*-butanol daun tin (*Ficus carica* L.) varietas Brown Turkey. Sehingga diharapkan pada penelitian ini didapatkan senyawa yang berkhasiat sebagai antioksidan dan dapat dikembangkan dalam ilmu farmasi. Dengan demikian dapat meningkatkan nilai tambah pemanfaatan dari tin (*Ficus carica* L.) varietas Brown Turkey.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan November 2018 - Agustus 2019 di Laboratorium Penelitian dan Laboratorium Farmasi Bahan Alam Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Laboratorium FT-IR FMIPA Universitas Riau dan Laboratorium *Nanotechnology and Catalysis Research Centre* (NANOCAT) *University of Malaya* Kuala Lumpur.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi (Gopal®), rotary evaporator (Buchi®), lumpang, neraca analitik (Shimadzu®AUW-320), botol gelap, kolom kromatografi (Pyrex®), plat KLT GF254 (Merck®), chamber (Pyrex®), lampu UV penampak noda (Camag®), vial, pipa kapiler, alat penentu titik leleh (SMP-II), corong pisah (Pyrex®), plat tetes, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu® UV-1800), spektrofotometer FT-IR (IR Prestige-21®), Spektrometer Nuclear Magnetic Resonance (Bruker 600 MHz), 96 well microplate reader (Tristar LB 941 BERTHOLD®), pipet mikro dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

Bahan dan Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daun tin (*Ficus carica* L.) varietas Brown Turkey yang diperoleh dari peneliti sebelumnya (Khatimah, 2018). Bahan yang digunakan adalah metanol, *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, aquadest, asam asetat anhidrat, metanol, kloroform, kloroform amoniak, logam magnesium, larutan $FeCl_3$, HCl pekat, H_2SO_4 pekat, DPPH, norit, silika gel 60

(63-200 µm) (Merck®), plat KLT, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi Mayer dan $AlCl_3$.

Fraksinasi Ekstrak

Ekstrak kental metanol ditimbang sebanyak 15 gram dilarutkan dengan 50 mL *aquadest* kemudian dimasukan ke dalam corong pisah. Selanjutnya ditambahkan 50 mL *n*-heksana lalu dikocok secukupnya. Kemudian larutan dibiarkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air (lapisan bawah) dan lapisan *n*-heksana (lapisan atas). Kedua lapisan dipisahkan lalu ditampung di dalam *beaker glass*. Lapisan air ditambahkan lagi 50 mL *n*-heksana dan dilakukan hal yang sama sebanyak 3-5 kali pengulangan sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental *n*-heksana.

Lapisan air kemudian difraksinasi kembali dengan etil asetat dan dilakukan beberapa kali pengulangan seperti perlakuan di atas sehingga diperoleh fraksi air dan fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental etil asetat. Lapisan air kemudian difraksinasi kembali dengan *n*-butanol dan dilakukan beberapa kali pengulangan seperti perlakuan di atas sehingga diperoleh fraksi air dan fraksi *n*-butanol. Fraksi *n*-butanol kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental *n*-butanol.

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi *n*-Butanol

Fraksi *n*-butanol yang didapat, kemudian dilihat kandungan senyawa metabolit sekundernya menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen *n*-butanol : air : asam asetat (4:1:5). Untuk melihat noktah yang terdapat pada plat KLT tersebut dilakukan dengan penyinaran lampu UV λ_{254} . Tujuan dari pemeriksaan ini adalah untuk menggambarkan komponen senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi *n*-butanol.

Pemisahan Menggunakan Kromatografi Kolom

Pemisahan menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan rangkaian alat kromatografi kolom berupa tabung kaca berbentuk silinder yang ditegakkan dengan statif, kemudian sejumlah kapas dimasukkan ke dalam bagian paling bawah dari kolom, tidak terlalu padat atau terlalu longgar. Silika gel (fase diam) ditimbang sebanyak 50 kali bobot fraksi dan didispersikan dalam *n*-heksana. Silika gel yang telah basah dan menjadi bubur silika dimasukkan ke dalam kolom, kemudian diketok pada dinding luar kolom dan lakukan elusi 3-4 kali dengan eluen *n*-heksana agar diperoleh susunan yang rata dan padat tanpa ada gelembung udara di dalam kolom.

Sebanyak 1,5 g fraksi *n*-butanol dilakukan preadsorpsi dengan silika gel dan dimasukkan dalam

kolom. Kemudian dielusi secara bergradien atau SGP (*Step Gradien Polarity*) menggunakan kombinasi campuran pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Pemisahan dilakukan dengan bantuan gaya gravitasi. Hasil pemisahan ditampung dalam botol vial dan diberi nomor.

Pengujian Hasil Kromatografi Kolom dengan KLT

Hasil pemisahan kromatografi kolom dilakukan uji KLT. Vial-vial yang akan diuji ini diambil secara berurutan setiap 5 vial. Plat KLT diberi garis 0.5 cm ditepi atas dan bawahnya, lalu masing-masing di totolkan pada plat yang telah diberi nomor sesuai dengan nomor vial kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai sampai garis atas plat KLT, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Untuk melihat noktah yang dihasilkan dapat dilakukan dengan penyinaran lampu UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya ditentukan *R_f* dari masing-masing noktah. Vial yang mempunyai harga *R_f* yang sama digabung menjadi satu fraksi dan didapatkan 11 pola noda yang sama. Dipilih fraksi (F3) yang memperlihatkan pola noda dominan dan terdapat kristal yang terbentuk didasar vial. Fraksi ini selanjutnya dilakukan pemurnian dengan teknik pencucian dan rekristalisasi.

Pemurnian

Metode pemurnian hasil isolasi dilakukan dengan cara rekristalisasi. Rekristalisasi dilakukan untuk memurnikan padatan yang diperoleh dari hasil pengkoloman. Pemurnian rekristalisasi dilakukan terhadap Fraksi F3 dengan cara dilarutkan dengan sedikit pelarut yang melarutkan senyawa target yaitu metanol. Lalu ditambahkan pelarut yang tidak melarutkan dalam jumlah berlebih yaitu etil asetat. Adanya perbedaan kelarutan akibat penambahan pelarut lain akan menyebabkan senyawa utama mengkristal lebih dahulu. Dilakukan pemisahan antara kristal yang terbentuk dengan larutan pengotor dengan dipipet kedalam vial cucian. Kristal yang diperoleh dicuci berulang dengan pelarut yang melarutkan pengotornya lalu dikeringkan sehingga diperoleh senyawa murni yang diberi label HNF-3. Senyawa murni diidentifikasi dengan KLT menggunakan tiga eluen berbeda kemudian dimonitoring dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm.

Identifikasi Senyawa

Senyawa murni yang diperoleh, dilakukan pemeriksaan organoleptis, pemeriksaan sifat fisika dan kimia dan karakterisasi menggunakan metode spektroskopi UV, spektroskopi IR dan spektroskopi ¹HNMR.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL larutan metanol lalu disimpan di dalam vial gelap sehingga didapatkan larutan DPPH

dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan tersebut kemudian diencerkan menjadi 80 µg/mL dengan cara memipet sebanyak 0,8 mL larutan induk DPPH ke dalam labu takar 10 mL. Kemudian volume larutan dicukupkan sampai tanda batas.

b. Pembuatan Larutan Vitamin C

Vitamin C sebagai antioksidan pembanding ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 µg/mL kemudian diencerkan menjadi 100 µg/mL dengan cara dipipet sebanyak 1 mL larutan induk vitamin C ke dalam labu takar 10 mL kemudian volume larutan dicukupkan sampai tanda batas. Pengujian dilakukan dengan 6 seri konsentrasi, yaitu 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL dan 3,125 µg/mL. Variasi konsentrasi larutan uji disiapkan melalui pengenceran bertingkat di dalam *96 wells microplate* menggunakan pipet mikro *multichannel*.

c. Persiapan Larutan Sampel

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap senyawa murni HNF-3 sebanyak 2 mg dilarutkan dalam 2 ml metanol sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Pengujian dilakukan dengan 6 seri konsentrasi, yaitu 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL dan 31,25 µg/mL. Variasi konsentrasi uji disiapkan melalui pengenceran bertingkat di dalam *96 well microplate* menggunakan pipet mikro *multichannel*.

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan *microplate reader two fold delution* dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) (Zhang *et al.*, 2006) pada panjang gelombang 517 nm. Sebanyak 100 µL larutan sampel 1000 µg/mL dipipet kedalam baris A (plate terdiri dari baris A-H masing-masing berjumlah 12 sumur). Sebanyak 50 µL metanol dimasukkan pada masing-masing sumur pada baris B-F. Baris A dipipet sebanyak 50 µL dan dimasukkan ke baris B, baris B dipipet 50 µL baris C dan dilakukan sampai ke baris F, baris F dipipet 50 µL dan dibuang, sehingga diperoleh masing-masing konsentrasi 1000; 500; 250; 125; 62,5 dan 31,25 µg/mL. Sedangkan baris G-H diisi dengan MeOH 50 µL. Baris A-G ditambahkan DPPH sebanyak 80 µL dengan konsentrasi 80 µg/mL, kemudian diinkubasi selama 30 menit. Aktivitas penangkapan radikal diukur sebagai penurunan absorbansi DPPH dengan *microplate reader*. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu asam askorbat dengan konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; 62,5 dan 3,125µg/mL (Zhang dkk, 2006).

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan data hasil uji disajikan dalam bentuk tabel dan gambar mengenai organoleptis, sifat fisika, sifat kimia, analisis

spektroskopi dan uji aktivitas antioksidan senyawa isolat.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persen inhibisi (% inhibisi) dengan rumus sebagai berikut (Molyneux, 2004):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100 \%$$

Keterangan:

Abs Kontrol = Absorbansi DPPH

Abs Sampel = Absorbansi DPPH dalam larutan uji

Setelah diperoleh persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya dibuat grafik dengan menghubungkan nilai Ln konsentrasi pada sumbu x dengan % inhibisi pada sumbu y, untuk mendapatkan persamaan regresi linear $y = bx \pm a$.

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari nilai x setelah mengganti y dengan 50 (Molyneux, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil dan Pembahasan

Hasil fraksinasi 15 gram ekstrak kental daun tin (*Ficus carica* L.) dari masing-masing pelarut dihasilkan beberapa fraksi, yaitu fraksi *n*-heksana sebanyak 4,231 gram, fraksi etil asetat sebanyak 5,146 gram, fraksi butanol sebanyak 1,654 gram, dan fraksi air sebanyak 3,658 gram. Hasil pemeriksaan kandungan senyawa metabolit sekunder menunjukkan bahwa fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol dan fraksi air mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, dan terpenoid. Sedangkan pada fraksi *n*-heksana mengandung alkaloid dan steroid.

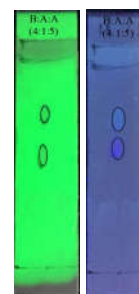
Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Metabolit Sekunder Fraksi Daun Tin (*Ficus carica* L.) Varietas Brown Turkey

NO	Metabolit sekunder	Hasil Pengamatan			
		Fraksi <i>n</i> -heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi <i>n</i> -butanol	Fraksi Air
1	Alkaloid	(+)	(+)	(+)	(+)
2	Fenolik	(-)	(+)	(+)	(+)
3	Flavonoid	(-)	(+)	(+)	(+)
4	Saponin	(-)	(-)	(-)	(-)
5	Terpenoid	(-)	(+)	(+)	(+)
6	Steroid	(+)	(-)	(-)	(-)

Keterangan : (+) = Terbentuk warna

(-) = Tidak terbentuk warna

Selanjutnya, dilakukan pengujian fraksi *n*-butanol daun tin menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Pada pengerjaan kromatografi lapis tipis, digunakan fase gerak berupa pelarut organik dengan berbagai perbandingan. Dengan demikian, dapat dilihat pemisahan yang baik dari fraksi *n*-butanol daun tin. Untuk melakukan penjenjuran fase gerak, bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas saring maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh. Pengamatan dilakukan dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm (Gandjar dan Rohman, 2007). Pengerjaan KLT dengan cara melarutkan sedikit fraksi *n*-butanol dalam pelarut yang melarutkan kemudian ditotol pada plat KLT, lalu plat dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen *n*-butanol : asam asetat glasial : air dengan pebandingan 4:1:5. Setelah itu plat dikering anginkan dan diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Hasil ini menunjukkan ada beberapa noda senyawa pada fraksi *n*-butanol daun tin.



Gambar 1. Profil KLT Fraksi *n*-Butanol *Ficus carica* L. dengan Lampu Sinar UV 254 nm dan 366 nm

Selanjutnya elusi pada kolom dimulai dengan pelarut yang bersifat non polar yaitu *n*-heksana 100%, kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap

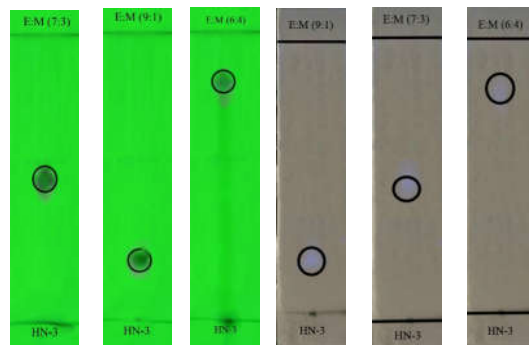
dengan menambahkan pelarut yang lebih polar, n-heksana : etil asetat, eluen yang digunakan dimulai n-heksana : etil asetat (8:2), n-heksana : etil asetat (6:4), n-heksana : etil asetat (3:7), dan seterusnya sampai etil asetat 100%. Pada saat menggunakan eluen etil asetat 100% fraksi mulai ditampung kedalam vial pertama, hal ini dikarenakan senyawa mulai turun pada eluen tersebut. Kemudian dilanjutkan dengan eluen etil asetat : metanol (9:1), etil asetat : metanol (8:2), etil asetat : metanol (7:3), etil asetat : metanol (6:4), etil asetat : metanol (5:5), etil asetat : metanol (4:6), etil asetat : metanol (3:7), etil asetat : metanol (2:8), etil asetat : metanol (1:9) sampai perbandingan metanol 100%.

Hasil kromatografi kolom ditampung pada vial yang telah diberi nomor kemudian dibiarkan menguap. Jumlah hasil kromatografi kolom yang diperoleh sebanyak 200 vial, selanjutnya dilakukan uji KLT dengan jarak tiap 5 vial secara berurutan dimulai dari vial pertama, noda yang timbul dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Vial yang memiliki pola dan bentuk noda yang sama digabungkan menjadi satu fraksi sehingga dari hasil penggabungan didapat 11 fraksi gabungan dan fraksi hasil gabungan di KLT kembali. Fraksi gabungan dari F1 sampai F11 yaitu : F1 (vial 21-27), F2 (vial 28-32), F3 (vial 33-40), F4 (vial 45-50), F5 (vial 55-65), F6 (vial 70-75), F7 (vial 80-100), F8 (vial 105-110), F9 (vial 115-145), F10 (vial 150-160) dan F11 (vial 165-200). Pada vial 33-40 (F3) terbentuk kristal putih pada dasar vial, sehingga diperoleh senyawa yang diberi label senyawa HNF-3.

Dari hasil isolasi fraksi n-butanol daun tin (*Ficus carica L.*) penelitian difokuskan pada fraksi ke-3 (F3) karena didapatkan adanya kristal pada dasar vial. Kristal pada fraksi ke-3 ini kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Teknik pengerjaan pada proses rekristalisasi ini yaitu dengan cara menambahkan sedikit pelarut metanol kemudian ditambahkan pelarut etil asetat dengan jumlah volume yang lebih agar senyawa terpisah dari pengotornya. Terbentuk dua lapisan, bawah kuning kecoklatan dan atas putih susu, dipisahkan dengan mengambil lapisan kuning lalu biarkan lapisan putih menguap didalam vial. Pemilihan pelarut tersebut dikarenakan sifat senyawa larut dalam metanol sehingga pengotor dapat dipisahkan dengan menambahkan pelarut yang berbeda yaitu etil asetat. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sampai didapatkan senyawa murni.

Senyawa murni HNF-3 yang didapat dimonitor kembali pada plat KLT di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm untuk melihat kemurnian dari senyawa tersebut yang akan menunjukkan satu noda tanpa adanya noda lain yang mengganggu. Berdasarkan hasil profil KLT senyawa HNF-3 dengan tiga sistem eluen berbeda yaitu etil asetat : metanol (9:1) memberikan nilai Rf sebesar 0,230; dengan etil asetat : metanol (7:3) memberikan nilai Rf sebesar 0,654; dan dengan etil asetat : metanol

(6:4) memberikan nilai Rf sebesar 0,743 (Lampiran 12). Hasil KLT untuk ketiga sistem eluen yang berbeda masing-masing menunjukkan pola noda yang tunggal. Hal ini membuktikan bahwa senyawa HNF-3 dapat dikategorikan sudah murni.



Gambar 2. Profil KLT Senyawa Murni HNF-3 dengan Berbagai Perbandingan dengan Lampu Sinar UV 254 nm dan 366 nm.

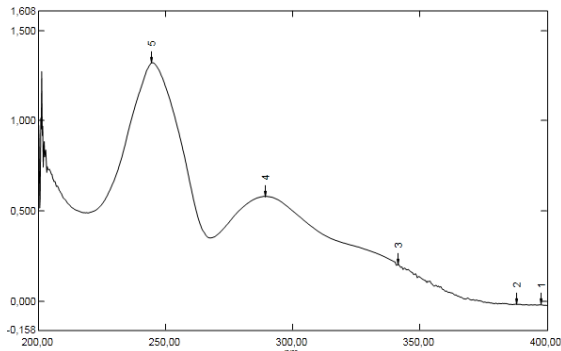
Keterangan Gambar :

- Pelarut Etil Asetat : Metanol (9:1) nilai Rf nya adalah 0,230
- Pelarut Etil Asetat : Metanol (7:3) nilai Rf nya adalah 0,654
- Pelarut Etil Asetat : Metanol (6:4) nilai Rf nya adalah 0,743

Pada pemeriksaan organoleptis diketahui bahwa senyawa HNF-3 berupa kristal berwarna putih. Pemeriksaan kimia pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa murni tersebut. Pemeriksaan kimia dilakukan senyawa dengan menggunakan reagen Mg dan asam klorida pekat. Berdasarkan hasil pemeriksaan, senyawa memberikan warna kuning-orang yang menunjukkan bahwa senyawa HNF-3 merupakan flavonoid.

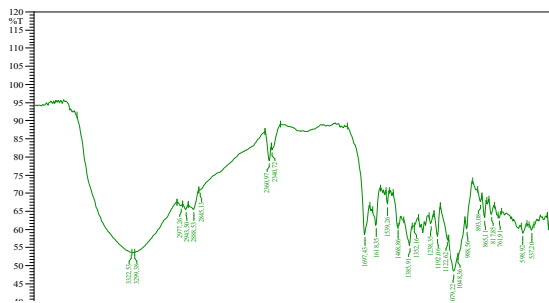
Pada pemeriksian fisika dilakukan pengujian berupa uji kelarutan dan titik leleh. Berdasarkan hasil pemeriksaan, diperoleh bahwa HNF-3 larut dalam pelarut metanol, agak sukar larut dalam etil asetat dan tidak larut dalam n-heksana. Pada pengujian titik leleh dari senyawa murni HNF-3 yaitu 189-191o C. Pada teori yang telah dipaparkan oleh Mohrig et al., (2010) bahwa senyawa isolasi dikatakan murni apabila selisih titik lelehnya $\leq 2^{\circ}\text{C}$, berdasarkan hal tersebut dapat dinyatakan senyawa HNF-3 yang diteliti telah murni. Senyawa murni HNF-3 yang didapat sebanyak 12 mg dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dan dilanjutkan identifikasi senyawa tersebut secara organoleptis, pemeriksaan sifat fisika, pemeriksaan sifat kimia dan analisis spektroskopi UV, FT-IR dan ¹HNMR.

Analisis senyawa HNF-3 juga dilakukan dengan menggunakan spektroskopi. Senyawa HNF-3 memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 328 nm dan 289 nm dengan absorbansi 0,205 dan 0,581. Berdasarkan hasil analisis spektroskopi UV menunjukkan adanya serapan dari ikatan rangkap terkonjugasi atau gugus kromofor pada senyawa HNF-3. Menurut Andersen dan Markham (2006), ciri khas spektrum UV flavonoid memiliki puncak bahu yang muncul pada daerah pita I (300-330 nm) dan pita II (275-295 nm). Puncak pada pita II menunjukkan adanya serapan dari sistem konjugasi cincin A, sedangkan pita I menunjukkan adanya serapan dari sistem konjugasi cincin B pada struktur umum flavonoid (Vihakas, 2014; Suhartati, 2017).



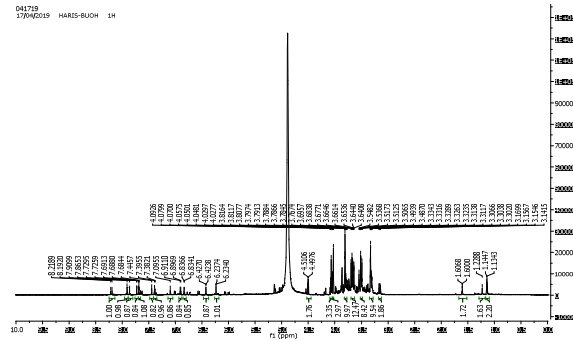
Gambar 3. Spektrum UV Senyawa HNF-3 dalam Pelarut Metanol

Selain analisis spektroskopi UV, juga dilakukan analisis FT-IR dan ¹H NMR yang dapat membantu dalam identifikasi struktur senyawa. Berdasarkan hasil analisis spektroskopi FT-IR dengan metode pelet KBr terhadap senyawa HNF-3 mempunyai pita serapan pada bilangan gelombang 3322 cm⁻¹ yang menunjukkan vibrasi dari OH alkohol. Adanya gugus hidroksil ini diperkuat dengan munculnya vibrasi C-O alkohol pada bilangan gelombang 1079 cm⁻¹. Vibrasi C=C aromatik senyawa HNF-3 muncul pada bilangan gelombang 1618 cm⁻¹ yang menandakan ciri khas dari vibrasi C=C aromatik. Vibrasi untuk C-H alifatik muncul pada bilangan gelombang 2977 cm⁻¹. Vibrasi karbonil (C=O) terkonjugasi yang merupakan ciri khas dari struktur senyawa flavonoid juga terlihat pada bilangan gelombang 1697 cm⁻¹ (Coates, 2006).



Gambar 4. Spektrum FT-IR Senyawa HNF-3

Data analisis spektroskopi FT-IR ini didukung dengan data analisis ¹H-NMR yang telah dilakukan. Senyawa HNF-3 yang diperkirakan golongan flavonoid dianalisis dengan ¹H NMR Bruker (600 MHz) menggunakan pelarut CD₃OD, memperlihatkan pergeseran kimia diantara 6,2-8,2 ppm yang merupakan sinyal-sinyal proton pada cincin aromatik senyawa flavonoid. Data spektrum ¹H-NMR ini memperkuat hasil interpretasi spectrum UV yang menunjukkan adanya kromofor berupa sistem konjugasi cincin A dan B. Kemudian data ini juga memperkuat hasil interpretasi spektrum IR yang menunjukkan vibrasi dari ikatan C=C aromatik. Sinyal pada pergeseran kimia 1,1-1,6 ppm merupakan sinyal proton alifatik. Sedangkan sinyal-sinyal pada pergeseran kimia 3,3-4,0 ppm merupakan sinyal-sinyal yang dihasilkan oleh proton pada gugus glikosida. Sinyal-sinyal tersebut dapat dijadikan suatu petunjuk bahwa senyawa flavonoid dari hasil isolasi merupakan jenis senyawa flavonoid glikosida (Chatuverdula, et al 2012).



Gambar 5. Spektrum ¹H-NMR Senyawa HNF-3

Menurut Blunder et al., (2017), pergeseran kimia ini merupakan ciri khas dari proton aromatik cincin A dan B pada senyawa flavonoid. Dugaan senyawa flavonoid diperkuat dengan fluoresensi senyawa HNF-3 dibawah lampu UV 366 nm. Jenis-jenis senyawa flavonoid dapat diketahui dari fluoresensi yang dipancarkan senyawa tersebut. Senyawa HNF-3 memberikan fluoresensi berwarna biru di bawah lampu UV 366 nm yang menunjukkan kriteria dari senyawa flavonoid (Packer, 2001).

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap senyawa murni yaitu HNF-3 dan vitamin C digunakan sebagai kontrol positif (antioksidan pembanding). Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui tingkat kemampuan senyawa murni sebagai antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 517 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH (Kedare dan Singh, 2011). Prinsip pengukurannya yaitu pengukuran absorbansi sampel yang telah bereaksi dengan DPPH dalam waktu inkubasi 30 menit. Waktu

30 menit adalah waktu optimum bagi sampel untuk dapat bereaksi sempurna dengan DPPH.

Adanya aktivitas antioksidan pada sampel mengakibatkan perubahan warna larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna ungu pekat menjadi kuning, karena tereduksi menjadi DPPHH (Molyneux, 2004). Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya nilai persentase inhibisi terhadap DPPH. Semakin besar persentase inhibisi sampel maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Salamah et al., 2015).

Berdasarkan perhitungan di peroleh hasil bahwa senyawa HNF-3 mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 160,6656 µg/mL. Berdasarkan nilai IC₅₀, kategori aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat dibagi menjadi sangat kuat (<50 µg/mL), kuat (50-100 µg/mL), sedang (100-250 µg/mL), lemah (250-500 µg/mL) dan tidak aktif (>500 µg/mL) (Mustarichie et al, 2006). Dengan demikian, senyawa HNF-3 dikategorikan memiliki aktivitas antioksidan sedang.

Aktivitas antioksidan yang sedang memiliki kemampuan antioksidan diduga dikarenakan adanya kandungan flavonoid yang didukung dari hasil pemeriksaan secara kimia dan juga hasil analisis spektroskopi. Gugus hidroksil dari senyawa Flavonoid ini berperan dalam mendonorkan protonnya terhadap radikal bebas. Seperti yang dinyatakan oleh Andersen dan Markham (2006), bahwa senyawa yang tergolong antioksidan alami salah satunya adalah flavonoid. Hal ini disebabkan pada senyawa flavonoid memiliki gugus hidroksil pendonor proton yang jumlahnya lebih banyak dibandingkan dengan senyawa lain pada umumnya, selain itu flavonoid memiliki kemampuan dalam mengkelat ion-ion logam terhadap radikal bebas (Redha, 2010). Selain itu flavonoid juga mempunyai aktivitas antioksidan yang paling potensial, karena struktur kimianya yang mengandung grup o-difenol dan grup hidroksil pada posisi 3 dan 5. Dimana aktivitas antioksidan flavonoid dipengaruhi oleh hidroksilasi dan terdapatnya gugus gula (Muchtadi, 2013).

Vitamin C sebagai antioksidan pembanding memiliki nilai IC₅₀ sebesar 7,918 µg/mL. Dari hasil ini diketahui bahwa vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dibandingkan senyawa HNF-3 yang memiliki aktivitas antioksidan yang sedang. Namun baik senyawa HNF-3 maupun vitamin C masih sama-sama tergolong memiliki aktivitas antioksidan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian telah berhasil didapatkan senyawa murni yang diberi nama senyawa HNF-3. Identifikasi senyawa murni dengan reagen spesifik menunjukkan bahwa senyawa HNF-3 merupakan senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil analisis spektroskopi UV, FT-IR, dan ¹H NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa HNF-3 merupakan senyawa flavonoid glikosida. Selain itu juga senyawa

HNF-3 memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sedang dengan nilai IC₅₀ sebesar 160,613 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, M., dan Markham, K. R. 2006. *Flavonoids*. Taylor and Francis Group. New Zealand.
- Blunder, M., Orthaber, A., Rudolf, B., Bucar, F. 2017. Efficient Identification of Flavones, Flavanones and Their Glycosides in Routine Analysis via Off-line Combination of Sensitive NMR and HPLC Experiment. *Food Chemistry* 218, 600-609.
- Chatuverdula, V.S.P., Miguel, R.I.S., Prakash, I. 2012. Chemical Constituents From Polar Fraction of *Rubus Suavissimus*. *Organic Chem Current Res.* 1:1
- Coates, J. 2006. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 10815–10837.
- Joseph, B., and Raj, S. J. 2011. Pharmacognostic and Phytochemical Properties of *Ficus carica* Linn—An Overview. *International Journal of Pharmatech Research.* 3 (1): 8-12.
- Kedare, S. B., dan Singh, R. P. 2011. Genesis and Development of DPPH Method Of Antioxidant Assay. *J Food Sci Technol*, 48(4), 412–422.
- Khatimah, D. K. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Daun Tin (*Ficus carica* L.) Varietas Brown Turkey Dengan Metode Dpph (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*). *Skripsi*, Pekanbaru, STIFAR
- Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., Baiti, I. 2016. Phenolic and Flavonoid Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaf Extracts from Ten Algerian *Ficus carica* L. Varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 6 (3): 239-245.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal Songklanakarin Science Technology.* 26 : 212-219.
- Muhtadi, E. H., Syah, Y. M., Juliawaty, L. D., Din, L. B., Latip, J., 2007, Senyawa oligomer resveratrol dari kulit kayu *Dipterocarpus retusus* Blume dan efek sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P388, *J Pharmacol*, Vol. 8 (1), Hal. 6-12.
- Mustarichie, R., Runadi, D., Ramdhani, D. 2017. The Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Ethanol Extract, Fractions of Water, Ethyl Acetate, and n-Hexane From Mistelotee Tea (*Scurrula atropurpurea* BL.Dans). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(2): 343-347.
- Nicotra, G., Vicentini, S., Mazzolari, A. 2010. *Ficus carica*. *Nutra Foods.* 9 (3) :27-30.
- Oliveira, A. P., Valentˆao, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., and Andrade, P. B, 2009. "Ficus carica L.: metabolic and biological screening," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 11, pp. 2841–2846.
- Packer, Lester. 2001. *Flavonoids and Other Polyphenols Vol. 335*. Academic Press. New York.
- Redha, A. 2010. Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*, 9(2), 196-202.
- Rustaman, Abdurahman, M., dan Jamaludin, A., 2006. *Skrining Fitokimia Tumbuhan di Kawasan Gunung Kuda Kabupaten Bandung sebagai Penelaahan Keanekaragaman Hayati*, Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran, Bandung.
- Salamah, N., Widyarningsih, W., Izati, I., Susanti, H., 2015. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas Ekstrak Etanol Ganggang Hijau *Spirogyra* sp. dan *Ulva lactuca* dengan Metode

DPPH, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 13 (2) : 145-150.

- Sayuti, K. dan Yanrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Andalas University Press, Padang.
- Sirisha, N., Sreenivasulu, M., Sangeeta, K., Madhusudhana, C. 2010. Antioxidant Properties of Ficus Species – A Review. *International Journal of PharmTech Research*. 2 (4): 2174-2182.
- Stover, Ed and Aradhya, M. 2007. The Fig: Overview of an Ancient Fruit. *Hort Science*. 42 (5).
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa*. Anugrah Utama Raharja. Lampung.
- Tian, J., Zhang Y., Yang, X., Ruyi, K., Tang, X., Ma, J., Chen, J., Xu, H., Lu, L., Wang, S. 2014. *Ficus carica* Polysaccharides Promote The Maturation and Function of Dendritic Cells. *International Journal Medical Science*. (15): 12469-12479.
- Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Vihakas, M. 2014. *Flavonoids And Other Phenolic Compounds: Characterization And Interactions With Lepidopteran And Sawfly Larvae*. Department of Chemistry, University Of Turkey.
- Zhang Q., Junzeng Z., Jingkai S, Anggelica S., Dorothy A., 2006. A simple 96- Well Microplate Method For Estimation of Total Polyphenol Content In Seaweds. *Journal of Applied Phycology*. (18): 445-450.