

Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* Linn Asal Lombok

Fannisa Rahmawati

Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Pemuda No 10, Rawamangun 13220, Jakarta, Indonesia

Abstrak

Penentuan struktur senyawa ditentukan berdasarkan analisa spektrum UV-Vis, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR. Pemisahan dan pemurnian telah dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan metode kromatografi vakum cair dan kromatografi radial dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. menghasilkan satu senyawa murni yaitu casticin. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang dinyatakan dalam IC₅₀. Nilai IC₅₀ senyawa casticin pada metode DPPH secara berturut-turut adalah 94,335 × 10⁶ ppm dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah.

Kata Kunci

Vitex trifolia Linn., aktivitas antioksidan, DPPH, casticin.

Isolation and Antioxidant Activity for Secondary Metabolite from Ethyl Acetate Fraction of *Vitex trifolia* Linn Leaves from Lombok

*Structure compound was determined using spectroscopic methods including UV-Vis, IR, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. Separation and purification was done by this research with liquid vacuum chromatography and radial chromatography method from ethyl acetate fraction of *Vitex trifolia* Linn. The Result is one compound, casticin. Antioxidant activity has been done by DPPH method and stated by IC₅₀. IC₅₀ value of casticin showed the compound is a very weak antioxidant activity.*

Keywords

Vitex trifolia Linn., antioxidant activity, DPPH, casticin.

1. Pendahuluan

Aktivitas masyarakat yang semakin beragam belakangan ini menyebabkan kurangnya memperhatikan pola hidup sehat, diantaranya: kebiasaan merokok, minimnya kesadaran akan bahaya terpapar polusi dari asap kendaraan, dan bahaya pembelian makanan panas dengan wadah plastik. Tanpa disadari, hal tersebut menyebabkan tubuh terancam paparan radikal bebas. Radikal bebas adalah atom maupun gugus atom atau apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan [1]. Kebiasaan masyarakat yang suka merokok memiliki zat-zat radikal bebas, seperti: peroksinitrit, hidrogen peroksida, dan superoksida. Radikal bebas dalam asap rokok dapat mempercepat kerusakan seluler akibat stres oksidatif. Molekul target yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein. Kandungan kimia berbahaya dalam bentuk gas ataupun volatil pada rokok menyebabkan terjadinya mutasi gen berulang kali. Selanjutnya, kombinasi mutasi gen dan kerusakan DNA menyebabkan ketidakstabilan genetik yang menyebabkan penyakit kanker.

Salah satu upaya untuk mencegah kereaktifan radikal bebas yaitu dengan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan [2]. Elektron dari antioksidan akan menjadi perlindungan terdepan dalam menghadapi senyawa radikal bebas. Radikal bebas akan menerima elektron dari antioksidan sebelum dapat merusak jaringan tubuh lebih lanjut. Banyak senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan, antara lain: asam askorbat, α -tokoferol, dan β -karoten [3].

Tubuh memiliki berbagai enzim, seperti dismutasi superoksida dan katalase yang dapat menetralkan radikal bebas agar tidak merusak sel-sel tubuh yang penting. Namun, seiring dengan seringnya masyarakat terpapar polusi disekitar menimbulkan kenaikan kadar radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas berlebih ini tidak sepenuhnya dapat diatasi oleh antioksidan di dalam tubuh, sehingga diperlukan mengonsumsi senyawa antioksidan dari makanan atau minuman. Tingginya kebutuhan antioksidan di masyarakat yang banyak polusi menyebabkan banyak perusahaan makanan dan minuman memproduksi minuman dan makanan instan yang mengandung antioksidan. Namun

antioksidan yang digunakan berupa antioksidan sintetik seperti: Butilhidroksitoluen (BHT) dan butilhidroksianisol (BHA). Penggunaan antioksidan sintetik sebagai konsumsi rutin tidak baik bagi tubuh karena dapat menimbulkan efek samping. Untuk menghindari efek samping dari antioksidan sintetik, banyak dilakukan pencarian senyawa bahan alam yang dapat berperan sebagai antioksidan alami untuk dijadikan sumber antioksidan alternatif.

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan adalah tanaman dari genus *Vitex*. Kemampuan antioksidan pada beberapa tanaman *Vitex*, yaitu *Vitex negundo* dan *Vitex trifolia* telah diteliti. Sifat dari pelarut ekstrak metanol berpengaruh pada pengukuran total senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan. Adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki kemampuan sebagai sumber alternatif antioksidan alami [4]. Hasil ini menunjukkan bahwa tanaman *V. trifolia* Linn asal Lombok memiliki potensi yang besar untuk dijadikan sebagai sumber alternatif baru penghasil senyawa antioksidan alami, namun pengetahuan kimia mengenai *V. trifolia* Linn asal Lombok ini belum lengkap, oleh karena itu penelitian ini ditujukan untuk mengisolasi metabolit sekunder dari daun *V. trifolia* Linn asal Lombok pada fraksi etil asetat dan menguji kemampuan bioaktivitasnya dengan uji antioksidan. Hasil uji antioksidan senyawa metabolit sekunder hasil isolasi *Vitex trifolia* Linn. diharapkan dapat membantu para peneliti untuk melengkapi data dalam pencarian tumbuhan sumber senyawa antioksidan alami sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik.

2. Metodologi Penelitian

2.1 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat daun *V. trifolia* Linn yang diperoleh dari penelitian Elsafira Arivianti dengan massa total 18,7526 gram. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbagai pelarut dengan kualifikasi teknis yang telah didistilasi (n-heksana, aseton, dan etil asetat), dan silika gel (Merck Cat. Num 105553) sebagai fasa

diam dalam kromatografi. Uji aktivitas antioksidan menggunakan reagen 1,1-difenil-pikrilhidrazil, asam askorbat (Merck milipore Cat. Num 1531) dan BHT (Brataco Chem).

2.2 Instrumen

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan, neraca analitik, peralatan Kromatografi Vakum Cair (KVC), alat penguap vakum putar/rotary evaporator (EYELA USA N-1001S-WD, Cat Num 216959), magnetic stirrer (IKA C-MAG HS 7), 21lampu UV, peralatan kromatografi lapis tipis. Instrumen yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, UV Biospec-1601), Spektrometer Inframerah (SPECTRUM ONE Perkin Elmer FTIR), Spektrometer ¹H-NMR (JEOL JMN A5000, 500 MHz) dan ¹³C-NMR (JEOL JMN A5000, 125 MHz) di Institut Teknologi Bandung,

2.3 Preparasi

2.3.1 Penentuan Eluen

Penentuan eluen dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Fasa diam yang digunakan yaitu silika gel. Plat silika dipotong yaitu berukuran 5x5 cm dan dibuat garis atas dan bawah masing-masing memiliki jarak sebesar 0,5 cm dari tepi plat. Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler berdiameter ± 0,5 mm - 1 mm. Setelah itu plat KLT dimasukkan dalam chamber, dengan tinggi pelarut tidak melewati batas bawah plat KLT. Plat dimasukkan dalam chamber dan dibiarkan beberapa saat. Setelah mencapai batas atas, plat KLT diambil dan dikeringkan. Hasil plat tersebut dilihat dibawah lampu UV.

2.3.2 Pemisahan Fraksi

Pemisahan fraksi Etil Asetat (EtOAc) dilakukan dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC) menggunakan fasa diam yang berupa silika gel serta fasa gerak berupa campuran n-heksana, kloroform dan etil asetat hasil dari penentuan eluen yang telah dilakukan. Kolom kromatografi diisi dengan silika gel yang telah disuspensikan dengan eluen sedikit demi sedikit ke dalam kolom agar

diperoleh lapisan homogen. Eluen dibiarkan mengalir sehingga silika gel di dalam kolom menjadi padat dan rata permukaannya. Pembuatan kolom ini dilakukan dengan hati-hati agar tidak ada udara yang mengisi celah-celah silika. Silika gel harus tetap terendam oleh pelarut ketika sampel dimasukkan sampai pemisahan selesai. Fraksi aktif yang diperoleh melalui uji sebelumnya dimasukkan ke dalam kolom, kemudian eluen dialirkan. Pengeluisan dilakukan secara SGP (Step Gradient Polarity) yaitu dengan cara meningkatkan kepolaran pelarut. Masing-masing fraksi ditampung dalam botol berukuran ± 50 mL, kemudian dimonitoring dengan KLT.

2.3.3 Pemurnian Fraksi

Tahap pemurnian fraksi dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi radial. Kromatografi radial menggunakan alat kromatotron. Pelat ini dipasang pada poros motor listrik dan diputar pada kecepatan 800 rpm. Pelarut atau eluen dimasukkan ke bagian tengah pelat yang tidak dilapisi adsorben melalui pompa yang mampu mengalirkan 1-10 mL pelarut per menit dan merambat melalui lapis tipis karena gaya sentrifugal. Dengan demikian rotor dicuci untuk menghilangkan pencemar yang terdapat dalam adsorben. Kemudian sampel dimasukkan dan dilakukan elusi dengan menggunakan pelarut yang sama sampai proses elusi selesai atau menggunakan pelarut yang kepolarannya dinaikkan secara gradien dengan laju sekitar 3-6 mL per menit. Proses elusi akan menghasilkan pita-pita yang berupa lingkaran. Pada tepi pelat pita-pita akan terputar keluar dan ditampung dalam tabung penampung, kemudian dianalisis lebih lanjut

2.3.4 Identifikasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan data spektroskopi Infra Red (IR), dan spektroskopi Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR dan ^{13}C NMR).

2.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil pikrihidrazil). Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi kloroform daun *Vitex trifolia* Linn dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian dibuat konsentrasi

bervariasi yaitu 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing 1 mL larutan uji ditambahkn 3 mL larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol. Setiap campuran dikocok lalu disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi masing-masing sampel diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap asam askorbat dan BHT sebagai kontrol positif, sedangkan untuk kontrol merupakan campuran metanol tanpa sampel dengan DPPH. Data aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi DPPH tanpa sampel dan absorbansi sampel merupakan nilai absorbansi DPPH yang ditambah sampel. Data yang diperoleh dinyatakan dalam tabel.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Tahap Isolasi dan Pemurnian

fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn yang dipisahkan dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC). Fasa diam yang digunakan pada KVC adalah silika gel, sedangkan fasa geraknya adalah eluen n-heksana-etil asetat. Proses elusi dilakukan secara Step Gradient Polarity (SGP) dimulai dari campuran eluen yang bersifat non-polar yaitu n-heksana:etil asetat (H/E) dengan perbandingan (9:1) yang diulang sebanyak tiga kali elusi, (8:2) dua kali elusi, (7:3) dua kali elusi, (6:4) dua kali elusi, (1:1) dua kali elusi, dan (3:7) tiga kali elusi. Total jumlah fraksi yang diperoleh adalah 14 fraksi utama.

3.1.1 Pemisahan Fraksi I

Fraksi I (1,171 g) dipisahkan kembali dengan teknik KVC menggunakan eluen H/E yang ditingkatkan kepolarannya secara perlahan dimulai dari perbandingan (9:1) tiga kali elusi, (8,5:1,5) dua kali elusi, (8:2) dua kali elusi, (7,5:2,5) tiga

kali elusi, (7:3) tiga kali elusi, dan (1:1) dua kali elusi sehingga diperoleh 15 fraksi.

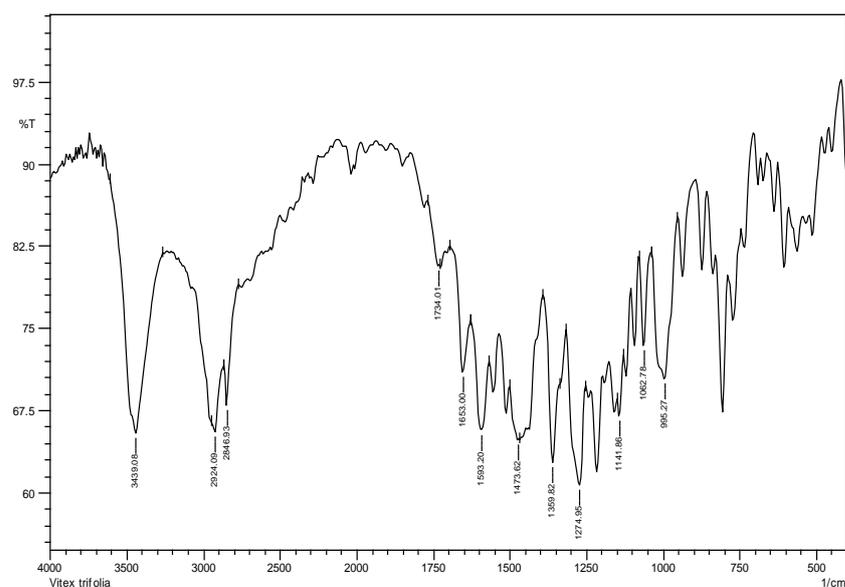
3.1.2 Pemisahan Fraksi I10

Fraksi I10 (386,9 mg) selanjutnya dipisahkan kembali dengan teknik KVC menggunakan eluen n-heksana:kloroform (H/K) yang kepolarannya ditingkatkan secara perlahan dimulai dari perbandingan (3:7) tiga kali elusi, n-heksana:kloroform (2:8) tiga kali elusi, kloroform 100% empat kali elusi sehingga diperoleh 10 fraksi

3.1.3 Pemisahan Fraksi I10₄

Fraksi I10₄ (142,2 mg) dipisahkan menggunakan eluen kloroform:nheksana (K/H) (7:3). Hasil kromatogram ditunjukkan pada gambar 12. Fraksi I10₄ telah didapatkan spot tunggal, sehingga untuk memastikannya dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan sistem 3 eluen pada fraksi I10₄. Fraksi I10₄ diuji dengan eluen, kloroform 100%, n-heksana:etil asetat dan n-heksana:aseton.

3.2 Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan



Gambar 1. Hasil spektrum FTIR senyawa isolat

Senyawa Isolat yang diperoleh berupa serbuk berwarna hijau tua. Berdasarkan hasil spektrum IR (KBr) senyawa isolat menunjukkan regangan gugus –OH yang mengalami ikatan hidrogen dengan –C=O (V_{max} 3439,08 cm^{-1}), gugus –C-H aromatik (V_{max} 2924,09 cm^{-1}), gugus –C=C alkena (1653,00 cm^{-1}), gugus –C=C aromatik (V_{max} 1593,20 cm^{-1} dan 1473,62 cm^{-1}), gugus –C-O (1274,95 cm^{-1}).

Penentuan struktur isolat dianalisis dari spektrum 1H -NMR dan ^{13}C -NMR. Gugus metoksi (–OCH₃) ditandai adanya empat sinyal proton singlet (3H) pada δH 3,86 ppm (3H, s); δH 3,91 ppm (3H, s); δH 3,94 ppm (3H, s); dan δH 3,97 ppm (3H, s), kemudian dari data 1H -NMR menunjukkan adanya sinyal proton yang menunjukkan struktur cincin aromatik dengan sistem ABX pada δH 6,95 ppm (1H, d, $J = 8,6$ Hz), δH 7,69 ppm (1H, dd, $J = 8,5$ Hz dan $J = 2,25$ Hz), dan δH 7,67 ppm (1H, d, $J = 2,25$ Hz).

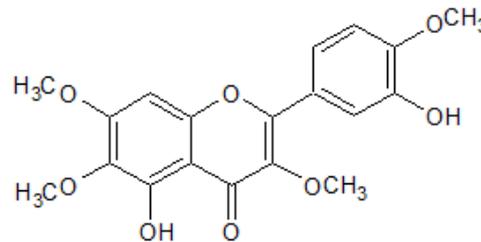
Empat karbon metoksi pada δC 148,91 ppm (posisi C-4'); δC 158,88 ppm (posisi C-7); δC 132,32 ppm (posisi C-6); dan δC 139,08 ppm (posisi C-3). Sinyal karbon metin pada δC 90,46 ppm (posisi C-8); δC 110,49 ppm (posisi C-2'); δC 114,44 ppm (posisi C-5') dan δC 121,68 ppm (posisi C-6'). Sinyal karbon kuarterner pada δC 123,64 ppm (posisi C-1'); δC 132,32 ppm (posisi C-6); δC 139,08 ppm (posisi C-3); δC 145,64 (posisi C-3'); δC 148,91 (posisi C-4'); δC 152,43 ppm (posisi C-2); δC 152,80 ppm (posisi C-5); δC 155,76 ppm (posisi C-9); δC 158,88 ppm (posisi C-7); dan δC 179,06 ppm (posisi C-4).

Tabel 1. Spektrum 1H -NMR dan ^{13}C -NMR Senyawa Isolat

Posisi	1H -NMR	^{13}C -NMR
2	-	152,43
3	-	139,08
4	-	179,06
5	-	152,80
6	-	132,32
7	-	158,88
8	6,49 (1H,s)	90,46
9	-	155,76
10	-	106,68
1'	-	123,64
2'	7,67 (d, $J=2,25$ Hz)	110,49
3'	-	145,64

4'	-	148,91
5'	6,95 (d, J=8,6 Hz)	114,44
6'	7,70 (dd, J=8,6 Hz, J=2,25 Hz)	121,68
3-OCH ₃	3,95 (3H,s)	61,02
6-OCH ₃	3,98 (3H,s)	60,26
7-OCH ₃	3,92 (3H,s)	56,44
4'-OCH ₃	3,86 (3H,s)	56,17
3'-OH	5,79	-
5-OH	12,59	-

Berdasarkan data analisis yang ada, maka struktur senyawa isolat merupakan 3',5-dihidroksi-3,4',6,7-tetrametoksiflavan atau casticin.



Gambar 2. Struktur Molekul Senyawa Casticin

4. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Senyawa Isolasi

Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan pada casticin adalah dengan metode DPPH menggunakan asam askorbat dan BHT sebagai kontrol positif menunjukkan bahwa asam askorbat dan BHT memiliki kemampuan antioksidan yang sangat tinggi, sedangkan nilai IC₅₀ senyawa isolat menunjukkan hasil yang sangat besar, menandakan bahwa kemampuan antioksidan dari senyawa isolat sangat kecil karena nilai IC₅₀ lebih dari 200 ppm.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ larutan standar dan Isolat dengan Metode DPPH

sampel	Nilai IC ₅₀ (ppm)	Potensi Antioksidan
Asam Askorbat	30,76	Sangat Kuat
BHT	19,51	Sangat Kuat
Isolat	94,33 × 10 ⁶	Sangat Lemah

5. Kesimpulan

Hasil dari analisis spektrum UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR menginformasikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah casticin. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari isolat $94,335 \times 10^6$ ppm dan senyawa isolat memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.

Daftar Pustaka

- [1] Fessenden, R. J., Fessenden, J. S.. 1997. Kimia Organik Jilid 1. Jakarta: Erlangga.
- [2] Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- [3] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: *Impact on human health*. *Department of Botany*, 4(8), 118-128.
- [4] Shah S., Dhanani T., Kumar S. 2013. Validated HPLC Method for Identification and Quantification Of p-Hydroxy Benzoic Acid and Agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 500-508.