

PROFIL KROMATOGRAFI SENYAWA AKTIF ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN LIBO (*Ficus variegata* Blume.)

Mega Rizky Novitasari, Risna Agustina, Agung Rahmadani, Rolan Rusli
Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS, Fakultas Farmasi,
Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur
Email: megarizkynovitasari@yahoo.com

Abstrak

Tumbuhan Libo (*Ficus variegata* Blume.) memiliki buah yang tidak dimakan oleh hama/serangga, hal ini diduga karena kandungan metabolit sekunder tumbuhan libo mengandung senyawa aktif yang dapat berpotensi sebagai antibakteri maupun antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil kromatografi senyawa antioksidan dan antibakteri, serta mengetahui golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi aktif etil asetat daun libo. Sampel dimaserasi dengan pelarut metanol. Isolasi dilakukan sebanyak 2 kali yaitu dengan cara kromatografi cair vakum kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom konvensional. Hasil pemisahan berdasarkan kromatografi kolom konvensional yaitu diperoleh sebanyak 16 fraksi. Dari hasil tersebut kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dengan metode KLT Bioautografi. Hasil penelitian diperoleh profil kromatografi fraksi etil asetat daun Libo (*Ficus variegata* Blume.) aktif sebagai antioksidan terhadap DPPH, dan aktif terhadap bakteri, *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Golongan metabolit sekunder aktif fraksi etil asetat daun libo adalah alkaloid, steroid, terpenoid dan fenol.

Kata kunci: fraksi etil asetat daun Libo (*Ficus variegata* Blume.), kromatografi, antioksidan, antibakteri.

PENDAHULUAN

Seiring dengan zaman yang semakin berkembang, semakin banyak pula penyakit yang berkembang. Infeksi merupakan salah satu penyebab utama penyakit di dunia terutama di daerah tropis, seperti Indonesia. Kasus infeksi disebabkan mikroba patogen masuk ke dalam jaringan tubuh dan berkembang biak di dalam jaringan [1]. Zat antibakteri adalah zat yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme melalui penghambatan pertumbuhan bakteri. Zat antimikroba dalam melakukan efeknya, harus dapat mempengaruhi bagian-bagian vital sel seperti membran sel, enzim-enzim dan protein struktural [2]. Radikal bebas adalah atom atau gugus apa pun yang memiliki satu atau lebih elektron

tidak berpasangan [3]. Radikal bebas dapat dihambat dengan antioksidan.

Tanaman diketahui berpotensi sebagai obat alternatif pada berbagai penyakit infeksi. Selain itu, pengobatan herbal dipercaya lebih aman dibandingkan menggunakan bahan kimia. Tumbuhan Libo memiliki buah yang berbuah secara terus menerus dan buahnya tidak dimakan oleh hama/serangga, hal ini diduga karena kandungan metabolit sekunder tumbuhan libo mengandung senyawa aktif yang dapat berpotensi sebagai antibakteri maupun antioksidan. Hal ini dibuktikan dengan potensi buah tumbuhan Libo (*Ficus variegata* Blume) seperti yang dilaporkan oleh Rijai, yaitu memiliki aktivitas sitotoksik secara invitro,

antioksidan, antibakteri, dan larvasida terhadap *A. Aegypti* [4]. Penelitian mengenai isolasi yang telah dilakukan oleh Rusli [5] baru dilakukan pada fraksi *n*-heksan. Akan tetapi, saat ini belum dilaporkan mengenai profil kromatografi senyawa antioksidan dan antibakteri dari Tumbuhan Libo pada fraksi etil asetat. Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk mengetahui profil kromatografi senyawa antioksidan dan antibakteri dari fraksi etil asetat tumbuhan libo.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun Libo, aquadest, pelarut methanol, kloroform, *n*-heksan, etil asetat, *silica gel* GF 60, pereaksi DPPH, medium NA (*Nutrient Agar*), NaCl, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*, HCl, HCl pekat, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, serbuk Mg, CH₃COOH anhidrat, H₂SO₄ dan FeCl₃.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain toples kaca, *rotary evaporator* dan *water bath*, corong pisah, timbangan analitik, gelas ukur, gelas kimia, pipet tetes, pipet volume dan propipet, sendok tanduk dan spatula statif dan klem, vial, *chamber*, pipa kapiler, oven, erlenmeyer, lampu UV-Vis portable 254 dan 366 nm, bunsen, tabung reaksi, cawan, spoit dan inkubator.

Cara Kerja

Prosedur Ekstraksi dan Isolasi

Daun Libo yang telah dicuci bersih, dirajang menjadi potongan yang lebih kecil, lalu dikering anginkan tanpa terpapar sinar matahari. Simplisia kering sebanyak 2271,5 gram lalu dimasukkan dalam toples maserasi, lalu direndam pelarut metanol sebanyak 5 L selama 3 hari sambil sesekali dilakukan

pengadukan, kemudian filtrat disaring. Residu direndam kembali dengan methanol dan dibiarkan selama 3 hari kemudian disaring kembali, lalu filtrat yang terkumpul dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kasar daun Libo sebanyak 210,77 gram. Ekstrak kasar kemudian difraksinasi, sebanyak 50,29 gram ekstrak kasar dilarutkan dengan 300 mL aquadest dan 300 mL *n*-heksana (1:1) kemudian digojog di dalam corong pisah. Didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan bawah dikeluarkan (larut air) dan lapisan atas (fraksi *n*-heksana) dikeluarkan dan diuapkan pelarutnya. Kemudian lapisan bawah (larut air) ditambahkan pelarut *n*-heksana kembali dan digojog hingga lapisan atas tetap bening. Setelah bening kemudian pelarut *n*-heksana digantikan dengan pelarut etil asetat dan prosedur fraksinasi diulang kembali hingga diperoleh fraksi etil asetat sebanyak 4,293 gram.

Ekstrak etil asetat sebanyak 3,915 gram disolasi melalui 2 tahap dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan Kromatografi Kolom Konvensional (KK). Tahap pertama ekstrak etil asetat difraksinasi KVC. Eluen yang digunakan yaitu *n*-heksana:etil asetat dengan berbagai varian perbandingan kemudian ditingkatkan kepolarannya menggunakan pelarut kloroform:methanol dengan berbagai varian perbandingan, yang masing-masing dibuat dalam 400 mL. Fase diam berupa *silica gel* GF 60 sebanyak 68 gram. Hasil yang diperoleh yaitu sebanyak 3 fraksi besar yaitu fraksi A, B dan C. Tahap kedua, 2 fraksi yang memiliki jumlah terbanyak akan dilakukan pemisahan lanjutan menggunakan Kromatografi Kolom Konvensional (KK) yaitu fraksi A dan B. Berat fraksi yang digunakan untuk membuat bubur sampel yaitu fraksi A sebanyak 0,1094 gram dan fraksi B sebanyak 0,4155 gram. Fase diam berupa *silica gel* GF 60 untuk fraksi A sebanyak

7,4197 gram dan B sebanyak 8,1287 gram. Eluen yang digunakan yaitu berdasarkan hasil KLT yaitu n-heksana:etil asetat (8:2) dan (7:3). Fraksi A dikelompokkan menjadi 8 fraksi yaitu FEA1; FEA2; FEA3; FEA4; FEA5; FEA6; FEA7; FEA8, sedangkan untuk fraksi B dikelompokkan menjadi 8 fraksi yaitu FEB1; FEB2; FEB3; FEB4; FEB5; FEB6; FEB7; FEB8. Kemudian diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan antibakteri menggunakan KLT bioautografi serta pengujian metabolit sekunder.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara kualitatif yaitu penyemprotan larutan DPPH pada plat KLT yang telah ditotolkan. DPPH yang digunakan 80 ppm. Seluruh hasil fraksi KK yang diperoleh ditotol pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan eluen dengan pemisahan terbaik yaitu n-heksana:etil asetat (8:2). Penyemprotan pereaksi DPPH dilakukan diruang gelap. Hasil positif pada uji ini yaitu dengan terbentuknya warna kuning dengan latar belakang ungu atau biru pada spot noda yang telah disemprotkan pereaksi DPPH. Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode KLT bioautografi menggunakan 2 bakteri yaitu *Escherichia coli* sebagai bakteri Gram negatif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri Gram positif. Sebanyak 0,02 mL suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam cawan petri steril lalu ditambahkan 10 mL medium NA. Seluruh hasil fraksi KK yang diperoleh ditotol pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan eluen dengan pemisahan terbaik yaitu n-heksana:etil asetat (8:2), lalu ditempelkan pada permukaan medium selama 15 menit lalu diangkat. Kemudian diinkubasi diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam. Diamati zona bunuh yang terbentuk pada medium. Hasil positif ditandai

dengan adanya zona bening pada daerah sekitar spot senyawa hasil isolasi.

Pengujian Metabolit Sekunder

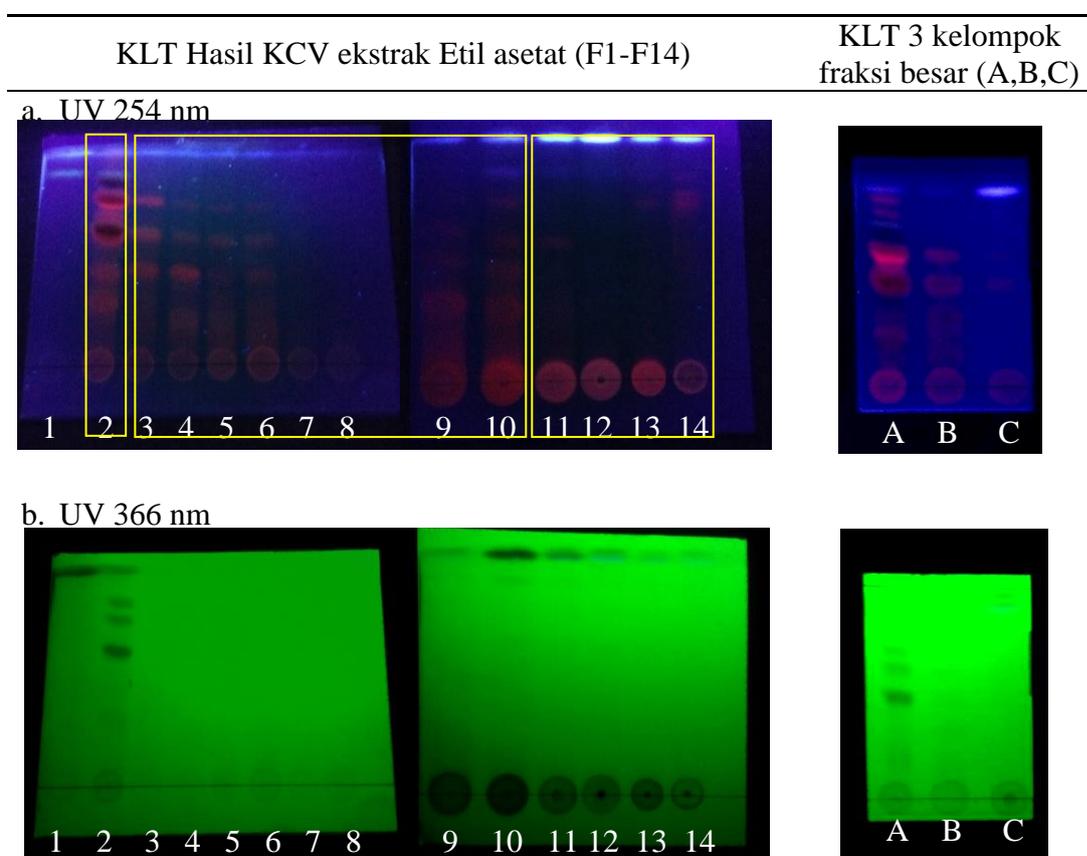
Fraksi etil asetat hasil KK yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri dilakukan uji metabolit sekunder antara lain alkaloid, flavonoid, steroid/terpenoid, fenol dan saponin. Fraksi (FEA1, FEA2, FEB1 dan FEB8) terlebih dahulu dilarutkan dengan methanol. Uji alkaloid dengan menambahkan HCl 2%, kemudian pereaksi Dragendorff, positif ditandai dengan endapan jingga kecoklatan dan pereaksi Mayer, positif ditandai endapan putih kuning. Uji flavonoid dengan pemanasan dan penambahan serbuk Mg serta HCl pekat dikocok, positif ditandai larutan merah, kuning/jingga. Uji steroid/terpenoid menggunakan pereaksi CH_3COOH anhidrat, CHCl_3 dan H_2SO_4 pekat, positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah kecoklatan/ungu. Uji fenol dengan penambahan pereaksi FeCl_3 , positif ditandai dengan perubahan warna biru sampai hitam. Sedangkan uji saponin yaitu dengan menambahkan aquades kemudian dikocok, positif ditandai terbentuk buih yang tidak hilang jika ditambahkan HCl 10%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak daun Libo diperoleh sebesar 0,0928 %. Sebanyak 50,29 gram Ekstrak kasar metanol daun Libo difraksinasi, diperoleh ekstrak etil asetat sebanyak 4,293 gram. Kemudian 3,915 gram ekstrak etil asetat disolasi dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) dengan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat yaitu 9:1; 8,5:1,5; 8:2; 7,5:2,5; 7:3; 6:4; 1:1; dan 4:6 selanjutnya ditingkatkan kepolaran eluennya dengan menambahkan eluen kloroform:methanol dengan perbandingan 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; dan 4:6 yang masing-masing dibuat dalam 400 mL. Hasil elusi dengan berbagai

perbandingan eluen tersebut diperoleh fraksi etil asetat sebanyak 14 fraksi. Fraksi yang memiliki pola pemisahan spot noda yang sama pada KLT digabungkan sehingga diperoleh 3 fraksi besar yaitu fraksi A, B dan C (*Gambar 1*), dengan berat masing-masing fraksi berturut-turut adalah 0,1094 gram, 0,4155 gram dan 0,0984 gram. Kemudian fraksi A dan B dilakukan pemisahan lanjutan dengan metode Kromatografi Kolom Konvensional (KK) dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (8:2) dan (7:3). Hasil

pemisahan lanjutan diperoleh masing-masing 8 fraksi dari setiap fraksi besar. Fraksi A dikelompokkan menjadi 8 fraksi yaitu FEA1; FEA2; FEA3; FEA4; FEA5; FEA6; FEA7; FEA8, sedangkan untuk fraksi B dikelompokkan menjadi 8 fraksi yaitu FEB1; FEB2; FEB3; FEB4; FEB5; FEB6; FEB7; FEB8 (*Gambar 2*). Perbandingan eluen terbaik KLT untuk mengisolasi senyawa aktif antioksidan dan antibakteri yaitu *n*-heksana:etil asetat 8:2.



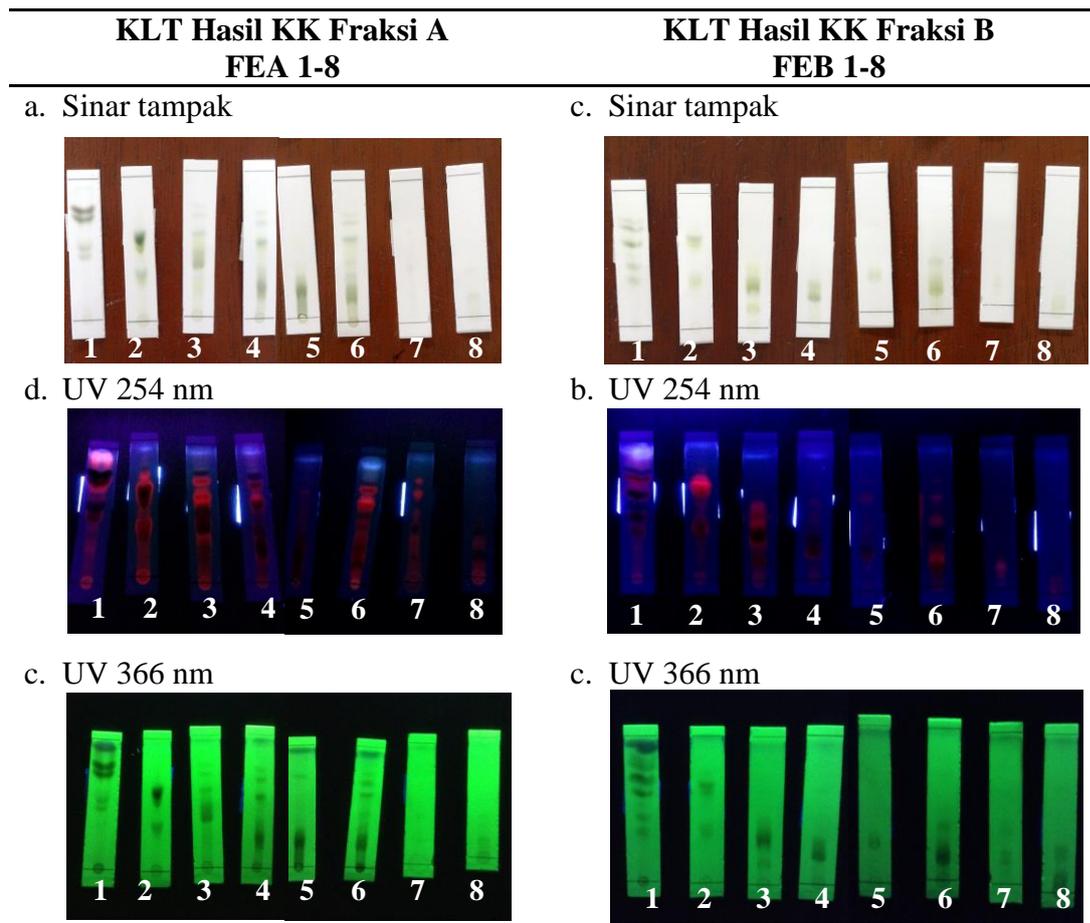
Gambar 1. KLT Hasil KCV (F1-F14) dan 3 fraksi besar hasil pengelompokan menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (8:2).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi. Pereaksi yang digunakan adalah larutan DPPH. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil hal tersebut dikarenakan adanya delokalisasi elektron, sehingga molekul DPPH tidak mengalami dimerisasi, reaktivitasnya

meningkat bila berdekatan dengan radikal lainnya dibandingkan dengan molekul yang bersifat netral. DPPH berwarna ungu tua, dan dapat larut dalam etanol dan metanol. Apabila bereaksi dengan senyawa antioksidan maka warna larutan akan memucat [6]. Seluruh hasil fraksi KK yang diperoleh ditotol pada plat KLT

kemudian dielusi menggunakan eluen dengan pemisahan terbaik yaitu *n*-heksana:etil asetat (8:2). Metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi dan antibiotik, disebut bioautografi [7]. Pengujian aktivitas

antibakteri fraksi etil asetat daun libo dengan metode KLT bioautografi, terhadap bakteri yang diuji yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Seluruh hasil fraksi KK yang diperoleh, di KLT kemudian dielusi menggunakan eluen dengan pemisahan terbaik yaitu *n*-heksana:etil asetat (8:2).



Gambar 2. KLT Hasil KK fraksi FEA dan fraksi FEB menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (8:2).

Berdasarkan hasil kedua uji dan pengamatan yang dilakukan, fraksi etil asetat daun libo dinyatakan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antibakteri. Aktivitas antioksidan dan antibakteri dapat dilihat pada Tabel 1.

Identifikasi metabolit sekunder pada penelitian ini dilakukan terhadap fraksi etil asetat hasil KK yang memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri yaitu, fraksi FEA1, FEA2, FEB1 dan FEB8. Hasil identifikasi metabolit sekunder fraksi etil asetat daun libo dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil pengujian antioksidan dan antibakteri fraksi etil asetat daun libo

Fraksi	Aktivitas		
	Antioksidan	Antibakteri	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Eschericia coli</i>
FEA1	+	-	-
FEA2	-	+	-
FEA3	-	-	-
FEA4	-	-	-
FEA5	-	-	-
FEA6	-	-	-
FEA7	-	-	-
FEA8	-	-	-
FEB1	+	-	-
FEB2	-	-	-
FEB3	-	-	-
FEB4	-	-	-
FEB5	-	-	-
FEB6	-	-	-
FEB7	-	-	-
FEB8	-	-	+

Keterangan:

(+): Memberikan aktivitas

(-) : Tidak memberikan aktivitas

Tabel 2. Hasil identifikasi golongan metabolit sekunder fraksi etil asetat daun libo

Fraksi	Metabolit Sekunder				
	Alkaloid	Flavonoid	Steroid/terpenoid	Fenol	Saponin
FEA1	+	-	+	+	-
FEA2	+	-	-	+	-
FEB1	-	-	+	-	-
FEB8	-	-	-	-	-

Keterangan:

(+): Teridentifikasi golongan metabolit sekunder

(-) : Tidak teridentifikasi golongan metabolit sekunder

Berdasarkan hasil identifikasi golongan metabolit sekunder, fraksi FEA1 positif mengandung alkaloid, steroid/terpenoid dan fenol, kandungan metabolit sekunder tersebut yang mengakibatkan aktivitas positif antioksidan yang ditimbulkan FEA1 terhadap DPPH. Fraksi FEA2 positif mengandung alkaloid dan fenol, hal inilah yang diyakini adanya kaitan dengan aktivitas positif antibakteri

terhadap bakteri uji, namun hanya pada bakteri uji *Staphylococcus aureus* tidak pada bakteri uji *Eschericia coli*, yang ditimbulkan fraksi FEA2. Pada fraksi FEB1 hanya positif mengandung steroid/terpenoid, kemiripin metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi FEA1 yaitu steroid/terpenoid. Metabolit tersebut diyakini dapat berfungsi sebagai antioksidan, begitu pula hasil uji aktivitas pada fraksi FEB1 yaitu positif

antioksidan terhadap DPPH. Sedangkan pada fraksi FEB8 tidak mengandung semua golongan metabolit sekunder yang diujikan baik alkaloid, flavonoid, steroid/terpenoid, fenol dan saponin. Fraksi FEB8 diduga mengandung senyawa golongan metabolit lain yang aktif terhadap bakteri uji *Eschericia coli*. Golongan metabolit pada fraksi FEB8 ini perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui golongan metabolit yang aktif terhadap bakteri uji *Eschericia coli*.

KESIMPULAN

Perbandingan eluen terbaik untuk mengisolasi senyawa aktif antibakteri dan antioksidan fraksi etil asetat daun libo yaitu *n*-heksana:etil asetat (8:2). Fraksi etil asetat daun libo memiliki aktivitas sebagai antioksidan, hal ini dapat dilihat dengan terjadi peredaman pada daerah spot noda plat KLT berdasarkan kemampuan peredaman DPPH pada lempeng plat. Fraksi etil asetat daun libo memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* terlihat dari terbentuknya zona bening. Kandungan metabolit sekunder aktif fraksi etil asetat adalah alkaloid, steroid, terpenoid dan fenol.

DAFTAR PUSTAKA

1. Waluyo, Lud. 2008. *Tekhnik Metode dasar dalam Mikrobiologi*, UMM Press, Malang.
2. Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Yogyakarta. Kanisius
3. Pelczar, M dan Chan.1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi (Jilid 2)* Jakarta: UI Press.
4. Rijai, Laode. 2013. Potensi Tumbuhan Libo (*Ficus variegata*, Blume) Sebagai Sumber Bahan Farmasi Potensial. *Jurnal. Trop. Pharm. Chem.* Vol 2. No. 3
5. Rolan Rusli, Myra Puspha Hardina, Fairul Muflihah, Agung Rahmadani. 2015. Profil Kromatografi Senyawa Aktif Antioksidan Dan Antibakteri Fraksi N-Heksana Daun Libo (*Ficus Variegata* Blume). *Jurnal. Trop. Pharm. Chem.* Vol 3. No. 2. 124- 130
6. Molyneux, P. 2004. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakar J. Sci. Technol., 2004, 26(2).
7. Djide, N. M. dan Sartini. 2008. *Analisis Mikrobiologi Farmasi*. Lab. Mikrobiologi Farmasi UNHAS