



UNIVERSITAS INDONESIA

STUDI KOMPONEN BIOAKTIF DAUN SIRIH MERAH
(*Piper cf. arcuatum* Blume)

TESIS

CANDRA IRAWAN

0806421685

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA

DEPOK

2010



UNIVERSITAS INDONESIA

STUDI KOMPONEN BIOAKTIF DAUN SIRIH MERAH
(*Piper cf. arcuatum* Blume)

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains

CANDRA IRAWAN

0806421685

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA

DEPOK

2010

LEMBAR PERSETUJUAN

Tesis ini telah disetujui oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Herry Cahyana
NIP: 195907051996031002

Dr. Endang Saepudin
NIP: 195712251986021002



Ketua Program Studi Magister Ilmu Kimia
Program Pascasarjana FMIPA-UI

Dr. Endang Saepudin
NIP: 195712251986021002

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

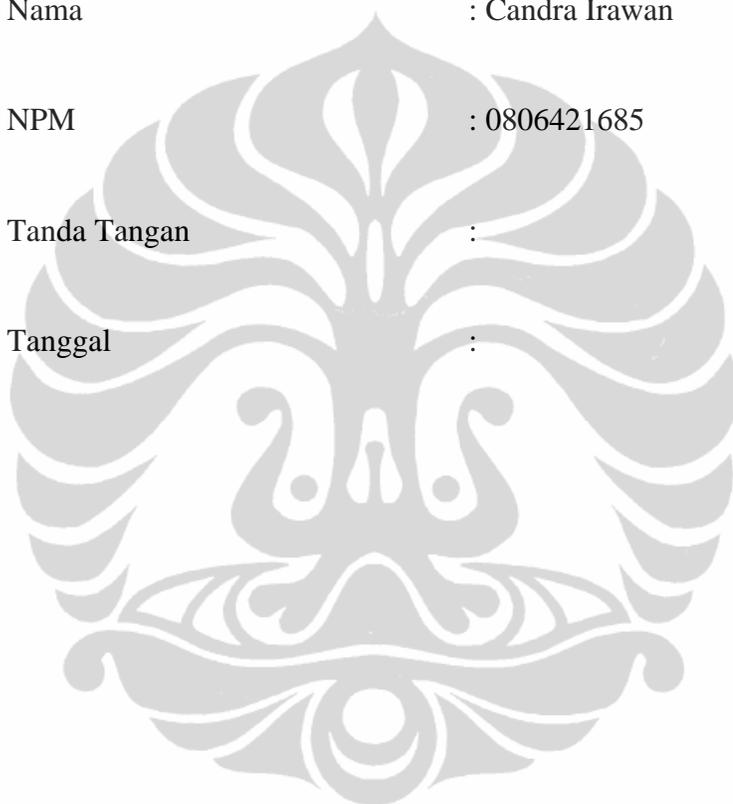
Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Candra Irawan

NPM : 0806421685

Tanda Tangan :

Tanggal :



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Candra Irawan
NPM : 0806421685
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul Tesis : Studi Komponen Bioaktif Daun Sirih Merah
(*Piper cf. Arcuatum* Blume)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Herry Cahyana (.....)
NIP: 195907051996031002

Pembimbing II : Dr. Endang Saepudin (.....)
NIP: 195712251986021002

Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc (.....)
NIP: 030903133

Penguji : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS (.....)
NIP: 195608291982031003

Penguji : Dr. Emil Budianto (.....)
NIP: 196003201986091001

Penguji : Asep Saefumillah, M.Si, Ph.D (.....)
NIP: 197012161997031002

Ditetapkan di :

Tanggal :

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Candra Irawan
NPM : 0806421685
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Studi Komponen Bioaktif Daun Sirih Merah (*Piper cf. Arcuatum* Blume)

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya,

Dibuat di :

Pada Tanggal :

Yang Menyatakan

(Candra Irawan)

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.

Pada tesis ini diungkapkan mengenai studi kimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume).

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dr. Herry Cahyana, selaku pembimbing I yang dengan sabar banyak memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
2. Dr. Endang Saepudin, selaku pembimbing II yang memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan tesis ini
3. Ibu Ir. Hj. Juli Astuti, M.A, selaku Direktur Akademi Kimia Analisis Bogor.
4. Ketua dan Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Kimia Program Pascasarjana-FMIPA-UI beserta seluruh Staf Pengajar, yang telah memberikan ilmunya.
5. Yatri, Dila, Evi, Ibu Rahayu, dan rekan-rekan angkatan 2008 Program Studi Magister Ilmu Kimia yang telah banyak berbagi suka dan duka selama pendidikan.
6. Mbak Hera, Ibu Tri, Ibu Jenny, Ibu Nunung, Reza, Ibu Iin, Ana, Dyah, Erna, Atan, Anton, dan Bapak Mido yang telah membantu secara teknis.
7. Ibu Inda Mapiliandari, M.Si dan rekan-rekan di Akademi Kimia Analisis Bogor yang telah memberikan izin pemakaian laboratorium dan alat-alat.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah mendukung dan membantu mulai dari penelitian hingga selesai penulisan.

Penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ayahanda Zawawi Djavar, Ibunda Sriyani, kakak-kakak, dan ponakan-ponakan, yang dengan kasih sayangnya selalu memberikan dorongan, semangat, dan doa tiada henti agar penulis dapat menyelesaikan studi ini. Dan tak lupa penulis sampaikan rasa terima kasih buat seseorang yang selalu memotivasi agar menjadi yang terbaik.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini belum sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun serta untuk kesempurnaan sangat

diharapkan. Akhir kata, semoga tesis ini bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan, khususnya bagi peminat ilmu kimia bahan alam.

Depok, Juni 2010

Penulis



ABSTRAK

Nama : Candra Irawan
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul : Studi Komponen Bioaktif Sirih Merah
(*Piper cf. arcuatum* Blume)

Sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Studi kimia dan farmakologis terhadap tanaman tersebut masih terbatas, sehingga senyawa yang memiliki aktivitas biologis dalam tanaman tersebut belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi komponen aktif antioksidan dan untuk mengetahui toksisitas daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume). Isolasi sirih merah dilakukan dengan cara ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Pemisahan ekstrak menggunakan metode kromatografi kolom, dengan fase diam silika gel dan fase gerak campuran antara *n*-heksana, etil asetat, dan metanol secara gradien. Identifikasi senyawa dalam fraksi A, B, dan C yang dihasilkan, dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography – Mass Spectrometer* (GC-MS). Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode *radical scavenger* (uji DPPH), sedangkan uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Data hasil analisis menunjukkan bahwa dalam ekstrak metanol daun sirih merah mengandung komponen aktif antioksidan dengan IC_{50} sebesar 3,44 mg/L dan toksisitas LC_{50} 16,15 mg/L.

Kata kunci : *Piper cf. arcuatum* Blume, *radical scavenger*, *Brine Shrimp Lethality Test*, *Artemia salina* Leach, IC_{50} , LC_{50}
xiv + 66 halaman : 24 gambar; 8 tabel
Daftar Pustaka : 45 (1980-2007)

ABSTRACT

Name : Candra Irawan
Program Study : Master of Science
Judul : Study of Bioactive Compounds from Sirih Merah
(*Piper cf. arcuatum* Blume)

Sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) is a kind of plant that is mostly used by society for traditional medicine. However, studies on pharmaceutical and chemistry fields on the plant is still limited, so that substance which has biological activity in the plant hasn't been recognized yet. The aim of this research is identify the active compounds of antioxidant from sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) and to know the toxicity of sirih merah. The isolation of sirih merah was done by numerous extracting levels using *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol. The chromatographic column method was used to separate the extract, using the gradient of the steady silica gel phase and mixing move phase between *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol. The identification of fraction A, B, and C compound is performed by using *Gas Chromatography – Mass Spectrometer* (GC-MS). The antioxidant activity assay is treated by the radical scavenger method (DPPH assay). The toxicity assay is treated by the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) used *Artemia salina* Leach. Based on analysis data shown that sirih merah contains active compounds of antioxidant with IC_{50} 3,44 mg/L and toxicity with LC_{50} 16,15 mg/L.

Keywords : *Piper cf. arcuatum* Blume, radical scavenger, *Brine Shrimp Lethality Test*, *Artemia salina* Leach, IC_{50} , LC_5
xiv + 66 pages : 24 pictures; 8 tables
Bibliography : 45 (1980-2007)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Jenis Penelitian dan Metode	2
1.4 Hipotesis.....	2
1.5 Tujuan Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tinjauan Umum Tanaman Sirih Merah (<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume) ..	3
2.1.1 Klasifikasi Tanaman (<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume)	3
2.1.2 Morfologi Tanaman	4
2.1.3 Manfaat Tanaman Sirih Merah	4
2.1.4 Kandungan Kimiawi	5
2.2 Spesi Oksigen dan Radikal Bebas	6
2.2.1 Reaksi-Reaksi Radikal	7
2.3 Antioksidan	8
2.4 Metode <i>Radical Scavenger</i>	11
2.5 Toksisitas	12
2.5.1 Uji Toksisitas terhadap <i>Artemia salina</i> Leach	13
3. BAHAN DAN METODE	14
3.1 Lokasi, Bahan, dan Peralatan	14
3.1.1 Lokasi Penelitian	14
3.1.2 Bahan dan Peralatan	14
3.1.2.1 Bahan	14
3.1.2.2 Peralatan	14
3.2 Bagan Pelaksanaan Penelitian	14
3.3 Cara Kerja	16
3.3.1 Uji Determinasi.....	16
3.3.2 Isolasi Sampel	16
3.3.2.1 Ekstraksi Sampel	16

Universitas Indonesia

3.3.2.2 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	16
3.4 Penapisan Fitokimia	18
3.4.1 Identifikasi Alkaloid	18
3.4.2 Identifikasi Flavonoid	18
3.4.3 Identifikasi Fenol	19
3.4.4 Identifikasi Saponin	19
3.4.5 Identifikasi Tanin	19
3.4.6 Identifikasi Glikosida Steroid	19
3.4.7 Identifikasi Sterol-Triterpenoid	19
3.5 Uji Aktivitas Antioksidan	19
3.5.1 Metode <i>Radical Scavenger</i>	20
3.6 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) dengan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	20
3.6.1 Pembiakan Udang	20
3.6.2 Persiapan Sampel	21
3.6.3 Percobaan BSLT	21
3.7 Analisis Senyawa Fraksi yang Diperoleh.....	21
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Determinasi Tanaman	22
4.2 Hasil Ekstraksi Daun Sirih (<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume)	22
4.3 Hasil Penapisan Fitokimia	23
4.4 Hasil Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	24
4.5 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	26
4.5.1 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstraksi <i>n</i> -Heksana	26
4.5.2. Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstraksi Etil Asetat	26
4.5.3 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstraksi Metanol	27
4.6 Hasil Analisis Senyawa Fraksi A dengan GC-MS	27
4.7 Hasil Analisis Senyawa Fraksi B dengan GC-MS	36
4.8 Hasil Analisis Senyawa Fraksi C dengan GC-MS	39
4.9 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan	41
4.9.1 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak <i>n</i> -Heksana	41
4.9.2 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Etil Asetat	42
4.9.3 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Metanol	43
4.9.4 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Fraksi A, B, dan C	44
4.9.5 Analisis IC ₅₀ Sampel Ekstrak <i>n</i> -Heksana, Etil asetat, Metanol, Fraksi A, B, dan C dengan Kontrol, dan BHT	46
4.10 <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT) dengan Larva <i>Artemia salina</i> Leach	47
4.10.1 Analisis LC ₅₀ Sampel Ekstrak <i>n</i> -Heksana, Etil Asetat, dan Metanol	48
5. SIMPULAN DAN SARAN	50

5.1 Simpulan	50
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	56



Universitas Indonesia

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman <i>Piper cf. arcuatum</i> Blume	3
Gambar 3.1	Bagan Pelaksanaan Penelitian	15
Gambar 4.1	Ekstrak kasar <i>n</i> -heksana (a); Ekstrak kasar etil asetat (b); dan Ekstrak kasar metanol (c)	22
Gambar 4.2	Hasil KLT ekstrak kasar <i>n</i> -heksana dengan eluen <i>n</i> -heksana : etil asetat (7 : 3)	24
Gambar 4.3	Hasil analisis KLT A dan KLT B	25
Gambar 4.4	Kromatogram GC fraksi A	27
Gambar 4.5	Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 9,487 menit..	28
Gambar 4.6	Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,086 menit	29
Gambar 4.7	Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,106 menit	31
Gambar 4.8	Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,485 menit	32
Gambar 4.9	Kromatogram GC fraksi B	34
Gambar 4.10	Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 18,171 menit	35
Gambar 4.11	Spektra massa fraksi B dari puncak dengan Rt 28,372 menit	36
Gambar 4.12	Kromatogram GC fraksi C	38
Gambar 4.13	Spektra massa fraksi C dari puncak dengan Rt 19,127 menit	39
Gambar 4.14	Spektra massa fraksi C dari puncak dengan Rt 22,978 menit	41
Gambar 4.15	Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak <i>n</i> - heksana dengan metode DPPH	43
Gambar 4.16	Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak etil asetat dengan metode DPPH	44
Gambar 4.17	Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak metanol dengan metode DPPH	45
Gambar 4.18	Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi A dengan metode DPPH	46
Gambar 4.19	Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi B dengan metode DPPH	46
Gambar 4.20	Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi C dengan metode DPPH	47
Gambar 4.21	IC ₅₀ dari sampel uji dan BHT dengan metode DPPH	48
Gambar 4.22	LC ₅₀ dari sampel uji dengan metode BSLT	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Identifikasi/determinasi tanaman sirih merah (<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume)	57
Lampiran 2	Hasil KLT sampel ekstrak <i>n</i> -heksana dari kolom kromatografi	58
Lampiran 3	Hasil KLT sampel ekstrak etil asetat dari kolom kromatografi	58
Lampiran 4	Hasil KLT sampel ekstrak metanol dari kolom kromatografi	59
Lampiran 5	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel ekstrak <i>n</i> -heksana dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	59
Lampiran 6	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel ekstrak etil asetat dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	60
Lampiran 7	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel metanol dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	60
Lampiran 8	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel fraksi A dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	60
Lampiran 9	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel fraksi B dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	61
Lampiran 10	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel fraksi C dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	61
Lampiran 11	Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515$ nm) sampel BHT dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.....	61
Lampiran 12	Hasil analisis % inhibisi dan IC ₅₀ terhadap sampel uji pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH setelah 30 menit.	62
Lampiran 13	Hasil uji BSLT ekstrak <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan metanol daun sirih merah	63
Lampiran 14	Tabel probit	63
Lampiran 15	Data perhitungan LC ₅₀ sampel <i>n</i> -heksana, etil asetat, dan metanol daun sirih merah	64
Lampiran 16	Kondisi operasi alat GC-MS	64

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Perbandingan eluen pemisahan ekstrak <i>n</i> -heksana.....	17
Tabel 3.2	Perbandingan eluen pemisahan ekstrak etil asetat	17
Tabel 3.3	Perbandingan eluen pemisahan ekstrak metanol	18
Tabel 4.1	Hasil uji penapisan fitokimia daun sirih merah	23
Tabel 4.2	Nilai Rf Hasil KLT ekstrak kasar <i>n</i> -heksana	25
Tabel 4.3	Nilai Rf Hasil KLT ekstrak kasar etil asetat (A)	25
Tabel 4.4	Nilai Rf Hasil KLT ekstrak kasar metanol (B).....	26
Tabel 4.5	Rata-rata hasil uji BSLT ekstrak heksana, etil esetat, dan metanol daun sirih merah (<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume)	48



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) merupakan salah satu jenis tanaman asli Indonesia yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Daun sirih merah merupakan bagian tanaman yang secara empiris digunakan oleh masyarakat untuk mengatasi berbagai penyakit seperti kanker, tumor, gangguan ginjal, lever, asam urat, hipertensi, radang prostat, nyeri sendi, dan diabetes melitus (Sudewo,B., 2005), namun penelitian ilmiah mengenai bioaktivitas dan senyawa kimia yang terkandung dalam sirih merah belum banyak dijumpai.

Manoi, F. (2007) melaporkan bahwa dalam daun sirih merah terkandung alkaloid, saponin, tanin, sineol, dan karvakrol. Karvakaol bersifat anti jamur, sedangkan tanin digunakan untuk mengobati sakit perut. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan identifikasi aktivitas senyawa yang memiliki aktivitas berbeda, sebagai contoh aktivitas antioksidan.

Antioksidan adalah adalah suatu zat yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau mencegah pembentukan radikal bebas pada proses oksidasi. Antioksidan menjaga keseimbangan antara oksidan dan antioksidan dalam tubuh dan mencegah penyakit yang disebabkan oleh stres oksidatif atau ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan (Gerald, 1987).

Selain uji aktivitas antioksidan dilakukan pula uji toksisitas. Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine-Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach Uji toksisitas ini merupakan uji pendahuluan antikanker (Meyer, 1982).. Sebagian besar tanaman yang memiliki sifat toksisitas LC₅₀ pada rentang 0,16-11,83 mg/L menunjukkan potensi sebagai antikanker (Lisdawati, V., 2002).

Adanya aktivitas antioksidan dan toksisitas dari suatu senyawa disebabkan oleh struktur suatu senyawa, serta gugus molekul senyawa yang berkaitan. (Siswandono, 1998), oleh karena itu perlu adanya identifikasi sifat dan struktur dari senyawa tersebut. Berdasarkan kenyataan tersebut, maka dilakukan penelitian tentang komponen bioaktif dari tanaman sirih merah yang memiliki sifat antioksidan dan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Penelitian ini diharapkan

Universitas Indonesia

dapat melengkapi data ilmiah yang dibutuhkan untuk mengoptimalkan pemanfaatan tanaman sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) sebagai salah satu tanaman sumber bahan baku obat tradisional.

1.2 Rumusan Masalah

Sirih merah umumnya digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai jenis penyakit. Berdasarkan hal ini perlu dipelajari komponen senyawa bioaktif dalam ekstrak daun sirih merah yang bersifat antioksidan dan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

1.3 Jenis Penelitian dan Metode

Penelitian dilakukan secara deskriptif dengan menggunakan bahan baku daun sirih merah. Metode penelitian yang dilakukan adalah ekstraksi, fraksinasi, uji fitokimia, identifikasi komponen menggunakan GC-MS, uji aktivitas antioksidan dengan metode *radical scavenger*, dan uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach.

1.4 Hipotesis

Daun sirih merah diduga mengandung senyawa-senyawa aktif antioksidan dan senyawaan yang bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah identifikasi komponen aktif antioksidan dan toksisitas daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tanaman Sirih Merah

2.1.1 Klasifikasi Tanaman (*Piper cf. arcuatum* Blume)

Tanaman *Piper cf. arcuatum* Blume merupakan tanaman yang tumbuh merambat dengan bentuk daun menyerupai hati dan bertangkai, yang tumbuh berselang-seling dari batangnya serta penampakan daun yang berwarna merah keperakan dan mengkilap.



Gambar 2.1 Tanaman *Piper cf. arcuatum* Blume

Secara taksonomi sirih merah mempunyai klasifikasi sebagai berikut :

Divisio	: Magnoliophyta
Classis	: Magnoliopsida
Ordo	: Piperales
Family	: Piperaceae
Genus	: Piper
Species	: <i>Piper cf. arcuatum</i> Blume

Universitas Indonesia

2.1.2 Morfologi Tanaman (Manoi, F. 2007)

Tanaman sirih mempunyai banyak spesies dan memiliki jenis yang beragam, seperti sirih gading, sirih hijau, sirih hitam, sirih kuning dan sirih merah. Semua jenis tanaman sirih memiliki ciri yang hampir sama, yaitu tanamannya merambat dengan bentuk daun menyerupai hati dan bertangkai yang tumbuh berselang-seling dari batangnya.

Sirih merah tumbuh merambat di pagar atau pohon. Tanaman ini termasuk di dalam famili *Piperaceae* dengan penampakan daun yang berwarna merah keperakan dan mengkilap saat kena cahaya. Ciri khas tanaman ini adalah berbatang bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Daunnya bertangkai membentuk jantung hati dan bagian ujung daun meruncing. Permukaan daun mengkilap dan tidak merata. Sirih merah dapat dibedakan dengan sirih hijau dari daunnya. Selain daunnya berwarna merah keperakan, bila daunnya disobek maka akan berlendir serta aromanya lebih wangi.

2.1.3 Manfaat Tanaman Sirih Merah

Sejak dahulu tanaman sirih merah telah diketahui memiliki berbagai khasiat obat untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Air rebusannya yang mengandung antiseptik digunakan untuk menjaga kesehatan rongga mulut dan menyembuhkan penyakit keputihan serta bau tak sedap.

Penelitian terhadap tanaman sirih merah sampai saat ini masih sangat kurang terutama dalam pengembangan sebagai bahan baku untuk biofarmaka. Selama ini pemanfaatan sirih merah di masyarakat hanya berdasarkan pengalaman yang dilakukan secara turun temurun dari orang tua kepada anak atau saudara terdekat secara lisan. Tanaman sirih merah telah dikonsumsi sejak dahulu di Jawa, terutama di Kraton Yogyakarta untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Berdasarkan pengalaman suku Jawa tanaman sirih merah mempunyai manfaat menyembuhkan penyakit ambien, keputihan dan obat kumur. Alkaloid di dalam sirih merah inilah yang berfungsi sebagai anti mikrob (Sudewo, B. 2005).

Selain bersifat antiseptik, sirih merah juga bisa dipakai mengobati penyakit diabetes, dengan meminum air rebusan sirih merah setiap hari akan menurunkan kadar gula darah sampai pada tingkat yang normal. Kanker merupakan penyakit yang

Universitas Indonesia

cukup banyak diderita manusia dan sangat mematikan, dapat disembuhkan dengan menggunakan serbuk atau rebusan dari daun sirih merah. Beberapa pengalaman di masyarakat menunjukkan bahwa sirih merah dapat menurunkan penyakit darah tinggi, juga menyembuhkan penyakit hepatitis (Sudewo, B. 2005).

Sirih merah dalam bentuk teh herbal bisa mengobati asam urat, kencing manis, maag dan kelelahan. Pengobatan ini telah dilakukan oleh pusat klinik herbal center yang ada di Jogjakarta. Pasien yang berobat sembuh dari diabetes karena mengkonsumsi teh herbal sirih merah. Sirih merah juga sebagai obat luar dapat memperhalus kulit. Secara empiris diketahui tanaman sirih merah dapat menyembuhkan penyakit batu ginjal, kolesterol, asam urat, serangan jantung, stroke, radang prostat, radang mata, masuk angin dan nyeri sendi (Sudewo, B. 2005).

2.1.4 Kandungan Kimiawi

Tanaman memproduksi berbagai macam bahan kimia untuk tujuan tertentu, yang disebut dengan metabolit sekunder. Metabolit sekunder tanaman merupakan bahan yang tidak esensial untuk kepentingan hidup tanaman tersebut, tetapi mempunyai fungsi untuk berkompetisi dengan makhluk hidup lainnya. Metabolit sekunder yang diproduksi tanaman bermacam-macam seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, poliketida, polifenol, sianogenik, glukosida, glukosinolat dan asam amino. Alkaloid merupakan metabolit sekunder yang paling banyak diproduksi tanaman. Alkaloid adalah bahan organik yang mengandung nitrogen sebagai bagian dari sistim heterosiklik. Nenek moyang kita telah memanfaatkan alkaloid dari tanaman sebagai obat. Sampai saat ini semakin banyak alkaloid yang ditemukan dan diisolasi untuk obat modern.

Para ahli pengobatan tradisional telah banyak menggunakan tanaman sirih merah karena mempunyai kandungan kimia yang penting untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Dalam daun sirih merah terkandung senyawa alkaloid, saponin, dan tanin. Kandungan kimia lainnya yang terdapat di daun sirih merah adalah minyak atsiri, hidrosikavikol, kavikol, kavibetol, karvakrol, *p-cymene*, *cineole*, kariofilen, kadimen estragol, terpena, dan fenil propana. Banyaknya kandungan zat/senyawa kimia bermanfaat inilah menyebabkan daun sirih merah memiliki manfaat yang sangat luas sebagai bahan obat. Karvakrol bersifat

desinfektan, anti jamur, sehingga bisa digunakan untuk obat antiseptik pada bau mulut dan keputihan. Tanin dapat digunakan untuk mengobati sakit perut (Manoi, F. 2007).

2.2 Spesi Oksigen dan Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom, spesi molekul atau senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron bebas yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya, sehingga bersifat elektrofilik dan reaktif. Pembentukan radikal bebas dalam tubuh berperan penting untuk ketahanan terhadap jasad renik, namun reaksi radikal bebas tersebut harus dikendalikan agar tidak membahayakan tubuh (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Jenis-jenis radikal bebas meliputi radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroperoksil (HO_2^{\cdot}), radikal hidroksil ($\cdot OH$), radikal peroksil (ROO^{\cdot}), radikal alkoksi (RO^{\cdot}), radikal lipoksi (LO^{\cdot}), radikal nitrit oksida (NO^{\cdot} ; NO^+ ; NO^-); sedangkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) meliputi berbagai jenis radikal bebas, singlet oksigen (1O_2), ozon (O_3), hidrogen peroksida (H_2O_2), lipid peroksida ($LOOH$), asam hipoklorida dan asam hipobromida ($HOCl$, $HOBr$), spesi peroksinitrit ($OONO^{\cdot}$; $OONOH$; $ROONO$), dan spesi N_xO_x (Murakami, *et.al.*, 1998).

Sumber radikal bebas dan ROS yang terdapat di dalam sistem biologis dapat berasal dari radikal eksogen dan radikal endogen. Radikal endogen adalah radikal bebas hasil metabolisme seluler yang melibatkan oksigen diantaranya seperti hasil dari rantai transport elektron pada mitokondria, mekanisme sel fagosit, proses enzimatis, autoksidasi yang dikatalisis logam transisi, dan peroksidasi lipid. Radikal eksogen adalah radikal yang diperoleh dari luar tubuh diantaranya berasal dari zat-zat polutan, radiasi cahaya matahari, sinar ultra violet, ozon, radiasi elektromagnetik seperti sinar gamma, zat kimia sintetis dalam industri makanan, pestisida, metabolisme obat, dan asap rokok (Halliwell *et al.*, 1992). Oleh karena itu tubuh terpapar radikal bebas secara terus menerus. Kelebihan radikal bebas dapat menyebabkan gangguan kesehatan organ tubuh seperti katarak mata, tumor pada kulit, dan pengendapan kolesterol pada dinding pembuluh darah (asteosklerosis).

Reaksi fenton adalah contoh reaksi radikal bebas yang dikatalisis oleh logam transisi dimana hidrogenperoksida bereaksi dengan ion Fe^{2+} menghasilkan radikal hidroksil yang akan mengoksidasi berbagai molekul biologi.

Universitas Indonesia

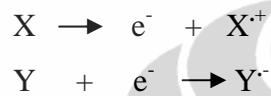
2.2.1 Reaksi-Reaksi Radikal

Secara umum pembentukan radikal dari molekul dapat terjadi melalui beberapa cara yaitu :

1. Melalui absorpsi radiasi misalnya ionisasi, ultraviolet, radiasi sinar tampak, radiasi panas. Contohnya pada reaksi fotolisis atau fotokimia. Penyerapan energi ini menyebabkan aktivasi molekul oksigen triplet menjadi singlet $^1\text{O}_2$. Perubahan triplet oksigen menjadi singlet oksigen dapat terjadi ketika terdapat suatu fotosensitisier seperti klorofil, haematoporphirin atau flavin termasuk riboflavin.



2. Melalui reaksi redoks yaitu :



Kehadiran ion-ion logam transisi contohnya pada tiol (R-SH) menyebabkan molekul tersebut mudah teroksidasi menjadi radikal (RS \cdot).

3. Melalui proses homolitik



4. Reaksi autooksidasi, misal pada oksidasi lipid. Oksidasi lipid ini terdiri dari empat tahap reaksi (Antolovich, M. *et all.* 2000), yaitu :

- a. Tahap inisiasi (terjadi pembentukan radikal)



- b. Tahap propagasi (reaksi radikal lipid dengan oksigen membentuk radikal peroksi lipid)



c. Tahap *Branching*

d. Tahapan terminasi (reaksi kombinasi 2 radikal menghasilkan produk yang stabil)

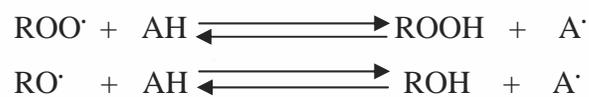


2.3 Antioksidan

Antioksidan atau antioksidan adalah suatu zat yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau mencegah pembentukan radikal bebas pada proses oksidasi (Gerald, 1987). Antioksidan juga disebut sebagai *scavenger* (zat/peredam) radikal bebas dan dapat menetralkan radikal bebas (Aruoma & Cuppet, 1997). Dalam pengertian kimia, antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron, tetapi dalam arti biologis antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam radikal bebas dan ROS yang bersifat oksidan mengoksidasi. Oksidasi adalah proses pengurangan elektron dan reduksi adalah proses penambahan elektron.

Menurut Scott, G. (1987) dan Gordon, M.H. (1990), antioksidan dikelompokkan menjadi:

- a. Antioksidan primer yaitu antioksidan yang sifatnya sebagai pemutus rantai radikal bebas (*chain-breaking antioxidant*), atau senyawa yang dapat mengurangi radikal alkilperoksil atau yang dapat mengoksidasi radikal alkil, umumnya mencegah autoksidasi lipid melalui pemberian atom-atom hidrogen kepada radikal lipid dengan reaksi :



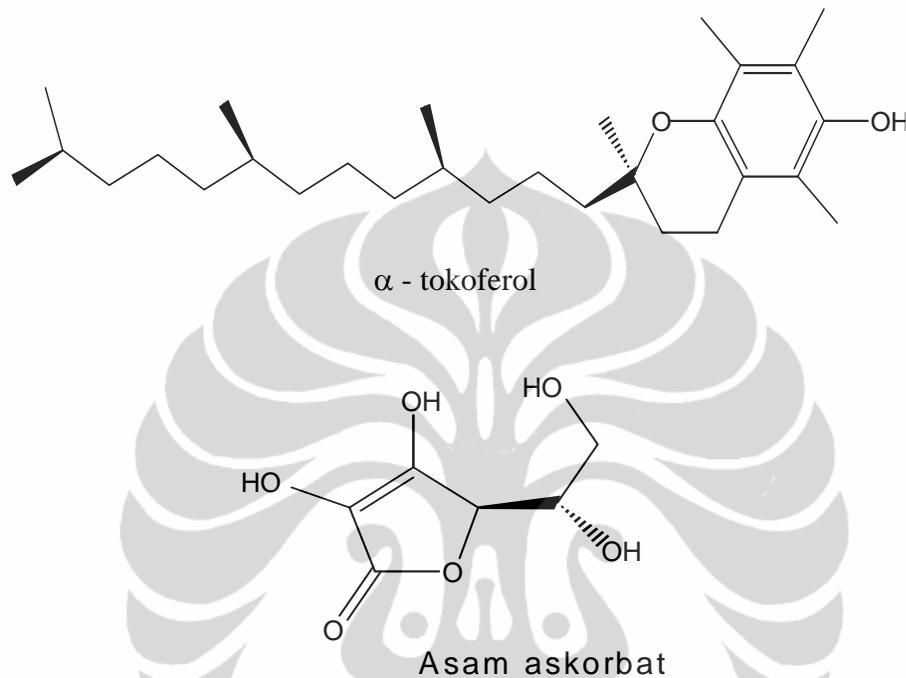
- b. Antioksidan sekunder atau antioksidan preventif adalah antioksidan yang menghambat terbentuknya radikal bebas dan oksigen aktif, serta bersifat

Universitas Indonesia

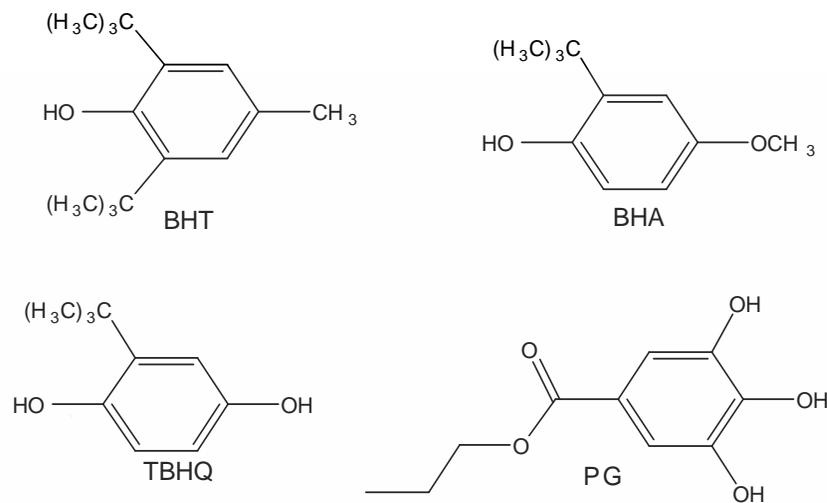
menurunkan kecepatan reaksi inisiasi melalui berbagai mekanisme, antara lain : penguraian dari hidroperoksida (deaktivator logam, penyerap/absorber UV), pengikatan ion-ion logam yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas, penghambatan enzim yang terlibat dalam produksi radikal bebas (Takahashi & Niki, 1998).

Menurut Winarno (1984), antioksidan berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi ;

- a. Antioksidan alami, senyawa yang termasuk antioksidan alami antara lain; α - tokoferol (vitamin E) dan asam askorbat.



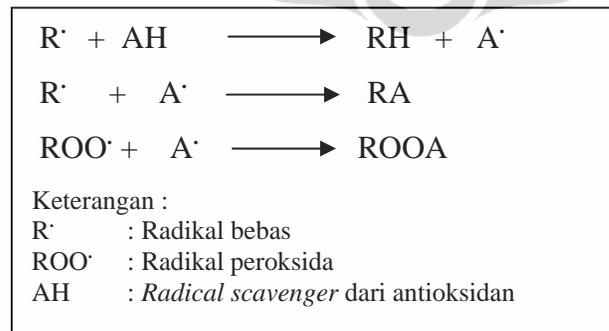
- b. Antioksidan sintetik, antioksidan yang termasuk jenis ini antara lain *Butylated hydroxyanisole (BHA)*, *Butylated hydroxytoluene (BHT)*, *Tert-Butyl Hidroquinone (TBHQ)*, dan *Propylgallate (PG)*. Antioksidan sintetik TBHQ, BHA, dan BHT sering ditambahkan ke dalam bahan pangan dengan tujuan mencegah terjadinya proses autooksidasi.



Pada tumbuhan mengandung banyak senyawa-senyawa fenolik yang dapat menghambat peroksidasi lipid seperti vitamin E. Aktivitas antioksidan yang besar diperoleh pada senyawa yang mengandung difenol orto seperti asam dihidroksibenzoat, adanya gugus OH fenolik yang berdekatan akan meningkatkan laju reaksi penghasil produk yang bersifat tidak radikal daripada laju reaksi pembentuk radikal bebas dan bersifat mengkhelasi atau mengikat ion-ion logam transisi (Ogata *et al.*, 1997). Selain gugus fenol, gugus flavonoida juga berpotensi sebagai antioksidan karena dapat menghambat peroksidasi lipid.

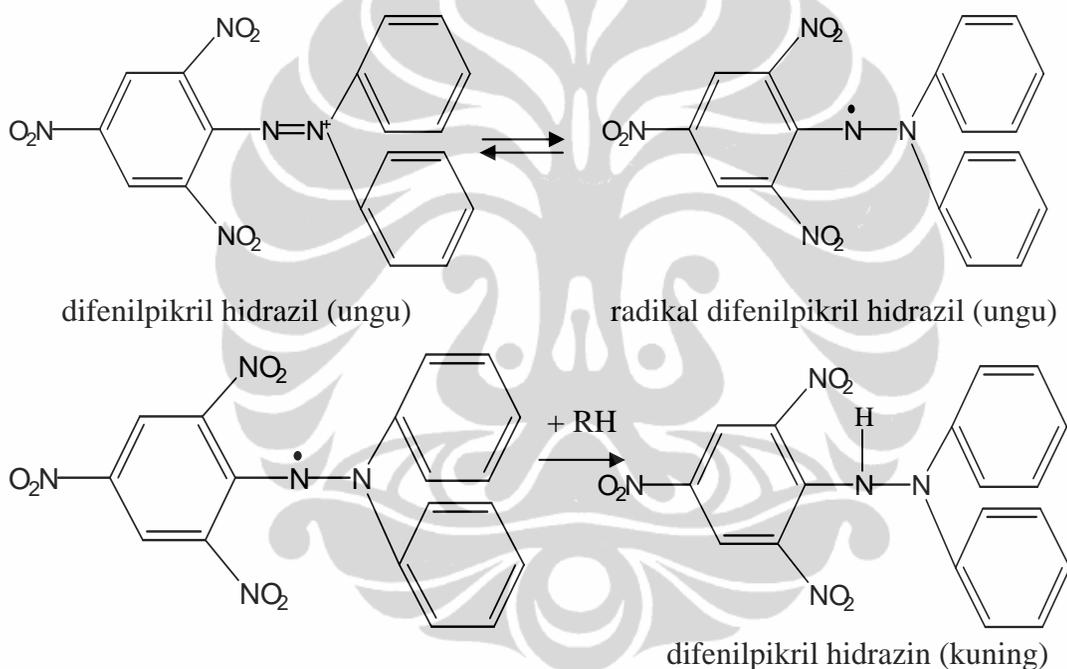
2.4 Metode *Radical Scavenger*

Metode *radical scavenger* merupakan metode uji aktivitas antioksidan melalui pemerangkap radikal, dalam hal ini antioksidan bertindak sebagai donor proton (hidrogen) pada radikal bebas, sehingga terjadi penghambatan dalam pembentukan radikal bebas. Reaksi *radical scavenger* secara umum dapat terlihat sebagai berikut (Wang, L. et al.2005):



Pada mekanisme *radical scavenger* ini, jika asam lemak diberi inisiator seperti panas, cahaya, enzim, atau logam berat, maka akan terjadi reaksi inisiasi sebagai reaksi tahap awal membentuk radikal bebas, selanjutnya radikal bebas ini akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksida yang bersifat reaktif. Radikal-radikal bebas yang terbentuk tersebut dapat dideaktivasi dengan senyawa yang disebut *radical scavenger* yang bertindak sebagai donor proton (hidrogen) (Wang, L. et al.2005).

Prinsip metode *radical scavenger* dengan uji DPPH (difenilpikril hidrazil) secara spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang, $\lambda = 515 \text{ nm}$, berdasarkan pengukuran absorbansi DPPH sebagai kontrol dan saat DPPH ditambah sampel (mengandung antioksidan) adalah peredaman radikal bebas difenilpikril hidrazil (berwarna ungu) oleh antioksidan (sebagai donor proton), sehingga membentuk difenilpikril hidrazin (berwarna kuning), dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :



2.5 Toksisitas

Toksisitas adalah kemampuan atau kekuatan sifat toksik suatu materi atau zat yang dapat mengakibatkan efek yang merugikan (letal atau subletal) pada makhluk hidup. Wibowo, A.E., (2003) menyatakan bahwa toksisitas adalah tingkat daya

racun suatu bahan yang dapat menimbulkan bahaya terhadap bagian atau fungsi organ suatu organisme.

Uji toksisitas atau uji hayati digunakan untuk mengevaluasi konsentrasi dari bahan kimia dan lamanya waktu pemaparan yang berpengaruh terhadap organisme uji baik terhadap fungsi-fungsi tubuhnya (fisiologis) maupun terhadap pertumbuhannya. Wibowo, A.E., (2003) menyatakan bahwa reaksi biota uji yang digunakan untuk mendefinisikan toksisitas dibagi menjadi empat kategori, yaitu:

- a. Toksisitas letal: kekuatan toksik yang langsung menyebabkan kematian pada organisme.
- b. Toksisitas subletal: kekuatan toksik yang menyebabkan gangguan pada organisme, tidak menyebabkan kematian pada organisme secara langsung. Gangguan ini dapat meliputi gangguan pada pertumbuhan, reproduksi, dan kebiasaan makan.
- c. Toksisitas akut: kekuatan toksik yang pengaruhnya dapat dilihat dari siklus hidup organisme sehingga periode hidup suatu organisme akibat pemaparan suatu toksikan jauh berkurang dari periode waktu sebenarnya.
- d. Toksisitas kronik: kekuatan kronik yang sebagian besar pengaruhnya dapat dilihat setidaknya pada suatu daur hidup organisme.

2.5.1 Uji Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach

Uji toksisitas yang biasa dilakukan adalah *Brine-Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebab senyawa-senyawa yang memiliki biokativitas tertentu sering mematikan larva udang. Kemampuan untuk mematikan larva udang ini dapat digunakan sebagai uji pendahuluan yang cepat dan sederhana untuk mengetahui bioaktivitas suatu senyawa secara *in vivo*. Senyawa yang aktif akan menghasilkan tingkat mortalitas yang tinggi (Kristanti, A.N. dkk, 2008).

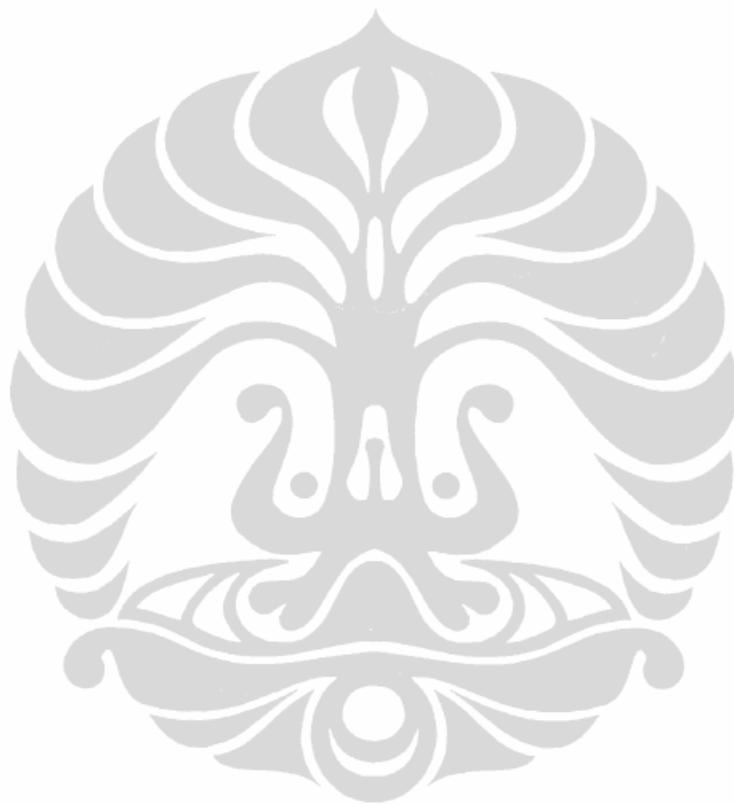
Meyer (1982) memanfaatkan *Artemia salina* L. untuk menguji aktivitas biologis secara umum dan digunakan pertama kali oleh Institut Kanker di Amerika Serikat. Penelitian-penelitian terhadap senyawa-senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker memerlukan biaya yang cukup besar, oleh karena itu pengujian menggunakan *Artemia salina* L. ini digunakan sebagai uji pendahuluan.

Universitas Indonesia

Apabila dalam pengujiannya memperlihatkan hasil yang cukup baik, maka dapat dilakukan pengujian lebih lanjut (Kristanti, A.N. dkk, 2008).

Uji aktivitas dengan menggunakan larva udang memiliki spektrum aktivitas farmakologis yang luas, prosedur sederhana, cepat, tidak memerlukan biaya yang besar, dan hasilnya dapat dipercaya. Lebih jauh lagi, bahwa metode ini sering dikaitkan sebagai metode penyarian senyawa antikanker. Oleh karena itu, uji ini digunakan secara luas dalam penelitian bahan alam (Wibowo, A.E. 2003).

Data yang diperoleh akan diolah untuk mendapatkan nilai LC_{50} dengan selang kepercayaan 95%, menggunakan *Probit Analysis Method* yang diuraikan oleh Finney (Wibowo, A.E. 2003). Menurut Meyer, H.N. (1982), senyawa dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm dikatakan bersifat aktif.



Universitas Indonesia

BAB 3 **BAHAN DAN METODE**

3.1 Lokasi, Bahan, dan Peralatan

3.1.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini adalah bidang kimia hayati (kimia bahan alam) dan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Uji & Kompetensi Akademi Kimia Analisis Bogor.

3.1.2 Bahan dan Peralatan

3.1.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan uji dan bahan kimia. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) kering yang dikumpulkan dari tanaman hasil budidaya peneliti di daerah Tanjungkarang, Lampung. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, etil asetat, asam sulfat pekat, *n*-heksana, asam klorida 2 %, asam klorida pekat, larutan feriklorida, anhidrida asam asetat, asam asetat glasial, kloroform, *Butylated Hydroxytoluen* (BHT), silika gel 60 F₂₅₄, silika gel 60 (Merck 7734), telur udang *Artemia salina* Leach, DMSO, air laut, dan akuades.

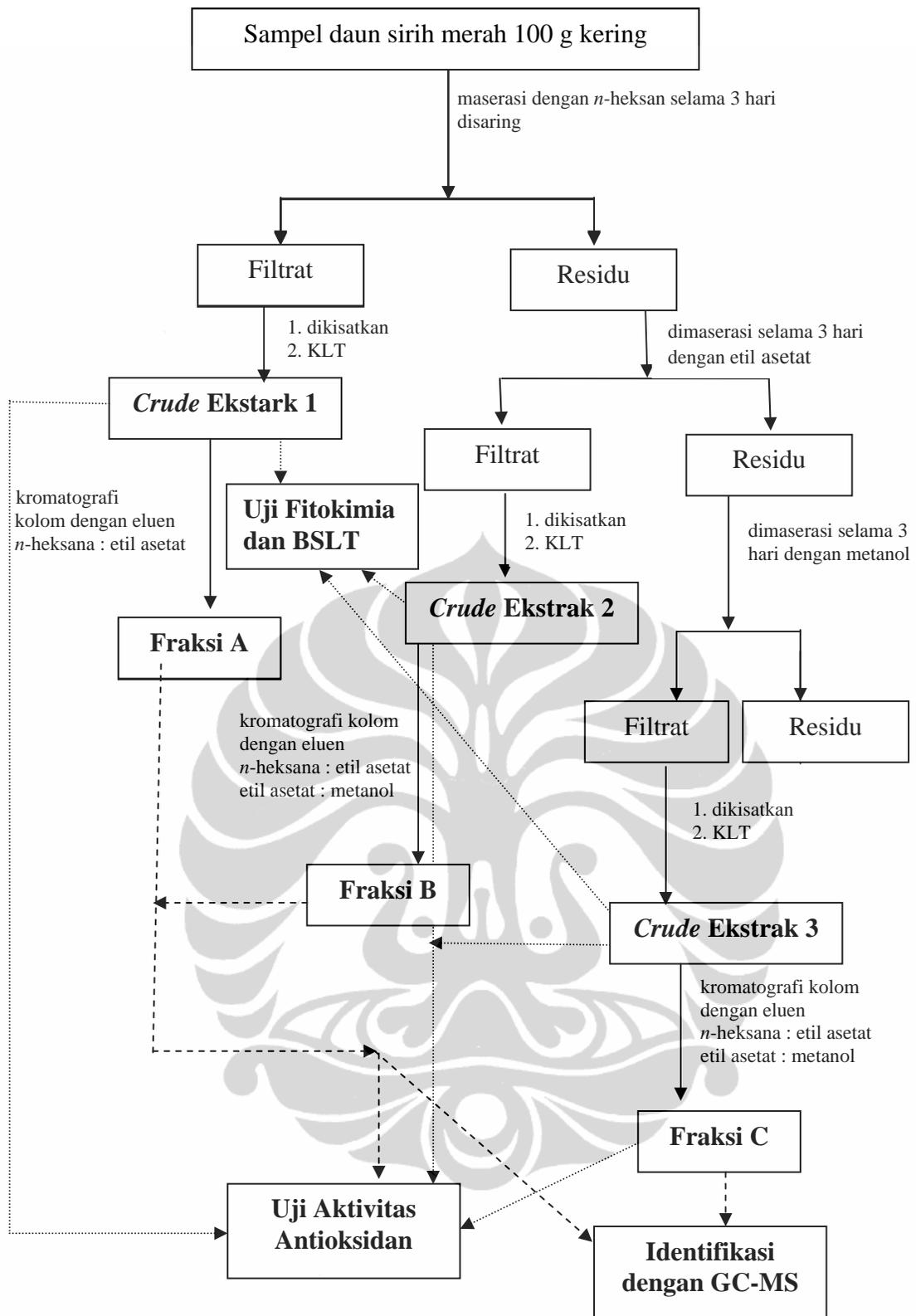
3.1.2.2 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, neraca analitik, rotary shaker, rotary evaporator, oven, peralatan gelas (erlenmeyer, gelas beker, pipet ukur, pipet gondok, corong, pengaduk, labu ukur, botol vial, pipet mikro, dan lain-lain), *incubator*, kolom kromatografi, lampu UV (panjang gelombang 254 nm dan 366 nm), kotak dengan sekat berlubang, dan GC – MS.

3.2 Bagan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan tiga tahap. Tahap pertama: isolasi sampel, tahap kedua penapisan fitokimia, uji aktivitas antioksidan dan uji toksistas (*Brine Shrimp Lethality Test*: BSLT), dan tahap ketiga identifikasi struktur molekul. Bagan penelitian secara garis besar dapat dilihat dalam Gambar 3.1.

Universitas Indonesia



Gambar 3.1. Bagan Pelaksanaan Penelitian

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Uji Determinasi

Uji determinasi tanaman dimaksudkan untuk mendapatkan spesies dari tanaman yang digunakan dalam penelitian. Uji determinasi ini dilakukan di Herbarium Bogoriense, bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

3.3.2 Isolasi Sampel

3.3.2.1 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan cara perendaman atau maserasi dengan beberapa pelarut organik. Daun sirih merah dipotong kecil-kecil, kemudian dikeringkan pada temperatur ruang. Daun sirih merah kering yang sudah halus sebanyak 100 g direndam dalam pelarut organik (*n*-heksana) sebanyak 5 L selama tiga hari, kemudian disaring, filtrat yang diperoleh diuapkan kembali hingga kering. Hasil yang diperoleh merupakan ekstrak kasar dari *n*-heksana. Residu dari perendaman pertama seluruhnya direndam kembali dalam etil asetat untuk memperoleh ekstrak kasar etil asetat sebanyak 5 L selama tiga hari, disaring dan filtrat diuapkan, diperoleh ekstrak kasar etil asetat, kemudian residu dari perendaman etil asetat direndam kembali dalam metanol sebanyak 5 L selama tiga hari untuk memperoleh ekstrak kasar metanol, maserasi dilakukan berulang sampai hasil ekstrak berwarna bening dan diharapkan semua senyawa dapat terlarut di dalam pelarutnya.

3.3.2.2 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Gelas beker yang berisi silika gel (50 g) ditambahkan *n*-heksana, diaduk hingga rata dan menyerupai bubuk. Adonan bubuk tersebut dimasukkan ke kolom berukuran panjang 50 cm, berdiameter 2 cm, dan pada ujung kolom bagian dalam diberi kapas pada keadaan kran terbuka agar *n*-heksana dapat menetes keluar dan ditampung. Kolom yang telah berisi bubuk silika gel diusahakan tidak terdapat gelembung udara di dalamnya. Setelah permukaan *n*-heksana tinggal sekitar 3 cm di atas permukaan silika gel, maka kran ditutup. Silika gel yang terdapat dalam kolom berfungsi sebagai fasa diam.

Ekstrak kasar *n*-heksana (0,2 g) dilarutkan dalam sedikit *n*-heksana dan ditambahkan silika gel, diaduk hingga rata. *n*-Heksana diuapkan dengan penangas air pada suhu 40°C hingga diperoleh residu, kemudian dimasukkan ke kolom.

Eluen yang berfungsi sebagai fasa gerak dimasukkan ke kolom dengan hati-hati agar sampel tidak berubah posisi. Perbandingan antara *n*-heksana dan etil asetat yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Perbandingan eluen pemisahan ekstrak *n*-heksana

<i>n</i> -Heksana (mL)	Etil asetat (mL)
100	0
90	10
80	20
70	30
30	70
0	100

Cairan hasil pemisahan ditampung dalam botol-botol berukuran 10 mL, kemudian dilakukan uji KLT. Identifikasi hasil pengujian dilakukan dengan sinar UV, pada panjang gelombang, $\lambda = 254$ nm dan 366 nm. Cairan yang dalam uji KLT memiliki spot dengan Rf sama dikumpulkan menjadi satu botol. Perlakuan yang sama dilakukan untuk sampel ekstrak kasar etil asetat (0,5 g) dan ekstrak kasar metanol (0,5 g). Eluen yang digunakan untuk masing-masing ekstrak dapat dilihat pada Tabel 3.2 dan Tabel 3.3.

Tabel 3.2 Perbandingan eluen pemisahan ekstrak etil asetat

PERBANDINGAN ELUEN
<i>n</i> -heksana : etilasetat (90 : 10)
<i>n</i> -heksana : etilasetat (80 : 20)
<i>n</i> -heksana : etilasetat (70 : 30)
<i>n</i> -heksana : etilasetat (60 : 40)
etilasetat (100)
etilasetat : metanol (70 : 30)
etilasetat : metanol (60 : 40)

Tabel 3.3 Perbandingan eluen Pemisahan ekstrak metanol

PERBANDINGAN ELUEN
n-heksana : etilasetat (90 : 10)
n-heksana : etilasetat (70 : 30)
n-heksana : etilasetat (60 : 40)
n-heksana : etilasetat (40 : 60)
etilasetat : metanol (90 : 10)
etilasetat : metanol (70 : 30)
etilasetat : metanol (40 : 60)
etilasetat : metanol (20 : 80)
metanol (100)

3.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dengan metode *Ciulei* dilakukan terhadap ekstrak kasar *n*-heksana, etil aetat, dan metanol. Uji penapisan fitokimia yang dilakukan meliputi uji alkaloida, flavonoida, fenol, saponin, tannin, glikosida, dan sterol - triterpenoid.

3.4.1 Identifikasi Alkaloida

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, dilarutkan dalam 2 mL HCl 2 %, dipanaskan sambil dikocok, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh sebagian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi *Meyer* dan sebagian lagi ditambahkan 2-3 tetes pereaksi *Dragendorff*. Adanya senyawa alkaloida ditunjukkan oleh terjadinya endapan putih dengan pereaksi *Meyer* dan endapan jingga dengan pereaksi *Dragendorff*.

3.4.2 Identifikasi Flavonoida

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 1-2 mL metanol 50% , dipanaskan pada suhu 50°C, dan setelah dingin ditambahkan logam magnesium dan 4-5 tetes HCl pekat. Adanya warna merah atau jingga pada filtrat menunjukkan adanya flavonoida.

3.4.3 Identifikasi fenol

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambah 2 mL aquades dan beberapa tetes larutan FeCl_3 , terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya fenol.

3.4.4 Identifikasi Saponin

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambah 3 mL aquades, kemudian dikocok selama 15 menit untuk diamati terjadinya busa setinggi 1 cm yang bertahan selama 15 menit.

3.4.5 Identifikasi Tanin

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambah dengan 1-2 mL FeCl_3 . Terjadinya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin.

3.4.6 Identifikasi Glikosida Steroid

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 0,5 mL kloroform, kemudian larutan tersebut dipindahkan ke tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan H_2SO_4 pekat ke dasar tabung, terbentuknya cincin coklat kemerahan menunjukkan adanya glikosida steroid.

3.4.7 Identifikasi Sterol - Triterpenoid

Sampel (0,25 g) dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL anhidrida asetat dan 0,5 mL kloroform, selanjutnya ditambahkan H_2SO_4 pekat setetes demi tetes sebanyak 0,2 mL ke dasar tabung, terbentuk warna biru viole (ungu) menunjukkan adanya sterol - triterpenoid.

3.5 Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak kasar *n*-heksana, etil asetat, metanol, dan fraksi-fraksi dari hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode *radical scavenger* (uji DPPH).

3.5.1 Metode Radical Scavenger/Uji DPPH (Wang Li-yan, *et al*, 2005).

Larutan DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) 0,5 mM dalam metanol dipipet masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke botol vial. Sampel yang akan diuji dipersiapkan sebanyak 1 mg/L (ppm), 3 ppm, dan 5 ppm dalam metanol, dimasukkan ke botol vial yang telah berisi larutan DPPH 0,5 mM. Selanjutnya diencerkan dengan metanol sampai volume menjadi 5 mL. Absorbansi DPPH diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang, $\lambda = 515$ nm, per lima menit selama 30 menit. Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan sampel.

Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel disebut sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{.Inhibisi} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan :

A_{kontrol} = Absorbansi awal 0 menit

A_{sampel} = Absorbansi sampel saat t menit

Nilai hasil perhitungan dimasukkan ke persamaan linier ($Y = aX + b$) dengan konsentrasi ppm (mg/L) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu Y). Nilai IC_{50} diperoleh dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50 %.

3.6 Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

3.6.1 Pembiakan Udang

Dalam sebuah kotak yang telah dibagi menjadi dua bagian dengan sekat berlubang dimasukkan air laut secukupnya. Salah satu sisinya ditutup dengan aluminium foil dan telur udang *Artemia salina* Leach dimasukkan kedalamnya, lalu kotak diletakkan di bawah lampu UV. Setelah 48 jam telur menetas menjadi larva.

3.6.2 Persiapan Sampel

Larutan uji ekstrak kasar *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dari daun sirih dibuat dengan konsentrasi 2000, 200, dan 20 $\mu\text{g/mL}$ (ppm). Sampel nonpolar yang bersifat kurang larut ditambahkan DMSO kurang lebih 10 μL .

3.6.3 Percobaan BSLT

Air laut 100 μL yang berisi 10 ekor larva udang dimasukkan ke lubang vial uji, kemudian dimasukkan pula larutan ekstrak sebanyak 100 μL sehingga konsentrasi ekstrak dalam tiap lubang vial berturut-turut menjadi: 1000; 100; dan 10 $\mu\text{g/mL}$. Untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Sebagai kontrol dipakai 100 μL air laut yang berisi 10 ekor larva udang ditambah dengan 100 μL air laut. Setelah dibiarkan selama 24 jam, udang yang masih hidup dan yang sudah mati dihitung jumlahnya.

Data hasil pengujian BSLT dianalisis menggunakan metode Sam (Colegate, 1993) berdasarkan perhitungan jumlah larva yang mati dan yang masih hidup. Tingkat kematian atau mortalitas (%) diperoleh dengan membandingkan antara jumlah yang mati dibagi dengan jumlah total larva. Nilai LC_{50} diperoleh melalui penentuan nilai probit, yaitu mengkonversi nilai persen kematian dengan tabel probit (Lampiran 1). Ploting data antara nilai probit dengan *log* konsentrasi akan diperoleh persamaan garis regresi:

$$y = a + bx$$

Keterangan:

- y = 50 (menyatakan larva udang yang mengalami kematian sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam)
- a = slope
- b = intersep
- x = menyatakan konsentrasi larutan yang menyebabkan kematian terhadap 50% larva

3.7 Analisis Senyawa Fraksi yang Diperoleh

Kristal putih fraksi A, fraksi B, dan fraksi C dianalisis menggunakan GC-MS.

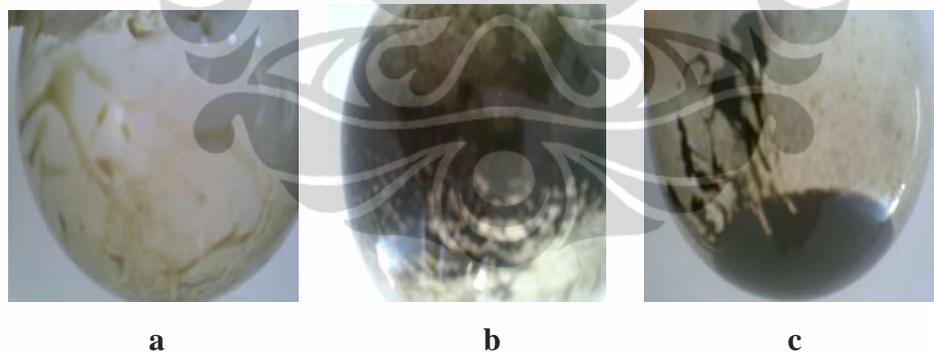
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Tanaman

Untuk mengetahui jenis tanaman Sirih merah yang digunakan dalam penelitian ini, dilakukan uji determinasi di Herbarium Bogoriense, bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI, dan diketahui tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis (*Piper cf. arcuatum* Blume) seperti ditampilkan dalam Lampiran 1.

4.2 Hasil Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper cf. arcuatum* Blume)

Ekstraksi dilakukan terhadap daun sirih merah yang telah tua. Daun yang telah tua secara umum menunjukkan kadar kandungan metabolit sekunder tertinggi, sehingga pengujian aktivitas terhadap senyawa metabolit sekunder tanaman terwakili dengan sempurna. Pembuatan ekstraksi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan metanol atas dasar pemikiran bahwa masing-masing metabolit sekunder diketahui memiliki sifat kelarutan yang berbeda-beda, sehingga dengan menggunakan berbagai macam jenis pelarut dianggap keseluruhan metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel relatif terekstraksi sempurna (Perrin, 1988). Hasil ekstraksi memberikan jumlah dan bentuk ekstrak kasar yang berbeda-beda, seperti terlihat dalam Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Ekstrak kasar *n*-heksana (a); Ekstrak kasar etil asetat (b); dan Ekstrak kasar metanol (c)

Rendemen ekstrak yang diperoleh menunjukkan perbedaan tingkat ekstraktif pelarut, dari 100 g daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) kering yang

Universitas Indonesia

digunakan dalam penelitian ini dapat diperoleh ekstrak kasar *n*-heksana sebanyak 1,70 g atau 1,67% berupa minyak berwarna kehijauan; ekstrak kasar etil asetat sebanyak 6,5 g atau 6,40% berupa minyak berwarna hijau kecoklatan; dan ekstrak kasar metanol sebanyak 10,30 g atau 10,15 % berupa minyak berwarna hijau kehitaman. Pelarut *n*-heksana memiliki kemampuan ekstraktif yang paling rendah terhadap senyawa metabolit sekunder dalam tanaman berdasarkan jumlah rendemen yang diperolehnya, sedangkan pelarut metanol memiliki kemampuan ekstraktif tertinggi dilihat dari perolehan rendemen. Bentuk morfologis masing-masing ekstrak kasar, baik dari segi warna maupun bentuk fisik, menunjukkan pula suatu perbedaan yang memperkuat bahwa golongan metabolit sekunder yang terekstraksi oleh berbagai jenis pelarut yang digunakan memang berbeda.

4.3 Hasil Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak kasar *n*-heksana, ekstrak kasar etil asetat, dan ekstrak kasar metanol. Tujuan penapisan fitokimia ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa-senyawa kimia yang dikandung dalam ekstrak kasar daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume). Diketahui bahwa dalam ekstrak kasar tersebut menunjukkan adanya senyawa alkaloida, saponin, tannin, glikosida steroid dan sterol -triterpenoid, seperti dalam Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji penapisan fitokimia daun sirih merah

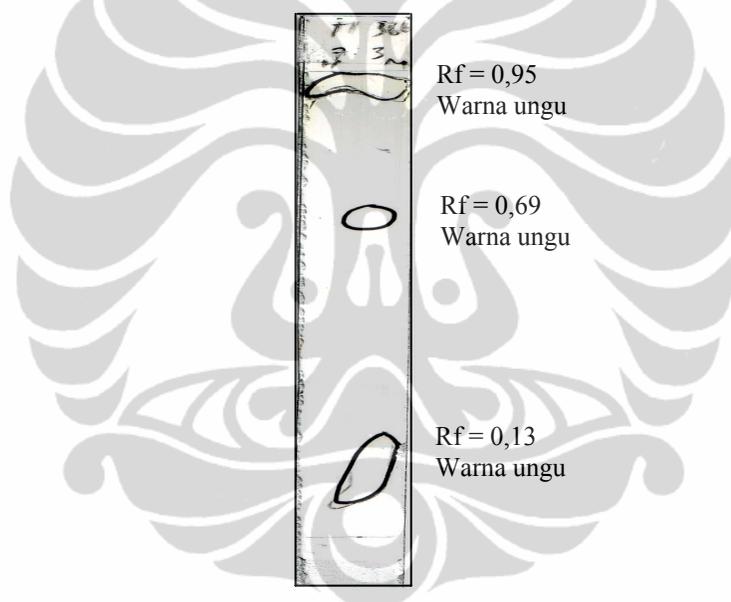
Uji golongan	Ekstrak kasar		
	<i>n</i> -Heksana	Etil asetat	Metanol
Alkaloid	-	+	+
Flavonoid	-	-	-
Fenolik	-	-	-
Saponin	-	-	+
Tannin	-	-	+
Glikosida steroid	-	-	+
Sterol- triterpenoid	-	-	-

Keterangan : + = terbentuk warna/ endapan
 - = tidak terbentuk warna/endapan

Ekstrak kasar yang menunjukkan kandungan metabolit sekunder paling lengkap berdasarkan metode *Ciulei* adalah ekstrak kasar metanol.

4.4 Hasil Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan senyawa-senyawa kimia dalam ekstrak kasar daun sirih merah dilakukan dengan KLT. Berdasarkan hasil KLT, maka dipilih campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 7 : 3 untuk sampel ekstrak kasar *n*-heksana, sedangkan untuk ekstrak kasar etil asetat dan ekstrak kasar metanol dipilih campuran pelarut etil asetat dan metanol dengan perbandingan 7 : 3. Analisis secara KLT menunjukkan adanya perbedaan warna serta perbedaan harga R_f dari bercak noda (spot) yang ditunjukkan pada lempeng KLT, baik secara langsung ataupun dengan bantuan sinar UV pada panjang gelombang, $\lambda = 254$ nm dan 366 nm, seperti terlihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3. Hal ini berarti bahwa polaritas pelarut memegang peranan penting terhadap jenis metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman.

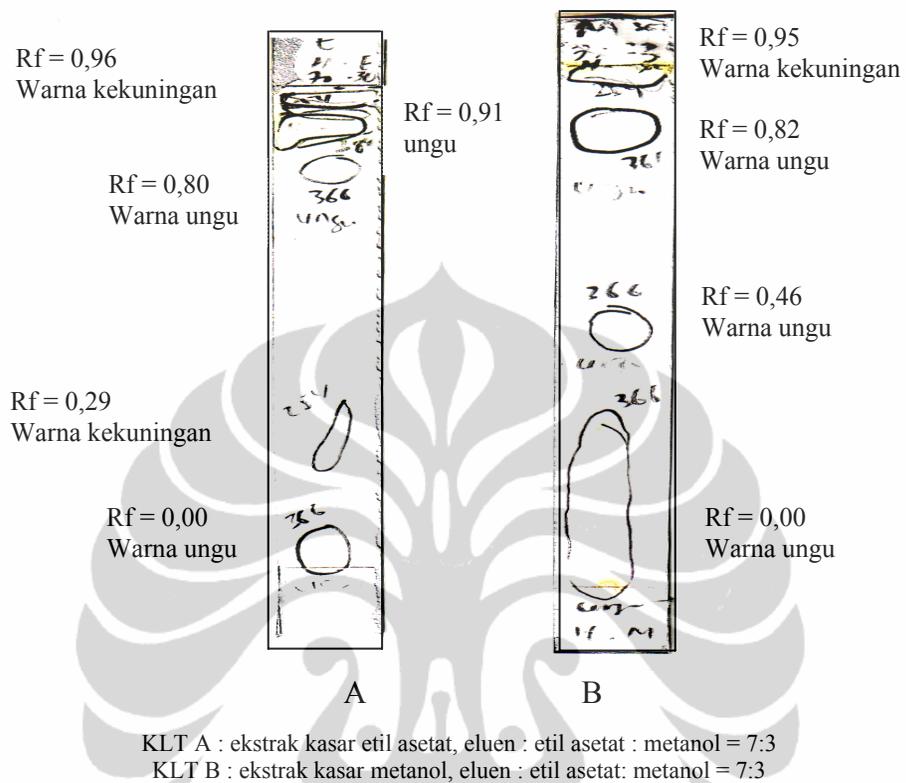


Gambar 4.2 Hasil KLT ekstrak kasar *n*-heksana dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (7 : 3)

Dari Gambar 4.2. diketahui bahwa ekstrak kasar *n*-heksana minimum dapat terdeteksi adanya tiga spot dengan nilai R_f yang berbeda-beda seperti terlihat dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai Rf hasil KLT ekstrak kasar *n*-heksana

No Spot	Nilai Rf	Warna pengamatan dengan bantuan sinar UV	Lampu UV
1	0,95	Ungu	366 nm
2	0,69	Ungu	366 nm
3	0,13	Ungu	366 nm



Gambar 4.3 Hasil analisis KLT A dan KLT B

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa ekstrak kasar etil asetat minimum dapat terdeteksi adanya lima spot dan ekstrak kasar metanol minimum dapat terdeteksi empat spot dengan nilai Rf yang berbeda-beda seperti terlihat dalam Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

Tabel 4.3 Nilai Rf hasil KLT ekstrak kasar etil asetat (A)

No Spot	Nilai Rf	Warna pengamatan dengan bantuan sinar UV	Lampu UV
1	0,96	Kekuningan	254 nm
2	0,91	Ungu	366 nm
3	0,80	Ungu	366 nm
4	0,29	Kekuningan	254 nm
5	0,00	Ungu	366 nm

Tabel 4.4. Nilai Rf hasil KLT ekstrak kasar metanol (B)

No Spot	Nilai Rf	Warna pengamatan dengan bantuan sinar UV	Lampu UV
1	0,95	Kekuningan	254 nm
2	0,82	Ungu	366 nm
3	0,46	Ungu	366 nm
4	0,00	Ungu	366 nm

4.5 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Berdasarkan hasil KLT terhadap masing-masing ekstrak kasar *n*-heksana, ekstrak kasar etil asetat, dan ekstrak kasar metanol, selanjutnya dilakukan pemisahan lanjut dengan menggunakan kolom kromatografi untuk memisahkan komponen-komponen yang ada.

4.5.1 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstrak *n*-Heksana

Pemisahan terhadap komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak kasar *n*-heksana dilakukan dengan kolom kromatograf silika-gel menggunakan pelarut *n*-heksana: etil asetat dengan komposisi secara gradien. Pemisahan ini menghasilkan tujuh buah isolat. Hasil KLT menggunakan eluen *n*-heksana (7): etil asetat (3) menunjukkan bahwa isolat 1 hingga 6 dapat digabungkan sebab mempunyai nilai Rf yang hampir sama. Hasil penggabungan isolat ini disebut fraksi A yang berbentuk padatan dengan berat 0,027 g. Fraksi A ini digunakan sebagai sampel uji antioksidan. Hasil KLT dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.5.2 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstrak Etil asetat

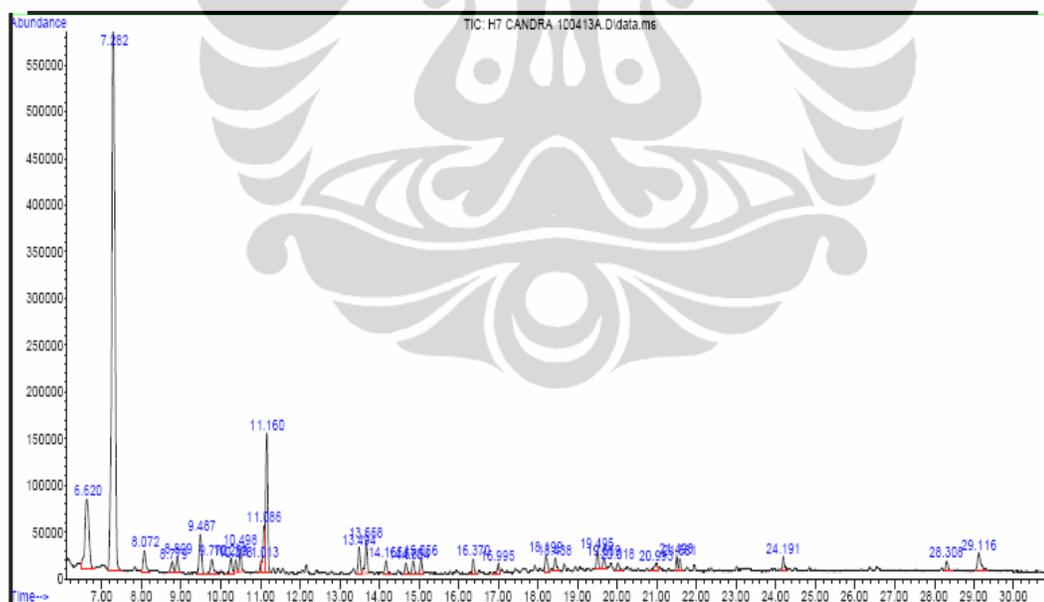
Pemisahan terhadap komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak etil asetat dilakukan dengan kolom kromatograf silika-gel menggunakan pelarut campuran *n*-heksana : etil asetat dan etil asetat : metanol dengan komposisi secara gradien. Pemisahan ini menghasilkan beberapa komponen-komponen kimia. Hasil KLT terhadap botol ke 96 menggunakan eluen etil asetat (7) : metanol (3) mengandung satu spot dengan harga Rf = 0,91. Penguapan pelarut pada botol 96 menghasilkan kristal berwarna putih sebanyak 0,0032 g yang selanjutnya disebut fraksi B. Fraksi B ini digunakan sebagai sampel uji antioksidan. Hasil KLT dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.5.3 Hasil Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dari Ekstrak Metanol

Pemisahan terhadap komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak metanol dilakukan dengan kolom kromatograf silika-gel menggunakan pelarut campuran *n*-heksana : etil asetat, etil asetat : metanol dengan komposisi secara gradien. Pemisahan ini menghasilkan beberapa komponen-komponen kimia. Hasil KLT terhadap isolat pada botol tampungan ke 10 hingga ke 12 diketahui mengandung spot dengan harga R_f yang sama, sehingga isolat masing-masing digabung menjadi satu. Penguapan pelarut pada botol hasil penggabungan diperoleh padatan kehijauan sebanyak 0,0031 g yang selanjutnya disebut fraksi C. Fraksi C ini digunakan sebagai sampel uji antioksidan.

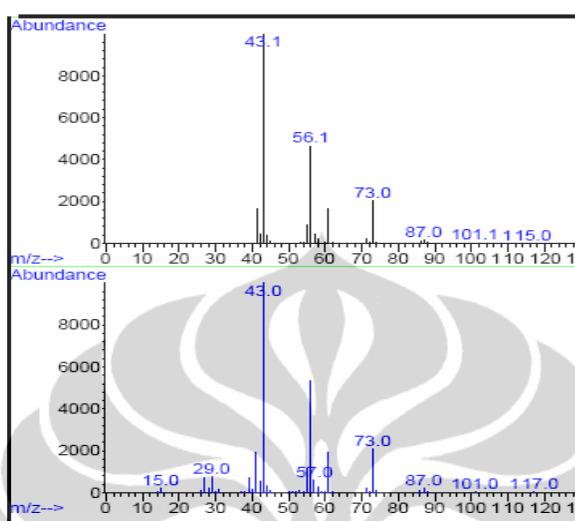
4.6 Hasil Analisis Senyawa Fraksi A dengan GC-MS

Analisis dengan GC-MS dibedakan dua bagian, yaitu bagian pertama pengukuran dengan GC untuk memisahkan komponen-komponen kimia dalam sampel, sedangkan bagian kedua pengukuran dengan kromatografi massa untuk menentukan bobot molekul atau massa relatif berdasarkan pola fragmentasinya. Hasil analisis fraksi A dengan kromatografi gas dapat diperoleh kromatogram seperti dalam Gambar 4.4, yang terdiri dari beberapa komponen dengan waktu retensi yang berbeda-beda.



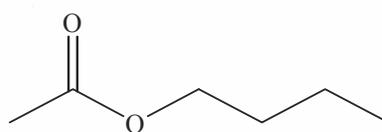
Gambar 4.4 Kromatogram GC fraksi A

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa kromatogram fraksi A yang diperoleh terdapat banyak puncak, maka dilakukan pemilihan puncak kromatogram sebagai penyusun utama fraksi A yang memungkinkan mempunyai aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Puncak kromatogram yang dipilih adalah puncak dengan waktu retensi 7,282 menit; 9,487 menit; 11,086 menit; 11,160 menit ; dan 13,485 menit. Spektre massa dapat dilihat pada Gambar 4.5; Gambar 4.6; Gambar 4.7; Gambar 4.8; dan Gambar 4.9.



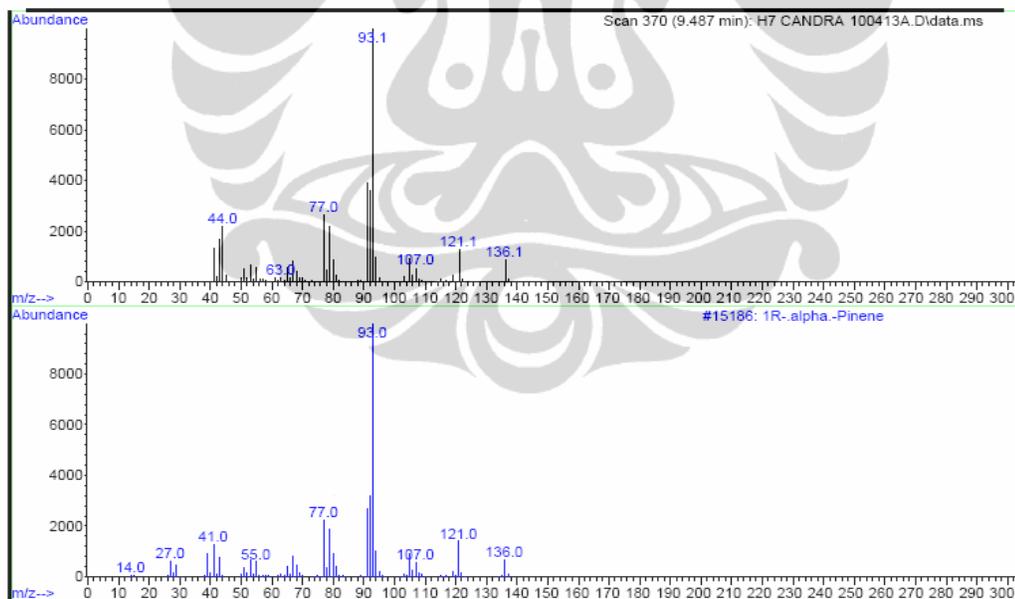
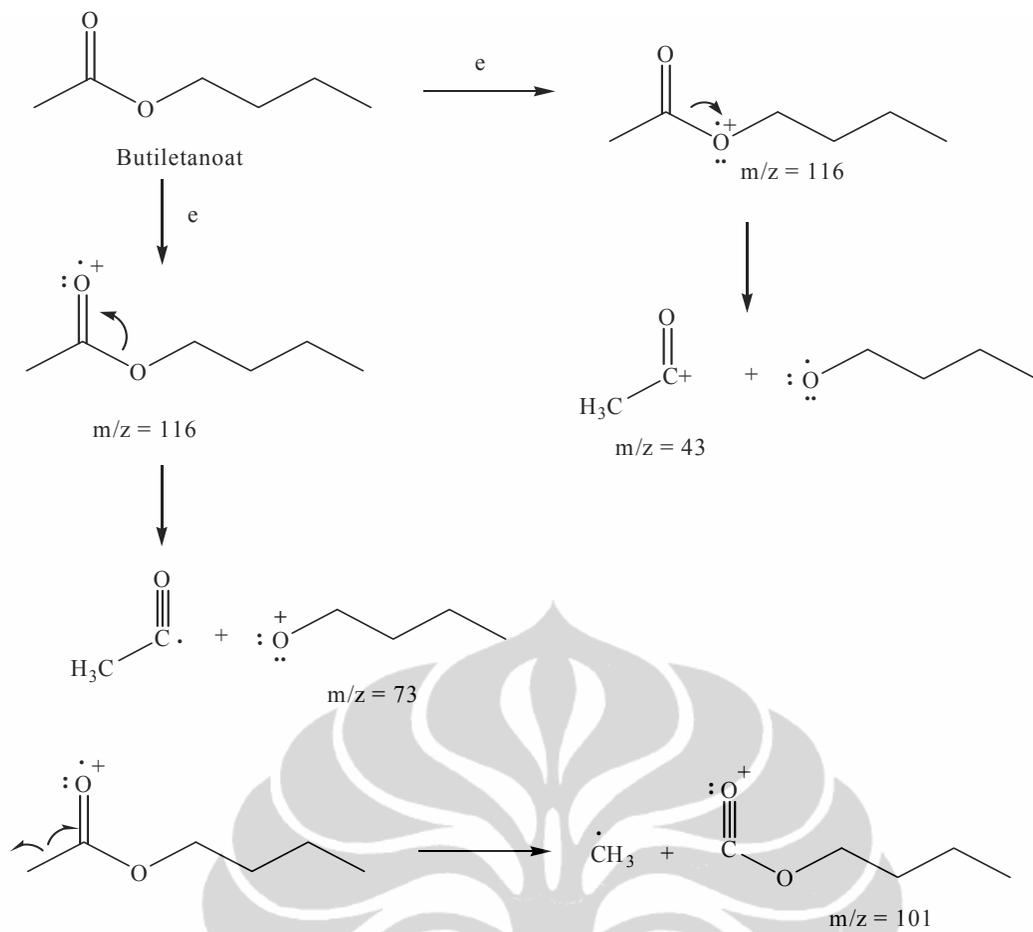
Gambar 4.5 Spektre massa fraksi A dari puncak dengan Rt 7,282 menit

Gambar 4.5 menunjukkan puncak induk (*parent peak*) pada $m/z = 116$. Puncak dasar (*base peak*) dengan $m/z = 43$ terbentuk apabila *parent ion* mengalami fragmentasi membentuk ion etilketon, sedangkan ion dengan $m/z = 73$ merupakan ion butoksida yang terbentuk fragmentasi dari *parent ion*. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 116 adalah $C_6H_{12}O$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (96%), senyawa tersebut adalah butil etanoat.



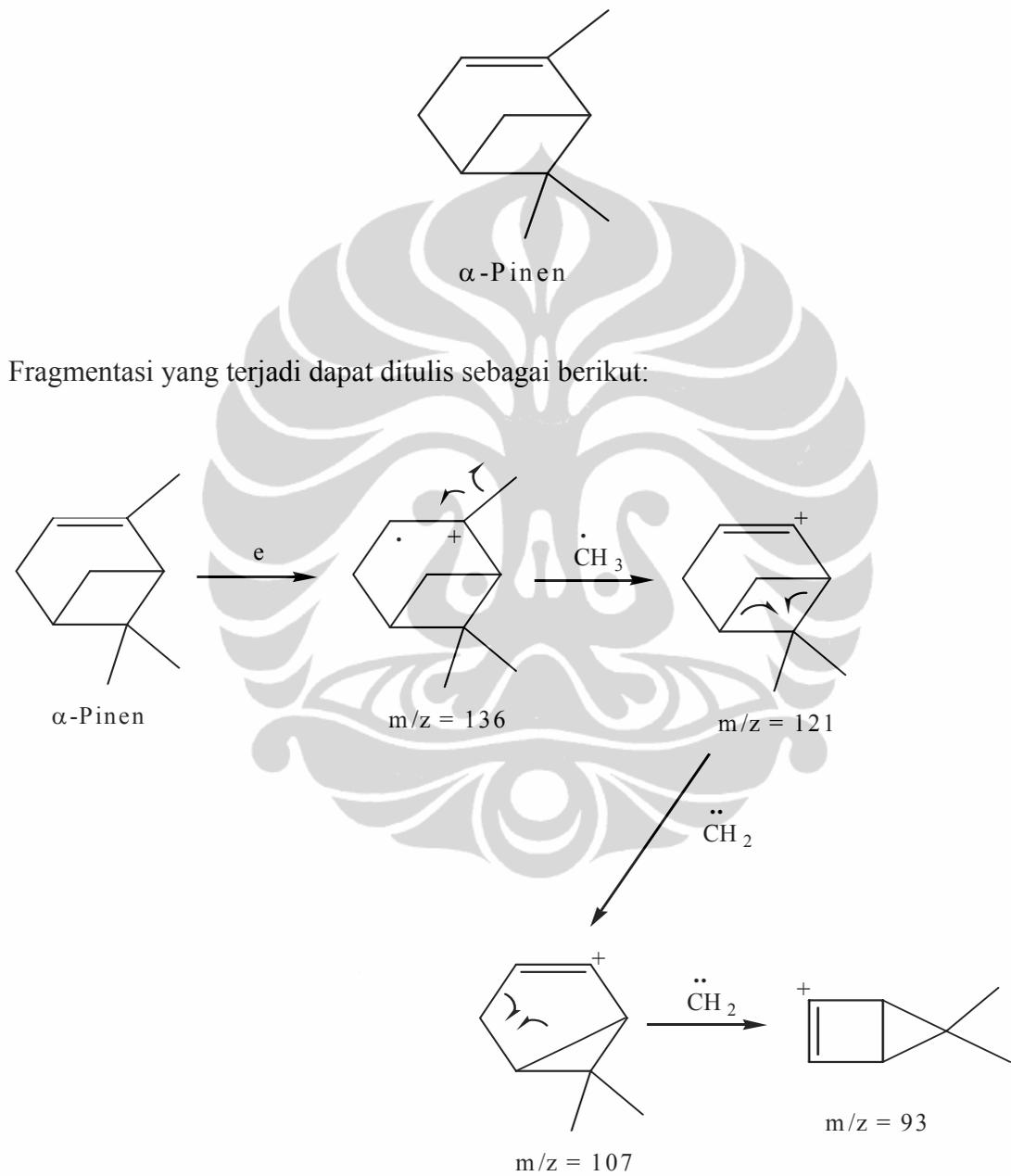
Butiletanoat

Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:

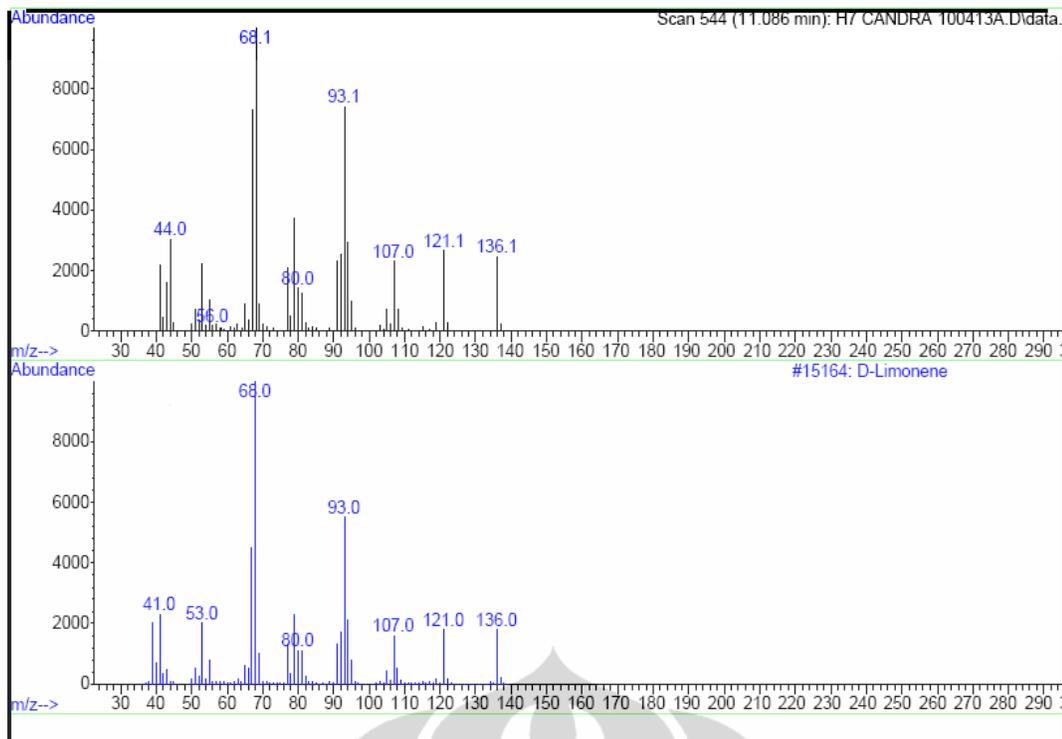


Gambar 4.6 Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 9,487 menit

Gambar 4.6 menunjukkan bahwa puncak induk (*parent peak*) pada $m/z = 136$. Ion dengan $m/z = 121$ terbentuk apabila *parent ion* mengalami fragmentasi lebih lanjut dengan melepaskan $\cdot\text{CH}_3$, sedangkan puncak dasar (*base peak*) pada $m/z = 93$ merupakan hasil fragmentasi lanjutan dari ion dengan $m/z = 121$ yang melepaskan dua gugus :CH_2 . Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 136 adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (96%), senyawa tersebut adalah α -pinen.

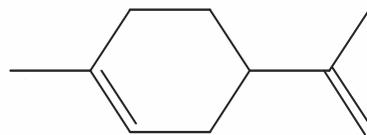


Universitas Indonesia



Gambar 4.7 Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,086 menit

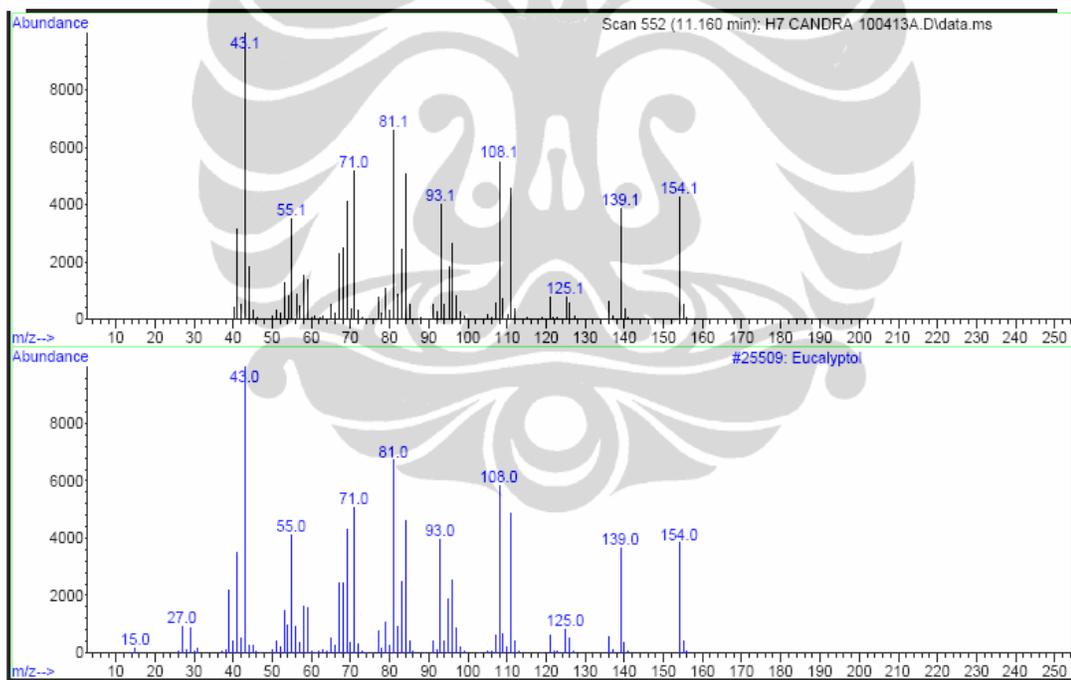
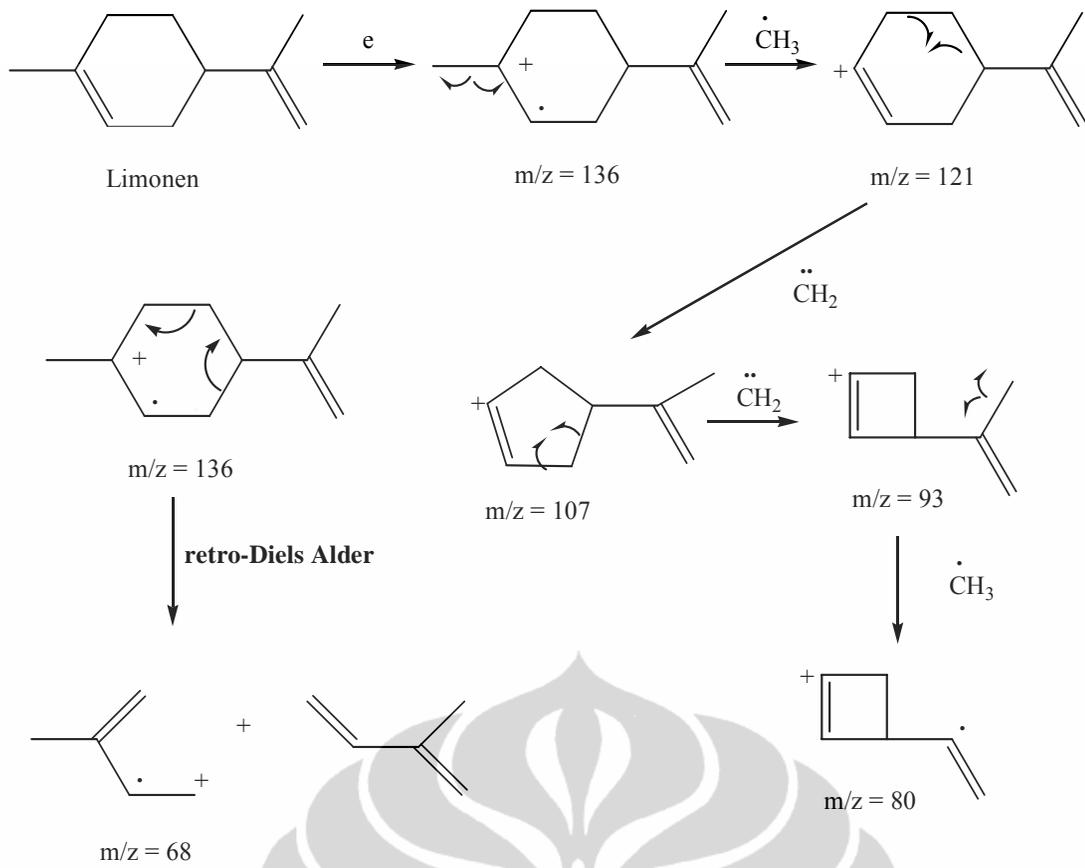
Gambar 4.7 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 136$. Ion dengan $m/z = 121$ terbentuk apabila *parent ion* mengalami fragmentasi lebih lanjut dengan melepaskan $\cdot\text{CH}_3$, sedangkan ion dengan intensitas tertinggi pada $m/z = 68$ merupakan *base peak* yang dihasilkan secara retro-Diels Alder dari *parent ion*. Ion dengan $m/z = 93$ merupakan hasil fragmentasi lanjutan dari ion dengan $m/z = 121$ yang melepaskan dua gugus $\cdot\text{CH}_2$. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 136 adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$. Dari data base yang ada (*library search report* NIST05) tingkat kemiripan yang tinggi (97%), senyawa tersebut adalah limonen.



Limonen

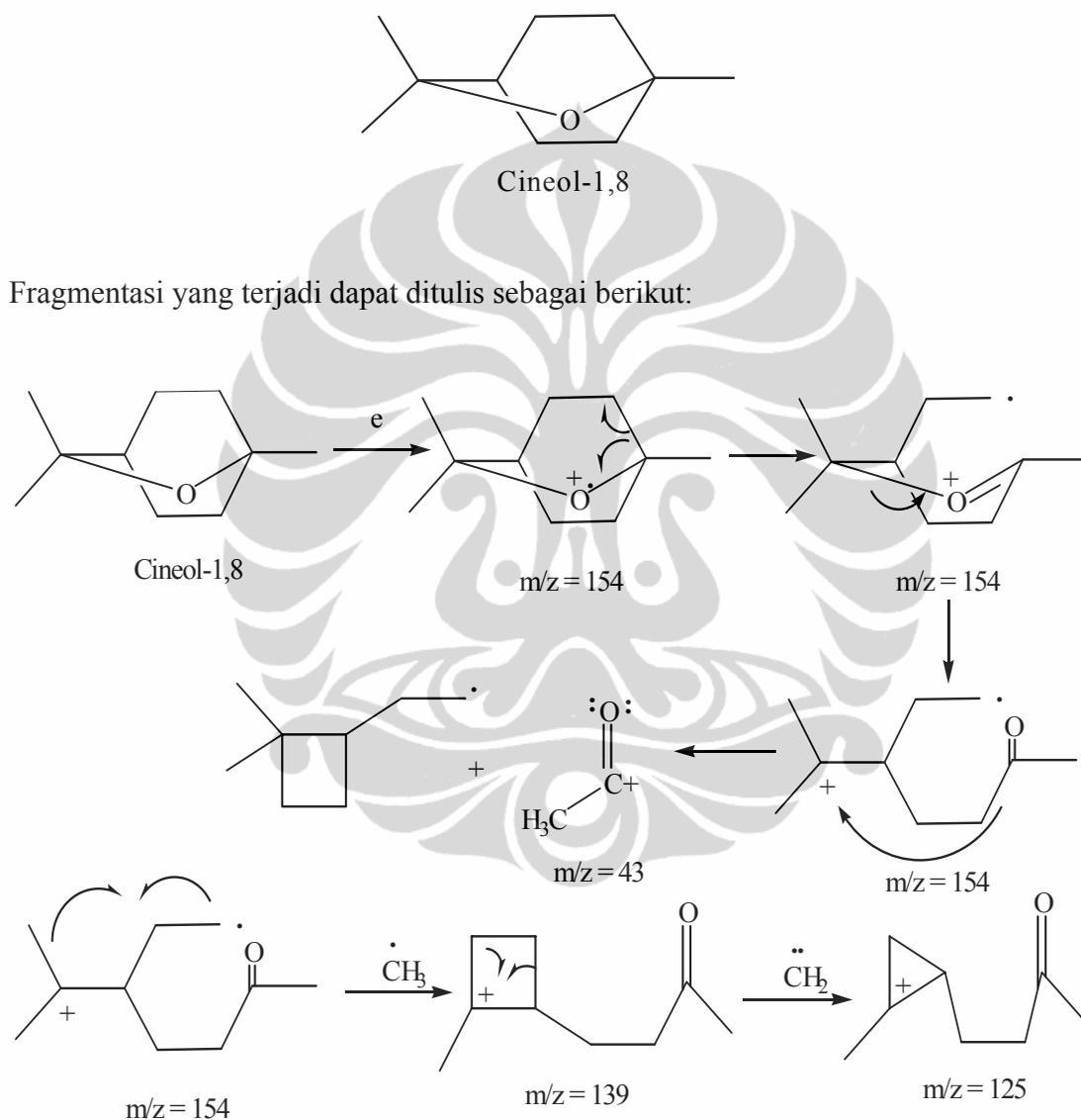
Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:

Universitas Indonesia

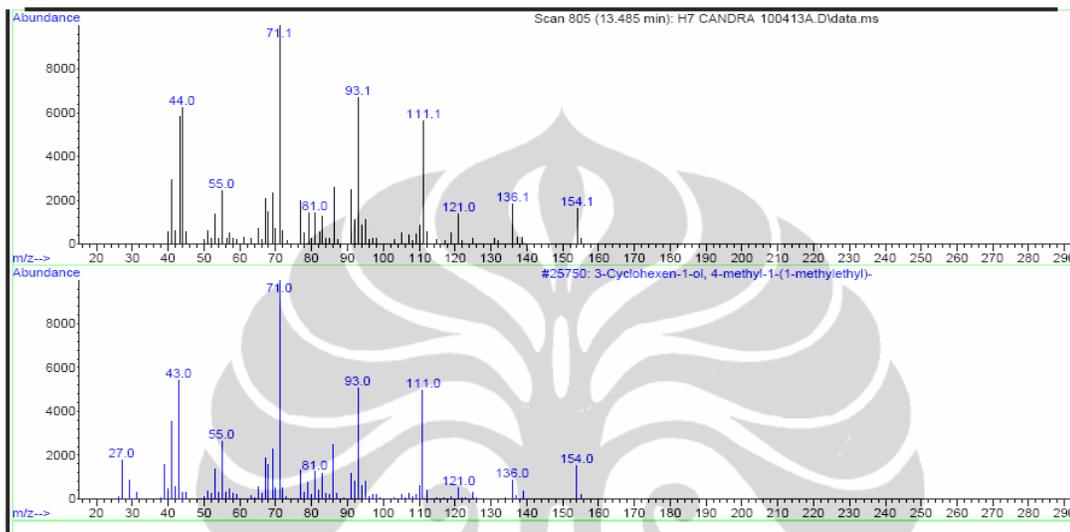
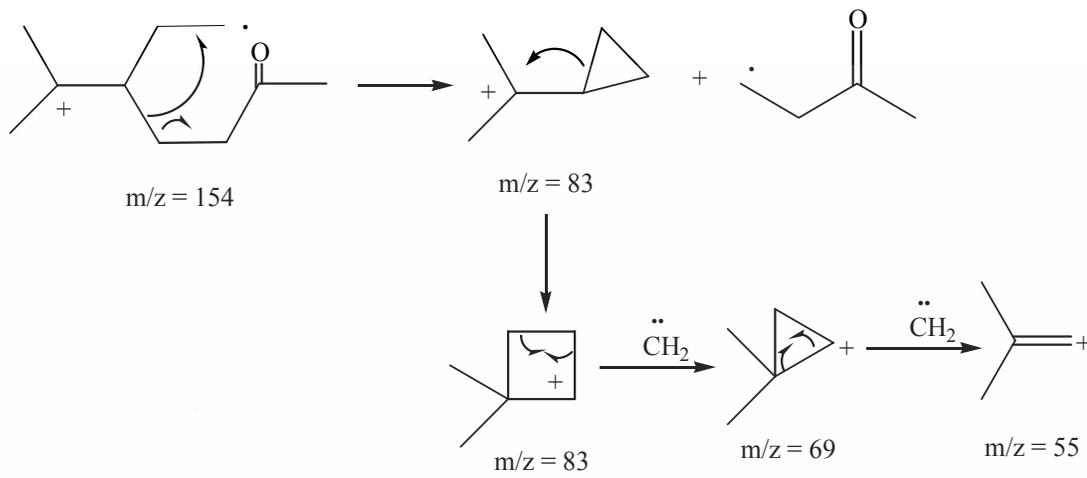


Gambar 4.8 Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,106 menit

Gambar 4.8 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 154$. Ion dengan $m/z = 139$ terbentuk apabila *parent ion* mengalami fragmentasi lebih lanjut dengan melepaskan $\cdot\text{CH}_3$, sedangkan puncak dasar (*base peak*) pada $m/z = 43$ adalah ion metil keton yang dihasilkan dari fragmentasi *parent ion*. Ion dengan $m/z = 125$ merupakan hasil fragmentasi lanjutan dari ion dengan $m/z = 139$ yang melepaskan gugus $\cdot\text{CH}_2$. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 154 adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$. Dari data base yang ada (*library search report* NIST05) tingkat kemiripan yang tinggi (99%), senyawa tersebut adalah cineol-1,8.

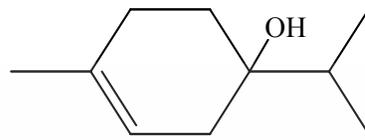


Universitas Indonesia



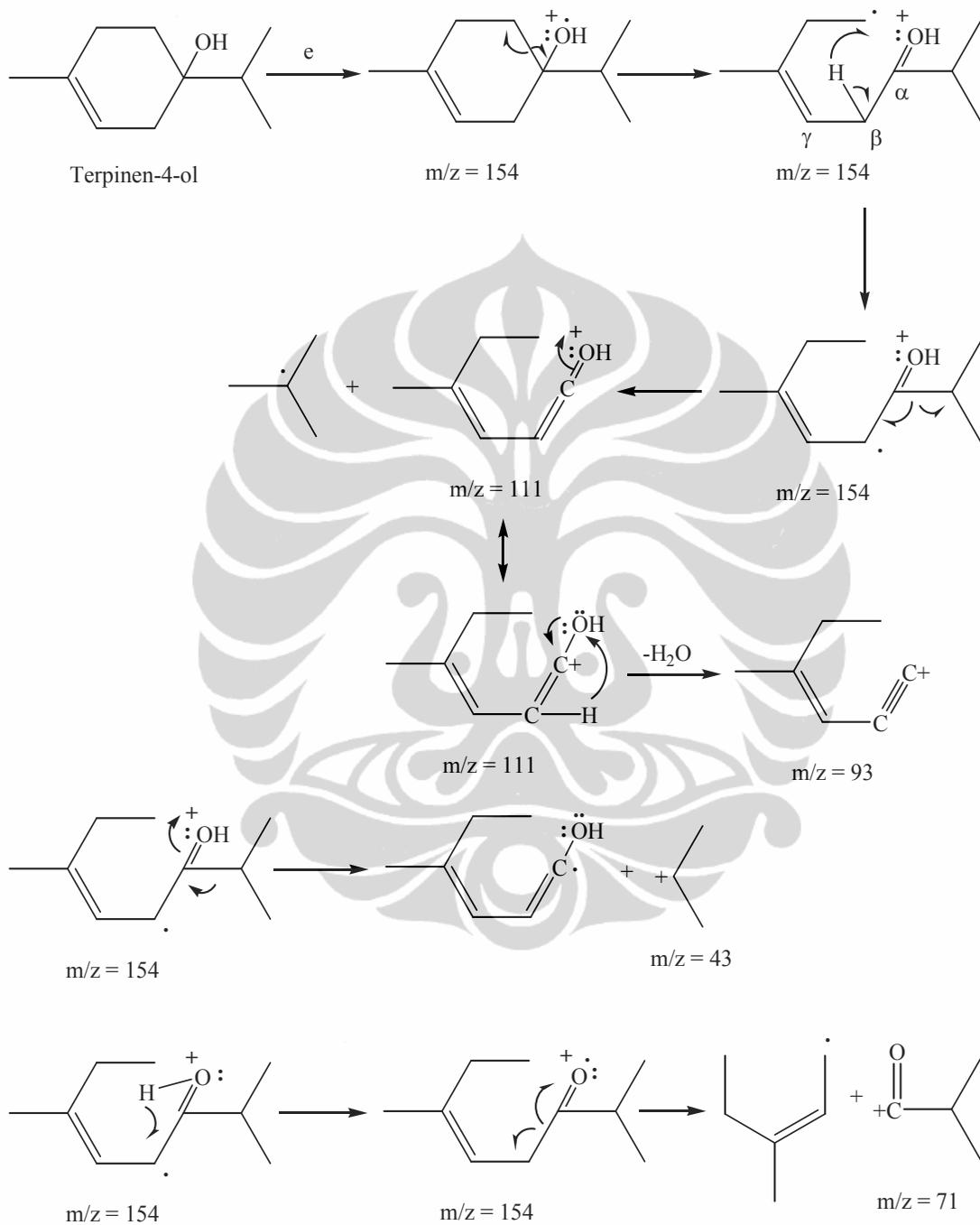
Gambar 4.9 Spektra massa fraksi A dari puncak dengan Rt 11,485 menit

Gambar 4.9 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 154$. Ion dengan $m/z = 136$ terbentuk apabila *parent ion* mengalami fragmentasi lebih lanjut dengan melepaskan H_2O , sedangkan puncak dasar (*base peak*) pada $m/z = 71$ adalah ion isopropilketon yang dihasil dari fragmentasi *parent ion*. Ion dengan $m/z = 111$ merupakan hasil fragmentasi lebih lanjut *parent ion* dengan melepaskan radikal isopropil. Ion dengan $m/z = 93$ dihasilkan dari fragmentasi lebih lanjut dari ion dengan $m/z = 111$ dengan melepaskan H_2O . Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 154 adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (96%), senyawa tersebut adalah terpinen-4-ol.

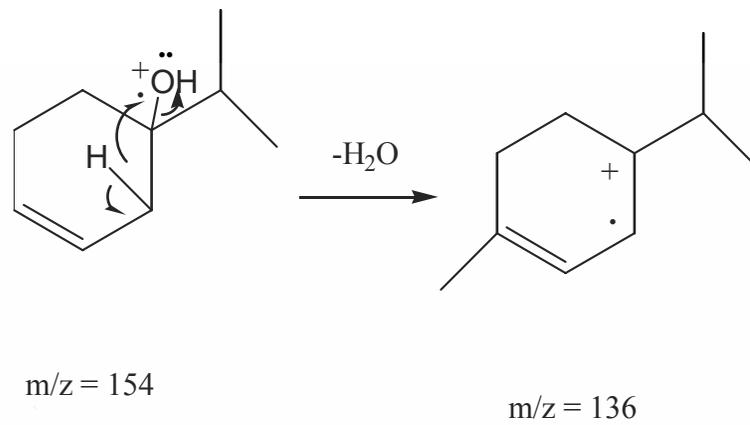


Terpinen-4-ol

Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:

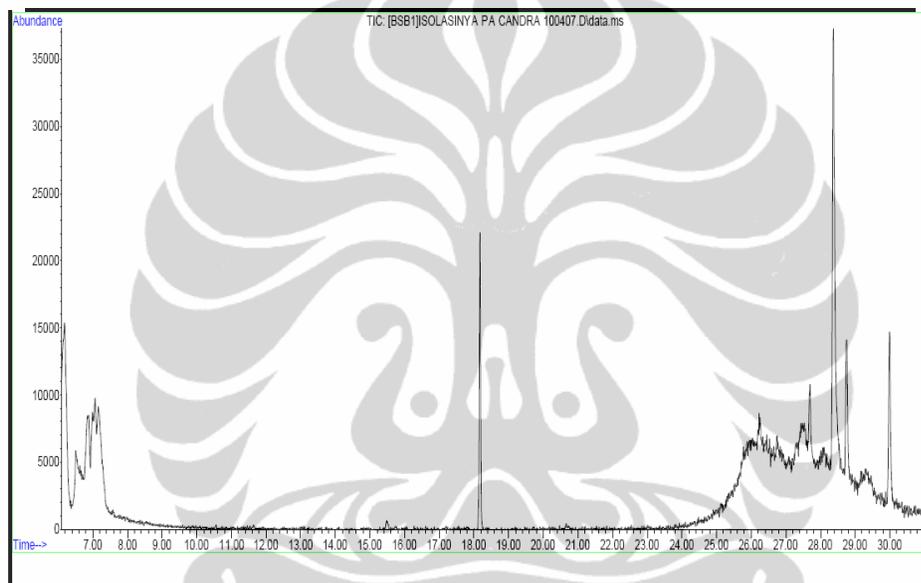


Universitas Indonesia



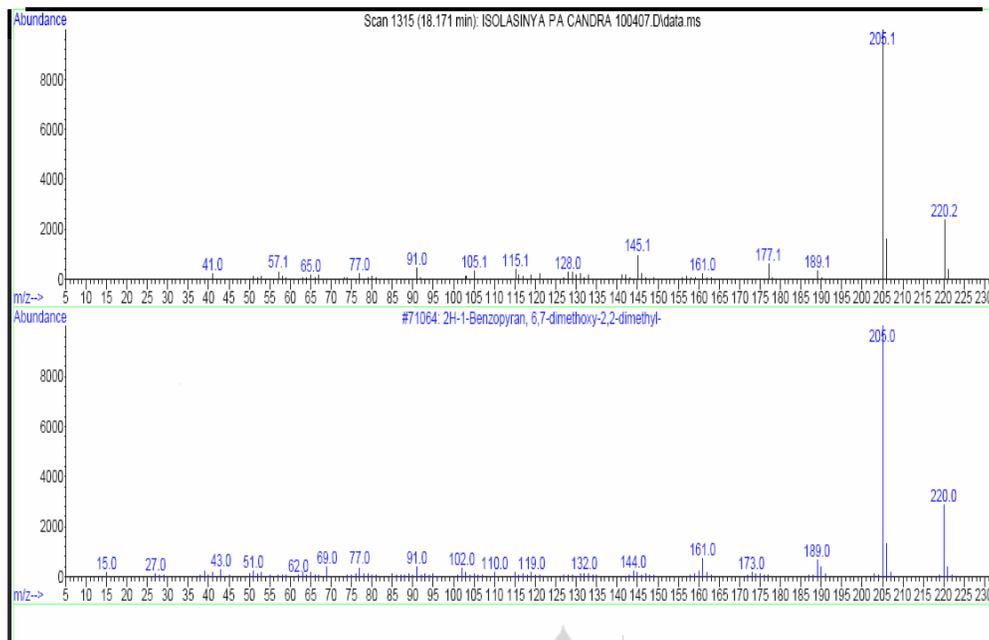
4.7 Hasil Analisis Senyawa Fraksi B dengan GC-MS

Hasil analisis fraksi B dengan kromatografi gas diperoleh kromatogram seperti dalam Gambar 4.10, yang terdiri dari beberapa komponen dengan waktu retensi yang berbeda-beda.



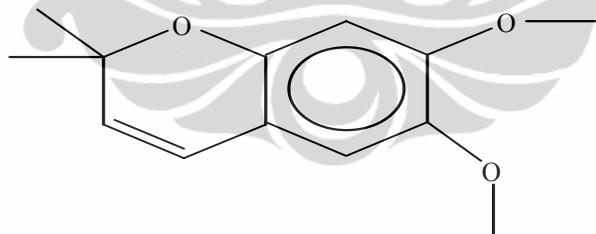
Gambar 4.10 Kromatogram GC fraksi B

Gambar 4.10 menunjukkan bahwa kromatogram fraksi B yang diperoleh terdapat banyak puncak, maka dilakukan pemilihan puncak kromatogram sebagai penyusun utama fraksi B yang memungkinkan mempunyai aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Puncak kromatogram yang dipilih adalah puncak dengan waktu retensi 18,171 menit. Spektra massa dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Spektra massa fraksi B dari puncak dengan Rt 18,171 menit

Gambar 4.11 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 220$. Puncak dasar (*base peak*) pada $m/z = 205$ dihasil dari fragmentasi *parent ion* dengan melepaskan radikal metil. Ion dengan $m/z = 189$ dihasilkan dari fragmentasi *parent ion* dengan melepaskan metoksi. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 220 adalah $C_{13}H_{16}O_3$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (91%), senyawa tersebut adalah 6,7-dimetoksi-2,2-dimetil-1-benzopiran.

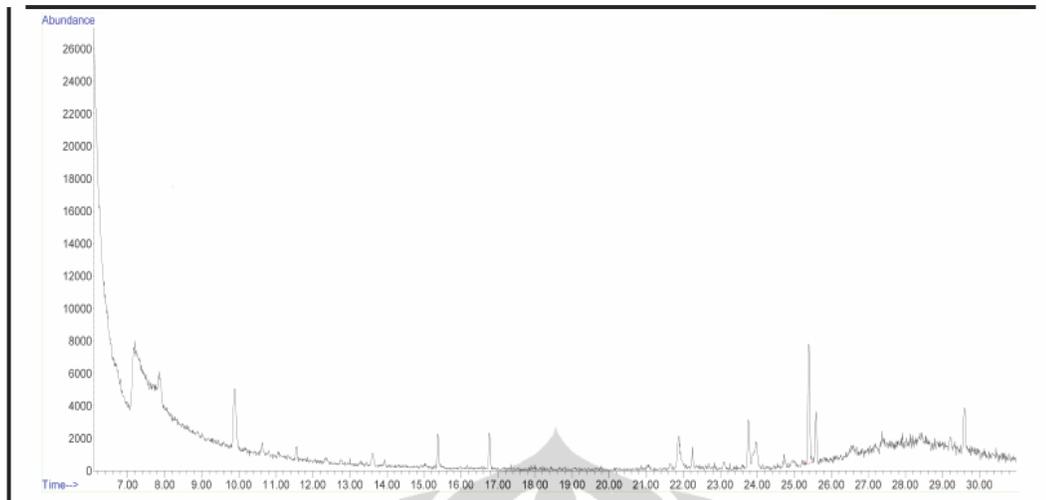


6,7-dim etoksi-2,2-dim etil-1-benzopiran

Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:

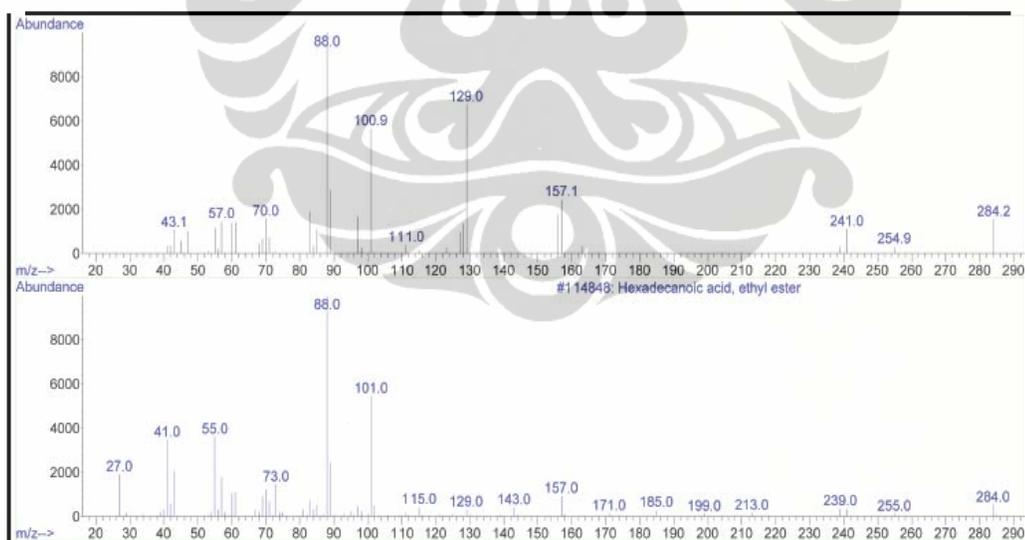
4.8 Hasil Analisis Senyawa Fraksi C dengan GC-MS

Hasil analisis fraksi C dengan kromatografi gas dapat diperoleh kromatogram seperti dalam Gambar 4.12, yang terdiri dari beberapa komponen dengan waktu retensi yang berbeda-beda.



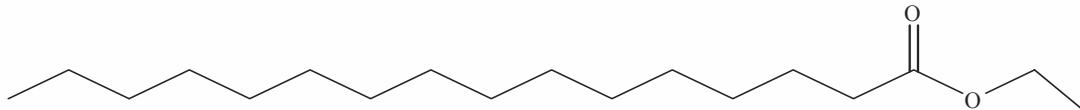
Gambar 4.12 Kromatogram GC fraksi C

Gambar 4.4 menunjukkan bahwa kromatogram fraksi A yang diperoleh terdapat banyak puncak, maka dilakukan pemilihan puncak kromatogram sebagai penyusun utama fraksi C yang memungkinkan mempunyai aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Puncak kromatogram yang dipilih adalah puncak dengan waktu retensi 23,759 menit dan 25,385 menit. Spektra massa dapat dilihat pada Gambar 4.13, dan Gambar 4.14.



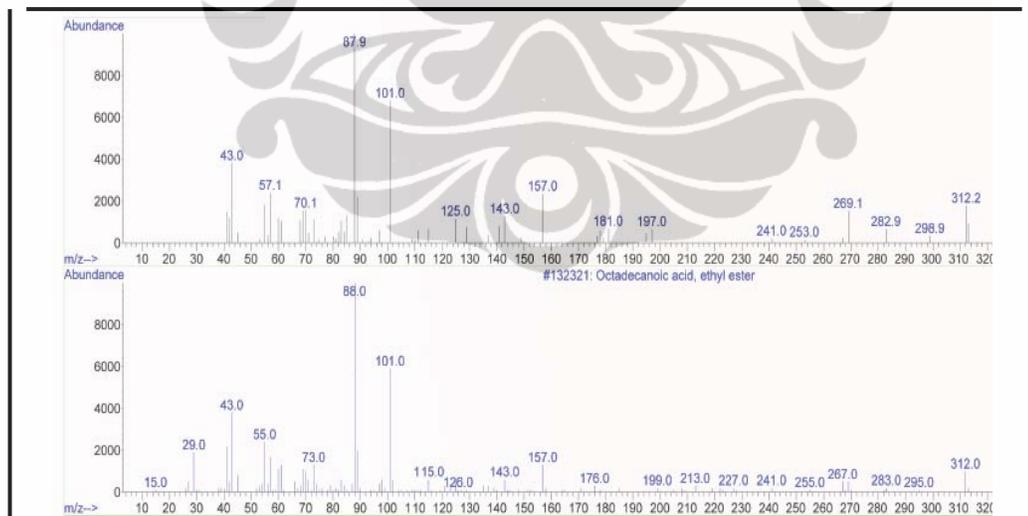
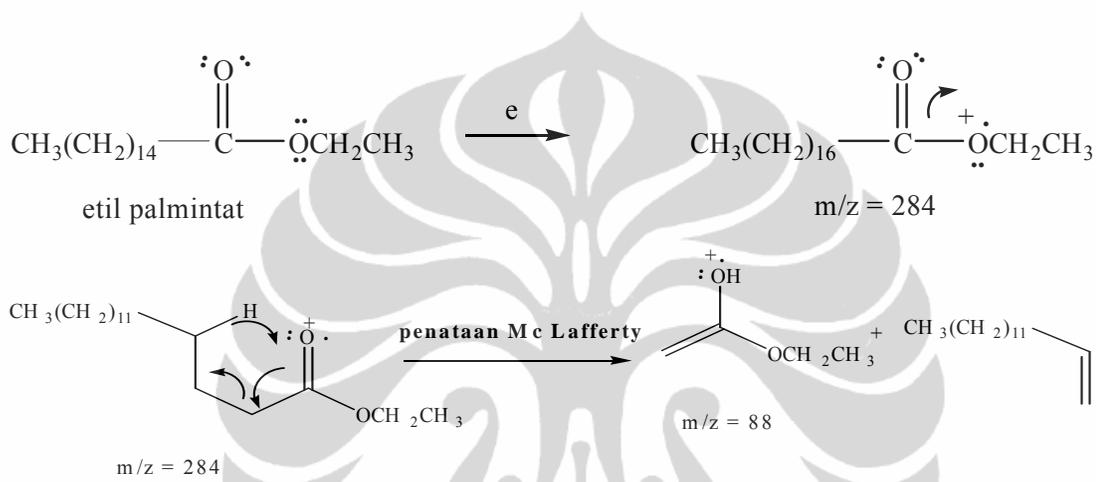
Gambar 4.13 Spektra massa fraksi C dari puncak dengan Rt 23,759 menit

Gambar 4.13 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 284$. Ion dengan intensitas tertinggi pada $m/z = 88$ merupakan *base peak* yang dihasilkan dari penyusunan ulang *Mc Lafferty parent ion*. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 284 adalah $C_{18}H_{36}O_2$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (90 %), senyawa tersebut adalah etil palmintat.



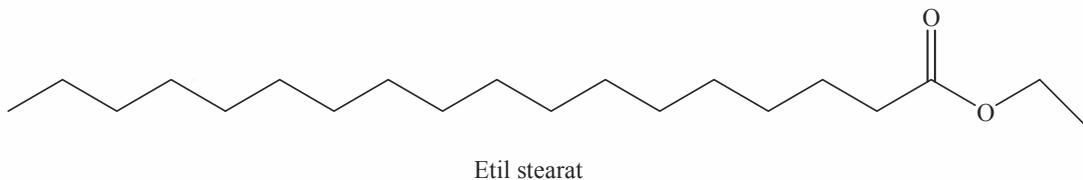
Etil palmintat

Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:

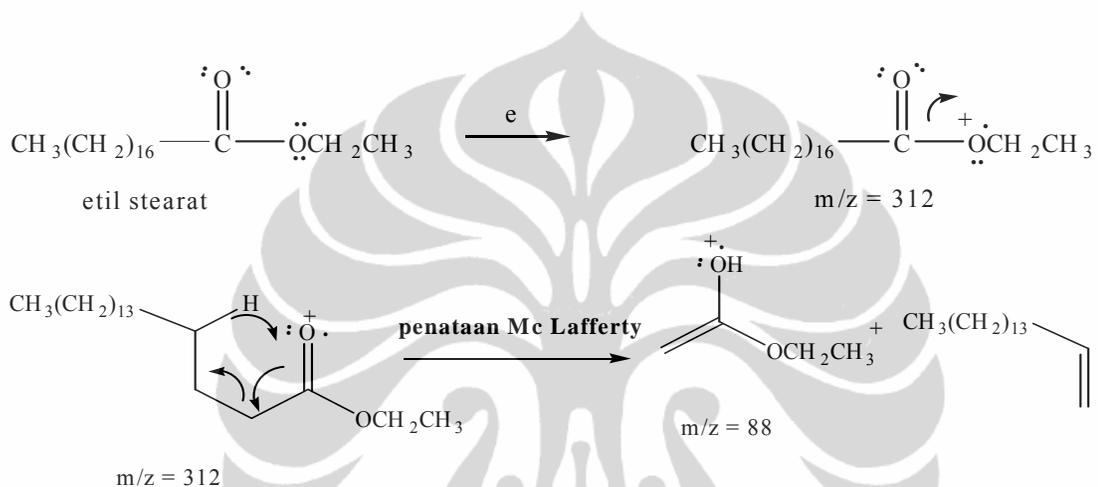


Gambar 4.14 Spektra massa fraksi C dari puncak dengan Rt 25, 385 menit

Gambar 4.14 menunjukkan bahwa *parent peak* pada $m/z = 312$. Ion dengan intensitas tertinggi pada $m/z = 88$ merupakan *base peak* yang dihasilkan dari penyusunan ulang Mc Lafferty *parent ion*. Berdasarkan fragmentasi tersebut, maka kemungkinan rumus molekul dengan BM (Bobot Molekul) = 312 adalah $C_{20}H_{40}O_2$. Dari data base yang ada (*library search report NIST05*) tingkat kemiripan yang tinggi (93 %), senyawa tersebut adalah etil stearat.



Fragmentasi yang terjadi dapat ditulis sebagai berikut:



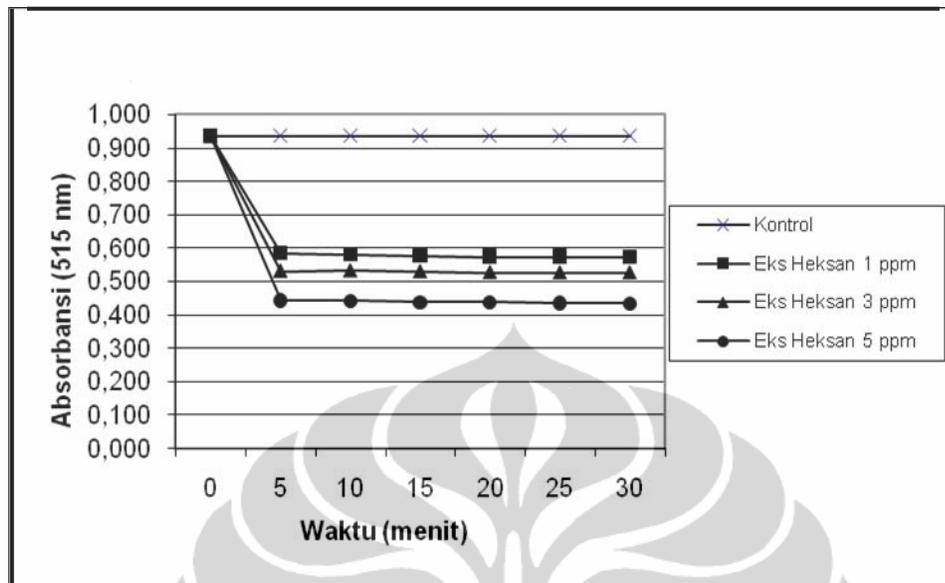
Kedua struktur yang diduga bukan merupakan komponen utama yang terkandung dalam ekstrak metanol daun sirih merah sebab seharusnya senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol merupakan senyawa yang bersifat polar. Teridentifikasinya kedua senyawa tersebut dimungkinkan karena terperangkapnya senyawa ini dalam campuran senyawa dan teknik pemisahan yang dilakukan belum mampu untuk memisahkannya.

4.9 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan

4.9.1 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak *n*-Heksana

Data hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak *n*-heksana dan kontrol pada panjang gelombang, $\lambda = 515$ nm dapat dilihat pada Lampiran 5. Untuk mengetahui

besarnya konsentrasi sampel yang dapat bersifat *radical scavenger*, maka dilakukan variasi konsentrasi sampel yaitu ; 1 mg/L (ppm), 3 ppm, dan 5 ppm yang dibandingkan terhadap kontrol (DPPH tanpa penambahan sampel). Dari hasil analisis aktivitas antioksidan ekstrak *n*-heksana dapat dinyatakan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi sampel akan menurunkan nilai absorbansi, seperti dapat dilihat dalam Gambar 4.15.



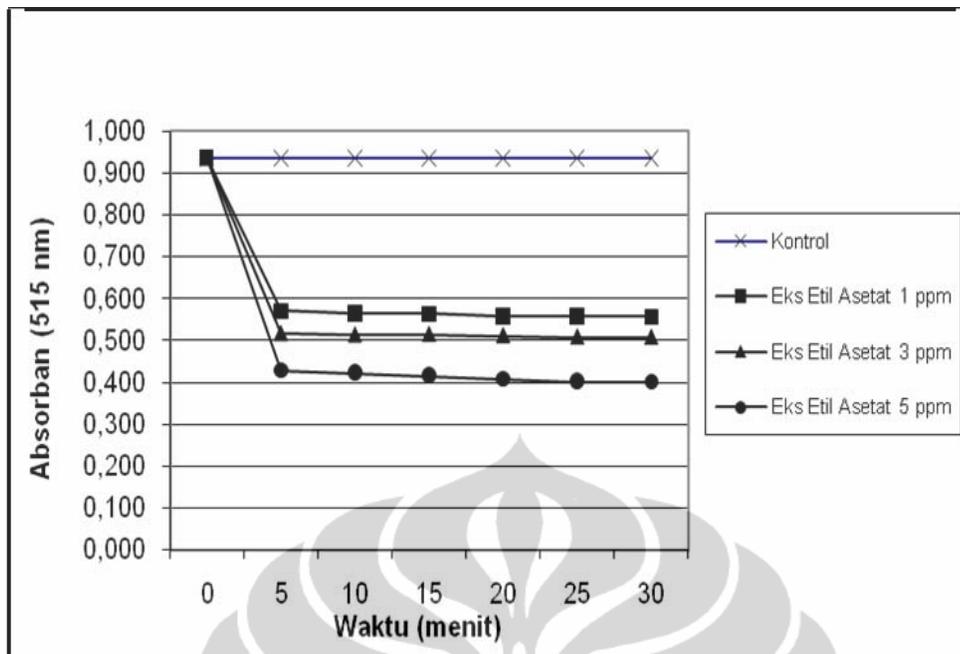
Gambar 4.15 Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak *n*-heksana dengan metode DPPH

Gambar 4.15 menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi sampel sampai 5 ppm dalam waktu lima menit telah mempunyai sifat *radical scavenger* terhadap DPPH dan dengan meningkatnya konsentrasi sampel juga menyebabkan sifat *radical scavenger* yang semakin baik dengan penurunan yang tajam. Penurunan nilai absorbansi karena penangkapan radikal pada DPPH oleh sampel uji yang menyebabkan jumlah ikatan rangkap diazo pada DPPH berkurang sehingga terjadi pemucatan warna DPPH yang berakibat nilai absorbansi menurun. Hal ini berarti bahwa ekstrak kasar *n*-heksana daun sirih merah mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.

4.9.2 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Etil Asetat

Data hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak etil asetat dan kontrol pada panjang gelombang 515 nm dapat dilihat pada Lampiran 6. Pengukuran aktivitas

antioksidan dari ekstrak etil asetat yang dilakukan pada konsentrasi 1 ppm, 3 ppm, dan 5 ppm yang dibandingkan terhadap kontrol (DPPH tanpa penambahan sampel) dapat dilihat pada Gambar 4.16.

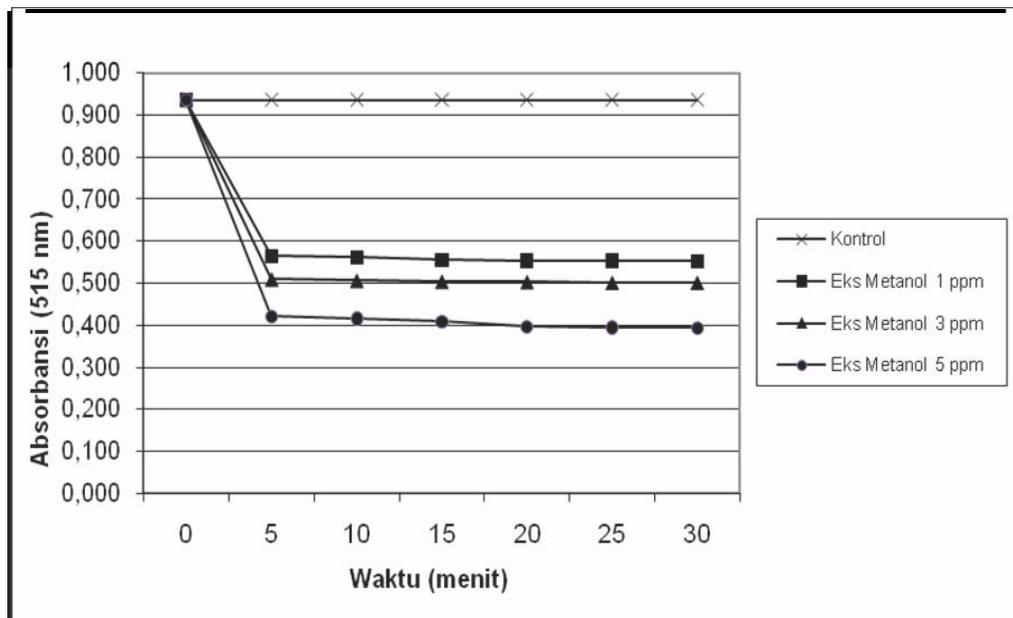


Gambar 4.16 Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak etil asetat dengan metode DPPH

Gambar 4.16 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1 ppm ekstrak etil asetat dalam waktu lima menit telah mempunyai sifat *radical scavenger* terhadap DPPH dan dengan meningkatnya konsentrasi sampel juga menyebabkan sifat *radical scavenger* yang semakin baik dengan penurunan yang tajam. Hal ini berarti bahwa ekstrak kasar etil asetat dari daun sirih merah mempunyai aktivitas antioksidan yang bertindak sebagai *radical scavenger*.

4.9.3 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Sampel Ekstrak Metanol

Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak metanol dilakukan dengan cara yang sama dengan sampel ekstrak *n*-heksana dan ekstrak etil asetat. Data hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak metanol dan kontrol pada panjang gelombang 515 nm dapat dilihat pada Lampiran 7. Pengukuran aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol dapat dilihat dalam Gambar 4. 17.

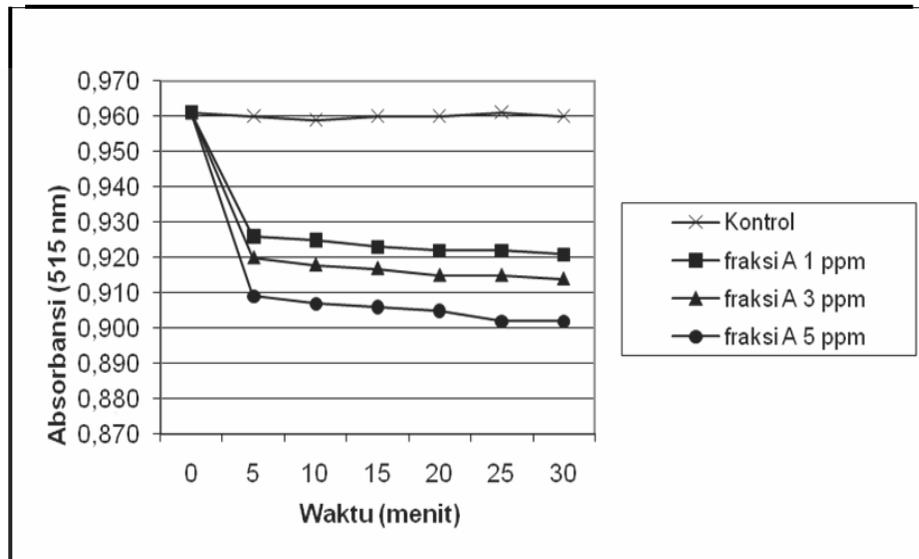


Gambar 4.17 Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak metanol dengan metode DPPH

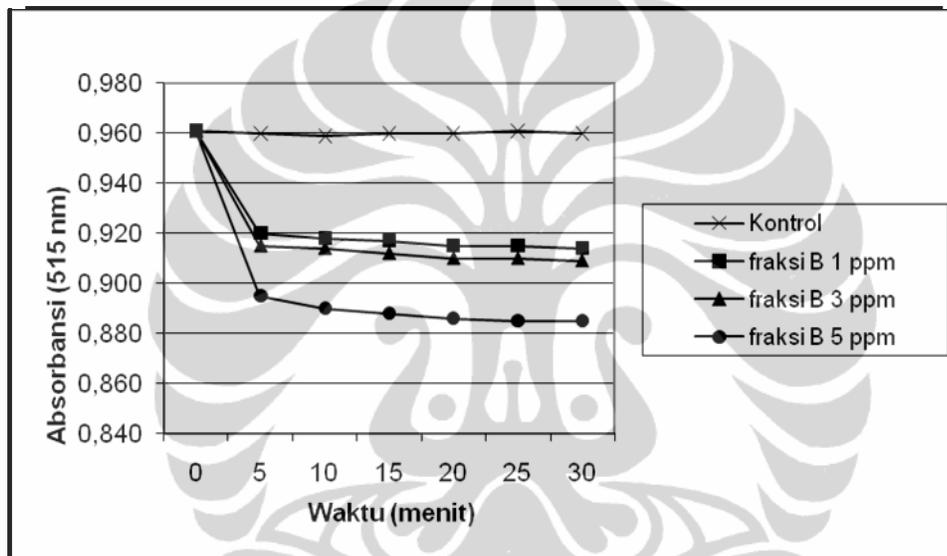
Gambar 4.17 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1 ppm ekstrak metanol dalam waktu lima menit telah mempunyai sifat *radical scavenger* terhadap DPPH dan dengan meningkatnya konsentrasi sampel menyebabkan sifat *radical scavenger* yang semakin baik. Hal ini berarti bahwa ekstrak kasar metanol dari daun sirih merah mempunyai aktivitas antioksidan yang bertindak sebagai *radical scavenger*. Bila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan dari ekstrak *n*-heksana (Gambar 4.15) dan ekstrak etil asetat (Gambar 4.16), sifat *radical scavenger* dari ekstrak metanol ini lebih besar, hal ini berarti ekstrak metanol lebih mampu sebagai *radical scavenger*.

4.9.4 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan Fraksi A, B, dan C

Pemurnian terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol menghasilkan tiga fraksi yaitu : fraksi A (hasil pemisahan kolom kromatografi dari ekstrak *n*-heksana), fraksi B (hasil pemisahan kolom kromatografi dari ekstrak etil asetat), dan fraksi C (hasil pemisahan kolom kromatografi dari ekstrak metanol). Sifat *radical scavenger* dari ketiga fraksi tersebut dapat dilihat dalam Gambar 4.18; 4,19; dan 4.20. Data hasil pengukuran absorbansi sampel dan kontrol pada panjang gelombang 515 nm dapat dilihat pada Lampiran 8, Lampiran 9, dan Lampiran 10.

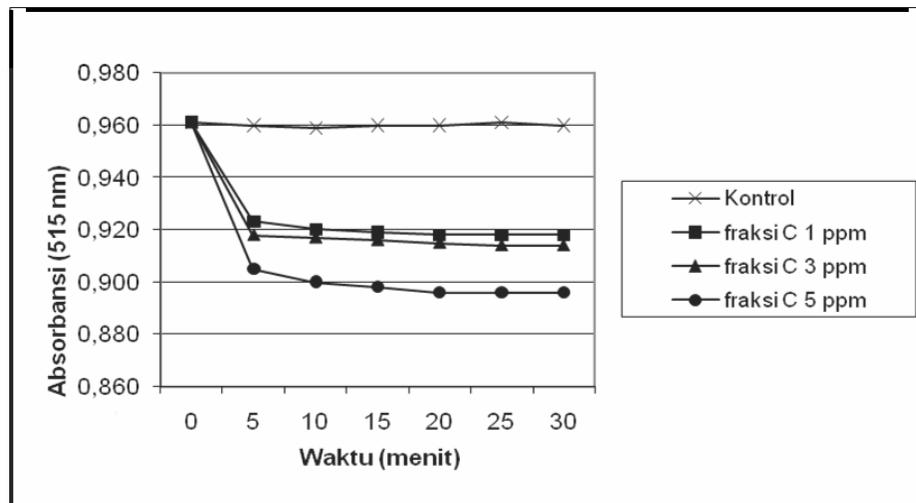


Gambar 4.18 Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi A dengan metode DPPH



Gambar 4.19 Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi B dengan metode DPPH

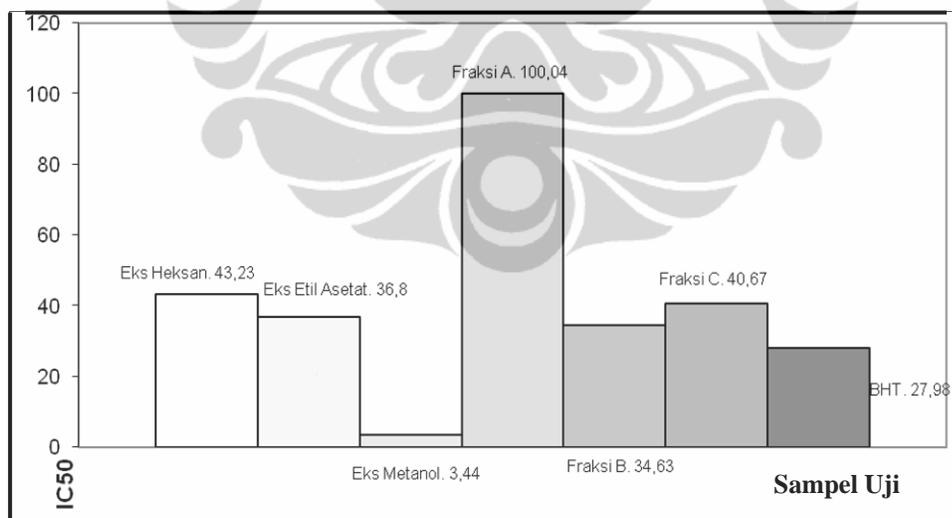
Gambar 4.18, Gambar 4.19, dan Gambar 4.20 menunjukkan bahwa sifat *radical scavenger* yang lebih kecil dari ekstrak kasarnya. Hal ini disebabkan adanya kesinergisan antara senyawa-senyawa penyusun pada ekstrak kasar yang lebih besar dibandingkan pada fraksi hasil pemurnian.



Gambar 4.20 Hasil analisis aktivitas antioksidan fraksi C dengan metode DPPH

4.9.5 Analisis IC_{50} Sampel Ekstrak *n*-Heksana, Etil Asetat, Metanol, Fraksi A, B, dan C dengan Kontrol, dan BHT

IC_{50} (*Inhibitor Concentration*) adalah konsentrasi sampel yang dapat menghambat 50% proses oksidasi (terbentuknya radikal bebas). Nilai IC_{50} suatu sampel semakin kecil artinya semakin baik aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh sampel tersebut. Hasil analisis IC_{50} masing-masing sampel uji yang dibandingkan dengan BHT dapat dilihat dalam Gambar 4.21. Data pengukuran dapat dilihat pada Lampiran 12.



Gambar 4.21 IC_{50} dari sampel uji dan BHT dengan metode DPPH

Gambar 4.21 menunjukkan bahwa nilai IC_{50} pada daun sirih merah yang memiliki aktivitas inhibisi paling tinggi dengan nilai paling kecil diberikan oleh ekstrak kasar metanol dengan nilai IC_{50} sebesar 3,44 ppm, sedangkan aktivitas inhibisi terendah diberikan oleh ekstrak kasar *n*-heksana dengan nilai IC_{50} sebesar 43,23 ppm. Grafik potensi inhibisi tersebut memperlihatkan bahwa senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kasar metanol (polar) dalam daun sirih merah, merupakan senyawa bioaktif dengan aktivitas antioksidan paling potensial, sedangkan pada bagian daun sirih merah metabolit sekunder yang bersifat non-polar (ekstrak kasar *n*-heksana) merupakan senyawa yang kurang potensial sebagai antioksidan.

Aktivitas antioksidan dari ekstrak kasar etil asetat dan metanol dibandingkan dengan fraksi-fraksi hasil pemisahan lanjutan lebih besar daripada fraksi B dan C. Hal ini disebabkan komponen yang terkandung pada ekstrak etil asetat dan metanol tidak terkandung pada fraksi A dan B yang dipilih.

Forster (2001) menyatakan bahwa antioksidan merupakan interseptor radikal dalam sel yang dapat melindungi tubuh manusia dari kerusakan jantung dan kanker, sehingga senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar metanol daun sirih merah (nilai IC_{50} sebesar 3,44 ppm) berpotensi sebagai interseptor radikal dalam sel.

4.10 *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)* dengan Larva *Artemia salina* Leach

Meyer (1982) memanfaatkan *Artemia salina* L. untuk menguji aktivitas biologis secara umum. Kemampuan untuk mematikan larva udang ini dapat digunakan sebagai uji pendahuluan yang cepat dan sederhana dalam mengetahui bioaktivitas suatu senyawa secara *in vivo*. Institut Kanker di Amerika Serikat yang pertama kali memanfaatkan metode ini sebagai uji pendahuluan aktivitas antikanker (Kristanti, A.N. dkk, 2008).

Uji BSLT dengan larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan terhadap ekstrak kasar *n*-heksana, etil asetat, dan metanol daun sirih merah. Larva udang yang digunakan sebanyak 10 ekor pada setiap ekstrak uji dan percobaan dilakukan secara triplo pada konsentrasi 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Tingkat kematian larva udang terhadap konsentrasi sampel dapat dilihat pada Tabel 4.5, sedangkan data lengkap hasil pengujian tersaji pada Lampiran 13.

Tabel 4.5 Rata-rata hasil uji BSLT ekstrak heksana, etil esetat, dan metanol daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume)

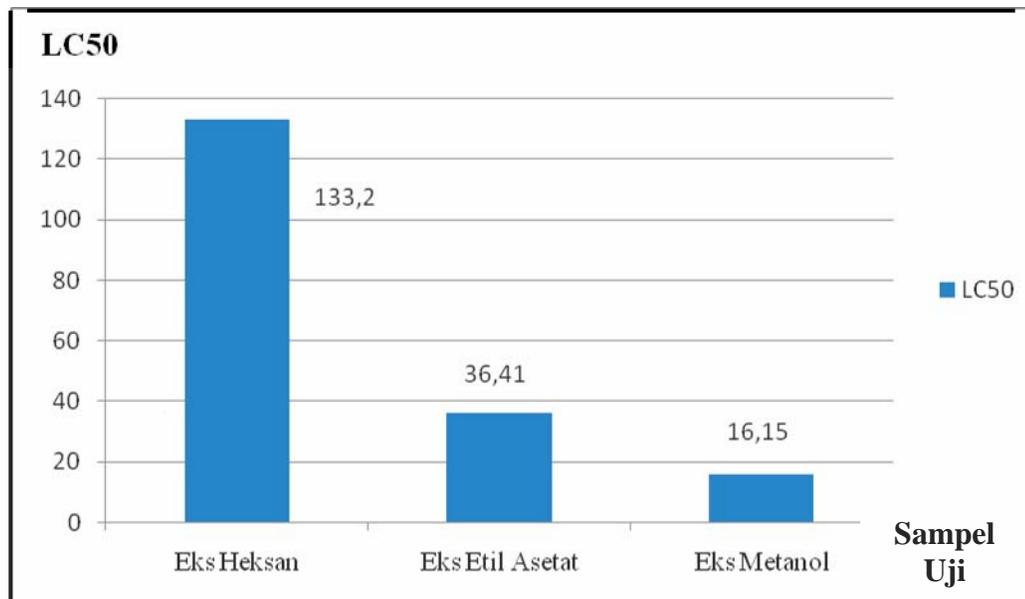
Sampel	Kosentrasi Ekstrak (ppm)	Jumlah Larva Mati	Jumlah Larva Hidup	% Kematian
Ekstrak Heksana	10	0	30	0
	100	9	21	30,00
	1000	30	0	100,00
Ekstrak Etil Asetat	10	8	22	26,67
	100	11	19	36,67
	1000	30	0	100,00
Ekstrak Metanol	10	15	15	50,00
	100	23	7	76,67
	1000	30	0	100,00
Blanko Air Laut		0	30	0

Tabel 4.5 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1000 ppm untuk ketiga ekstrak menyebabkan semua larva udang mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 100 ppm dan 10 ppm tingkat kematian larva udang tertinggi terjadi pada ekstrak metanol (76,67%). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga ekstrak kasar daun sirih merah bersifat toksik.

4.10.1 Analisis LC_{50} Sampel Ekstrak *n*-Heksana, Etil Asetat, dan Metanol

LC_{50} (*Lethal Concentration*) adalah konsentrasi sampel yang dapat membunuh 50% hewan percobaan. Nilai LC_{50} suatu sampel semakin kecil artinya semakin baik aktivitas toksik yang dimiliki oleh sampel tersebut. Untuk mengetahui besarnya nilai LC_{50} dari ketiga ekstrak kasar daun sirih merah tersebut, maka dilakukan analisis probit. Data perhitungan disajikan pada Lampiran 15, sedangkan Nilai LC_{50} dari ketiga ekstrak daun sirih merah tersaji pada Gambar 4.22.

Gambar 4.22 menunjukkan bahwa tingkat toksisitas tertinggi dari ekstrak kasar tanaman ditunjukkan oleh ekstrak kasar metanol dengan nilai LC_{50} 16,15 ppm, sedang terendah oleh ekstrak kasar heksana dengan nilai LC_{50} 133,20 ppm. Sebagian besar tanaman yang memiliki sifat toksisitas tertentu (LC_{50} pada rentang 0,16-11,83 mg/L) pada umumnya menunjukkan potensi sebagai antimikroba dan antikanker (Lisdawati, V. 2002).



Gambar 4.22 LC₅₀ dari sampel uji dengan metode BSLT

Toksisitas metabolit sekunder tanaman berkaitan dengan kemampuan pertahanan diri tanaman terhadap predator. Mekanisme pertahanan diri tersebut kemungkinan dengan cara melindungi organ target maupun dengan menghambat pembelahan sel yang terkena kuman patogen. Semakin rendah nilai senyawa bioaktif (metabolit sekunder), maka semakin potensial senyawa kimia tersebut untuk digunakan dalam pengobatan karena memiliki mekanisme pertahanan diri atau kemampuan melindungi yang juga tinggi (Culter and Culter, 2000).

BAB 5 SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Penapisan fitokimia dengan menggunakan metode *Ciulei* terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dari daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume), menunjukkan adanya perbedaan golongan senyawa metabolit sekunder. Daun sirih merah mengandung senyawa alkaloida, saponin, tannin, dan glikosida steroid.
2. Rendemen ekstrak kasar *n*-heksana sebanyak 1,67%, ekstrak kasar etil asetat sebanyak 6,40%, dan ekstrak kasar metanol sebanyak 10,15%.
3. Komponen kimia yang teridentifikasi menggunakan GC-MS dalam fraksi A diduga senyawa butil etanoat, α -pinen, limonen, cineol-1,8, terpinen-4-ol; komponen dalam fraksi B diduga adalah 6,7-dimetoksi-2,2-dimetil-1-benzopiran ; dan komponen dalam fraksi C diduga etil palmintat dan etil stearat.
4. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH menunjukkan bahwa ekstrak yang memiliki bioaktivitas tertinggi sebagai antioksidan adalah ekstrak kasar metanol dengan nilai $IC_{50} = 3,44$ ppm dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksana dan etil asetat, sedangkan aktivitas antioksidan hasil fraksinasi kromatografi kolom dari *n*-heksana (fraksi A), etil asetat (fraksi B), dan metanol (fraksi C) menunjukkan nilai yang menurun dibandingkan dengan ekstrak kasarnya.
5. Uji BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach terhadap ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dari daun sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume) menunjukkan bahwa tingkat toksisitas tertinggi pada ekstrak kasar metanol dengan nilai LC_{50} 16,15 mg/L dan terendah pada ekstrak kasar *n*-heksana dengan nilai LC_{50} 133,2 mg/L.

Universitas Indonesia

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan dalam hal pemurnian dan penentuan struktur kimia yang mempunyai bioaktivitas dari fraksi etil asetat dan metanol daun sirih merah.



Universitas Indonesia

DAFTAR PUSTAKA

- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., dan Robards, K. (2002). Methodes for testing atioxidant activity. www.rsc.org/analyt.
- Aruoma, O.I., Cuppet, S.L. (1997). *Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts*. Champaign, Illinois: AOCS press.
- Ayo, R.G., Audu, O.T., and Amupitan, J.O. (2007). *Physico-hemical characterization and cytotoxicity studies of seed sxttracts of Khaya senegalensis (Desr.) A.Juss.* African J. Biotech. Vol. 6 (7).
- Bors, W., Heller, Michel, C. and Saran, M. (1990). *Flavonoids as antioxidant: determination of radical-scavenging efficiencies*, Methods In Enzymology, 186, 343-355.
- Cassady, John M., and Dourus, Jhon D. (1980). *Anticancer agents based on natural product models* (xiii + 484 pp). New York: Academic Press.
- Ciulei, I. (1984). *Methodology for analysis of vegetable drugs*, Chemical Industries Branch Division – Industrial Operation UNINDO, Bucharest – Romania : 11 – 23.
- Cutler, S.J., dan Cutler, H. (2000). *Biologically active natural products: Pharmaceuticals* (pp:1-13, 17-22, 73-92). Boca Raton, USA: CRC Press LLC.
- Colegate, S.M., dan Russel, J.M. (1993). *Bioactive natural products, detection, isolation, and structural determination* (pp: 442, 444-448). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Creswell, C.J., Runquist, O.A., dan Campbell, M.M. (1982). *Analisis spektrum senyawa organik* (Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, Penerjemah.). Bandung: ITB.
- Fujimoto, Y. dan Satoh, M. (1986). *Studies var aureum II. Synthesis and cytotoxic activity of trihydrocytetralones*. Chem. Pharm, Bull, 34: 4540-4544.
- Fujimoto, Y., S. Usui, M.M. dan Sumatra, M. (1996). *Phluroglucinols from Baeckea Frutescens*. Phytoche, 41 : 923-925.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., and Scaccini, C. (1998). *Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine*. J.Agric. Food Chem., 46, 2, 361-367.
- Gordon, M.H. (1990). *The mechanism of atioxidant action in vitro, in the food antioxidant*. London and New York: Elsevier Applied Science.

Universitas Indonesia

- Hall III, C.A. dan Cuppett, S.L., (1997). *Structure-activities of natural antioxidants. in : Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts* (pp: 141-172) (Aruoma, O.I., and Cuppett, S.L. eds.). Champaign, Illinois: AOAC press.
- Haliwell, B., Gutteridge, J.M.C. dan Carrol, E.C. (1992). *Free radicals, antioxidant, and human disease : Where are we now ?*. *J.Lab.Clin.Mod.* 598-615.
- Haliwell, B., dan Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine.* (3rd). Singapore:Oxford University Press.
- Herawati. (2006). *Studi komponen aktif antioksidan dan antimikroba dari buah mahkota dewa (Phaleria macrocarpa [Scheff.] Boerl.)*. Tesis Program Pascasarjana, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia.* (Jilid III). Jakarta : Yayasan Sarana Wana Jaya.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. (2008). *Fitokimia.* Surabaya: Airlangga University Press.
- Lie, D. et al. (2003). *Antioxidative and antiplatelet effects of aqueous inflorescence Paper betle extract.* *J.Agric. Food Chem.*, 51, 2083-2088.
- Lisdawati, V. (2002). *Bioasai antikanker in vitro dengan sel leukemia dan isolasi serta penentuan struktur molekul senyawa kimia dari buah mahkota dewa (Phaleria macrocarpa [Scheff.] Boerl.)*, Tesis Program Pascasarjana, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.
- Mann, J. (1980). *Secondary metabolism.* Oxford: Clarendon press.
- Manoi, F. (2007). *Warta Puslitbangun Bogor, Vol. 13 (2).*
- Meyer, H.N. et al. (1982). *Brine shrimp lethality test.* (Vol. 45). Med Amsterdam: Plant Research, Hipokrates Verlag Gmbrl.
- Mc. Laughlin, J. L., Ching J. Chang dan Smith, D.L. (1991). *Studies in natural product* (vol. IX). USA: Elsevier Science PUB.B.V.
- Miyake, T. dan Shibamoto, T. (1997). *Antioxidative of natural compounds found in plants.* *J. Agric. Food. Chem.*, 45, 1819-1822.
- Murakami, A., Morita, H., Safitri, R., Ramlan, A. Koichi, K. dan Hajime O. (1998). *Screening in vitro antitumor promoting activities of edible plants from Indonesia.* *Cancer Detection and Prevention* 22, 6, 516-525.
- Ocke, M.C. (1996). *Assesment of vegetable, fruit and antioxidant vitamin intake in cancer epidemilogy.* Thesis. Grafisch Bedrijf Poisen & Looijen b.v., Wageningen, The Netherlands.

- Ogata, M., Hoshi, M., Shimtohm, K., Urano, S., dan Endo, T. (1997). *Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds*. *JAOCS*, 7 (5) 557-562.
- Okada, Y. dan Okada, M. (1998). *Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans on free radicals and active oxygen species*. *J.Agric.Food.Chem*, 46, 401-406.
- Penman, R.A. dan Gordon, M.H. (1998). *Antioxidative properties of myricetin and quercetin in oil and emulsions*. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75,2, 169-180.
- Perrin, D.D., dan Armarego, W.L.F. (1988). *Purification of laboratory chemicals* (third edition). Oxford: Pergamon press.
- Pieta, P.G. (2000). *Flavonoids as antioxidants*. *J.Nat.Prod*, 63, 1043-1046.
- Pratt, D.E. dan Hudson, B.J.F. (1990). *Natural antioxidant not exploited commercially, in food antioxidant*. London and New York: Elsevier Applied Science.
- Rapisarda A., Ragusa S., dan De Pasquale A.1(993). *Brine shrimp bioassay of the leaves of some cordia species*. Italia: *Pharmaco-Biological Departement University of Messina*.
- Scott, G. (1987). *Antioxidants*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61,165-170.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yhara, K. dan Nakamura, T.1(992). *Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soyebean in cyclodextrin emulsion*. *J. Agric. Food. Chem*, 40, 945-948.
- Siswandono, S.B. (1998). *Prinsip-prinsip rancangan obat*. (Cetakan pertama).Surabaya: Universitas Airlangga.
- Soediro, I. (1995). *Organisme bahari sebagai sumber bahan bioaktif*. Proceeding Unesco Seminar on Chemistry of Natural Product of Indonesian Plants, Depok.
- Sudewo, B. (2005). *Basmi penyakit dengan sirih merah*. Jakarta: PT. Agro Media Pustaka.
- Takahashi, M., dan Niki, E. (1998). *The effect of antioxidant stress on cells by oxygen radicals and its inhibition by antioxidant in oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Tsuda, T., Toshihiko O., Tsutomu N., Shunro, K., dan Katsumi, O. (1993) *Antioxidant activity of pea bean extract*. *J.Am.Oil Chem.Soc*, 70, 9, 909-912.

- Walton, J.R., dan Packer, L. (1980). *Free radical damage protection relationships to cellular aging and cancer, in vitamin E comprehensive treatise*. New York: Marcel Dekker.
- Wang, L., et al. (2005). *Lignans from the roots of wikstroemia indica and their DPPH radical, scavenging and nitric oxide inhibitory activities*. *Chem Pharm. Bull*, 53 (10), 1348-1351.
- Wibowo, A.E. (2003). *Isolasi dan elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder dari mikroba laut Aspergillus versicolor (VUIII) Firaboschi yang mempunyai aktivitas toksik terhadap larva udang Artemia Salina Leach*. Tesis Program Pascasarjana, FMIPA. Depok: Universitas Indonesia.
- Winarno, F.G. (1984). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia



Universitas Indonesia

Lampiran 1. Identifikasi/determinasi tanaman sirih merah (*Piper cf. arcuatum* Blume)



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)
Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 7 Mei 2010

Nomor 638 /IPH.1.02/If.8/V/2010
Lampiran :-
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Candra Irawan
Akademi Kimia Analisa Bogor
Jl. Pangeran Sogiri No. 283
Tanah Baru Bogor

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Sirih Merah	<i>Piper cf. arcuatum</i> Blume	Piperaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.



Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

Keterangan :
Spesimen tidak lengkap (tanpa bunga atau buah), yang dapat kami lakukan adalah identifikasi hingga mendekati jenis saja, *Piper cf. arcuatum* Blume (Piperaceae).

D:\Ident 2010\Candra Irawan.doc\UJA-APK

Page 1 of 1

Lampiran 2 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel ekstrak *n*-heksana dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi ekstrak <i>n</i> -heksana		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,936	0,936	0,936	0,936
5	0,936	0,585	0,531	0,445
10	0,936	0,581	0,532	0,442
15	0,936	0,575	0,529	0,440
20	0,936	0,574	0,527	0,438
25	0,936	0,574	0,526	0,437
30	0,936	0,574	0,526	0,437

Lampiran 3 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel ekstrak etil asetat dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi ekstrak etil asetat		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,936	0,936	0,936	0,936
5	0,936	0,571	0,517	0,428
10	0,936	0,567	0,514	0,424
15	0,936	0,565	0,515	0,417
20	0,936	0,560	0,512	0,409
25	0,936	0,560	0,509	0,403
30	0,936	0,560	0,509	0,403

Lampiran 4 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel ekstrak metanol dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi ekstrak metanol		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,936	0,936	0,936	0,936
5	0,936	0,564	0,510	0,421
10	0,936	0,560	0,507	0,417
15	0,936	0,554	0,505	0,410
20	0,936	0,553	0,504	0,398
25	0,936	0,553	0,502	0,396
30	0,936	0,553	0,502	0,396

Lampiran 5 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel fraksi A dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi fraksi A		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,961	0,961	0,961	0,961
5	0,960	0,926	0,920	0,909
10	0,959	0,925	0,918	0,907
15	0,960	0,923	0,917	0,906
20	0,960	0,922	0,915	0,905
25	0,961	0,922	0,915	0,902
30	0,960	0,921	0,914	0,902

Lampiran 6 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel fraksi B dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi fraksi B		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,960	0,960	0,957	0,923
5	0,960	0,960	0,937	0,907
10	0,959	0,958	0,936	0,904
15	0,958	0,957	0,936	0,902
20	0,960	0,957	0,935	0,900
25	0,961	0,956	0,934	0,900
30	0,960	0,956	0,933	0,899

Lampiran 7 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel fraksi C dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi fraksi C		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,961	0,961	0,961	0,961
5	0,960	0,923	0,918	0,905
10	0,959	0,920	0,917	0,900
15	0,960	0,919	0,916	0,898
20	0,960	0,918	0,915	0,896
25	0,961	0,918	0,914	0,896
30	0,960	0,918	0,914	0,896

Lampiran 8 Hasil pengukuran absorbansi ($\lambda = 515 \text{ nm}$) sampel BHT dan kontrol pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Waktu (menit)	Kontrol	Konsentrasi BHT		
		1 ppm	3 ppm	5 ppm
0	0,936	0,936	0,936	0,936
5	0,936	0,580	0,566	0,478
10	0,936	0,571	0,500	0,470
15	0,936	0,520	0,480	0,468
20	0,936	0,501	0,475	0,465
25	0,936	0,480	0,470	0,463
30	0,936	0,478	0,469	0,435

Lampiran 9 Hasil analisis % inhibisi dan IC_{50} terhadap sampel uji pada uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH setelah 30 menit

Sampel uji	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi pada $\lambda = 515 \text{ nm}$	Inhibisi (%)	IC_{50} (ppm)
Kontrol	0	0,936	0,00	43,24
Ekstrak <i>n</i> -heksana	1	0,574	38,68	
	3	0,527	43,70	
	5	0,438	53,20	
Kontrol	0	0,936	0,00	36,80
Ekstrak etil asetat	1	0,560	40,17	
	3	0,512	45,30	
	5	0,409	56,30	
Kontrol	0	0,936	0,00	3,44
Ekstrak metanol	1	0,553	40,92	
	3	0,504	46,15	
	5	0,398	57,48	
Kontrol	0	0,961	0,00	100,5
Fraksi A	1	0,922	4,06	
	3	0,915	4,79	
	5	0,905	5,83	
Kontrol	0	0,961	0,00	61,38
Fraksi B	1	0,915	4,79	
	3	0,910	5,31	
	5	0,886	7,80	
Kontrol	0	0,961	0,00	81,04
Fraksi C	1	0,918	4,48	
	3	0,915	4,79	
	5	0,896	6,76	
Kontrol	0	0,936	0,00	4,37
BHT	1	0,501	46,474	
	3	0,475	49,252	
	5	0,465	50,321	

Catatan:

Kontrol: larutan DPPH

Lampiran 10 Hasil uji BSLT ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol daun sirih merah

Sampel	Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Larva Hidup			Larva Mati		
		I	II	III	I	II	III
Ekstrak <i>n</i> -heksana	10	10	10	10	0	0	0
	100	9	6	6	1	4	4
	1000	0	0	0	10	10	10
Ekstrak etil asetat	10	8	5	9	2	5	1
	100	9	4	6	1	6	4
	1000	0	0	0	10	10	10
Ekstrak metanol	10	8	4	3	2	6	7
	100	2	3	2	8	7	8
	1000	0	0	0	10	10	10
Blanko Air Laut		10	10	10	0	0	0

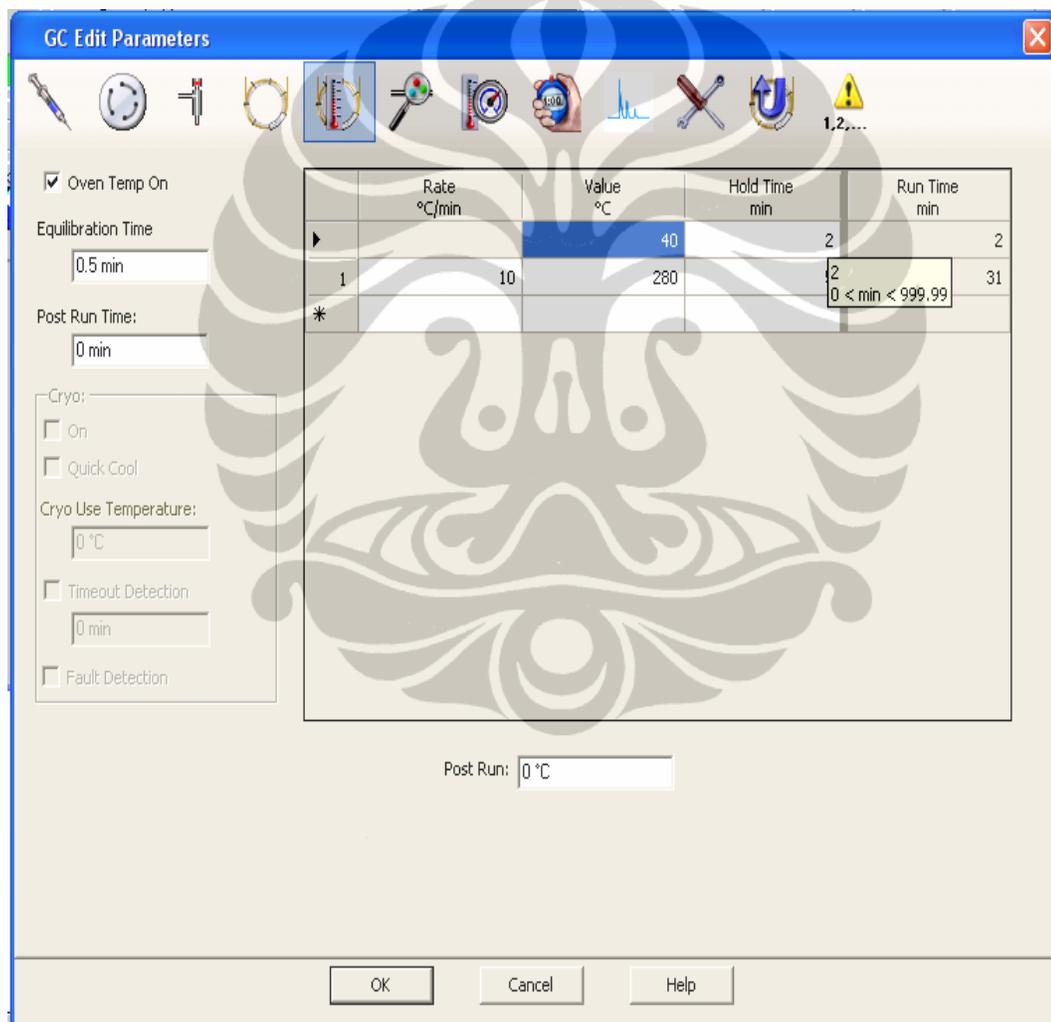
Lampiran 11 Tabel probit

Prosentase	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,02	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,15	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,40	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,60	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,20	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,91
80	5,84	5,66	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,29	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,03	7,33
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,69	7,89	8,93

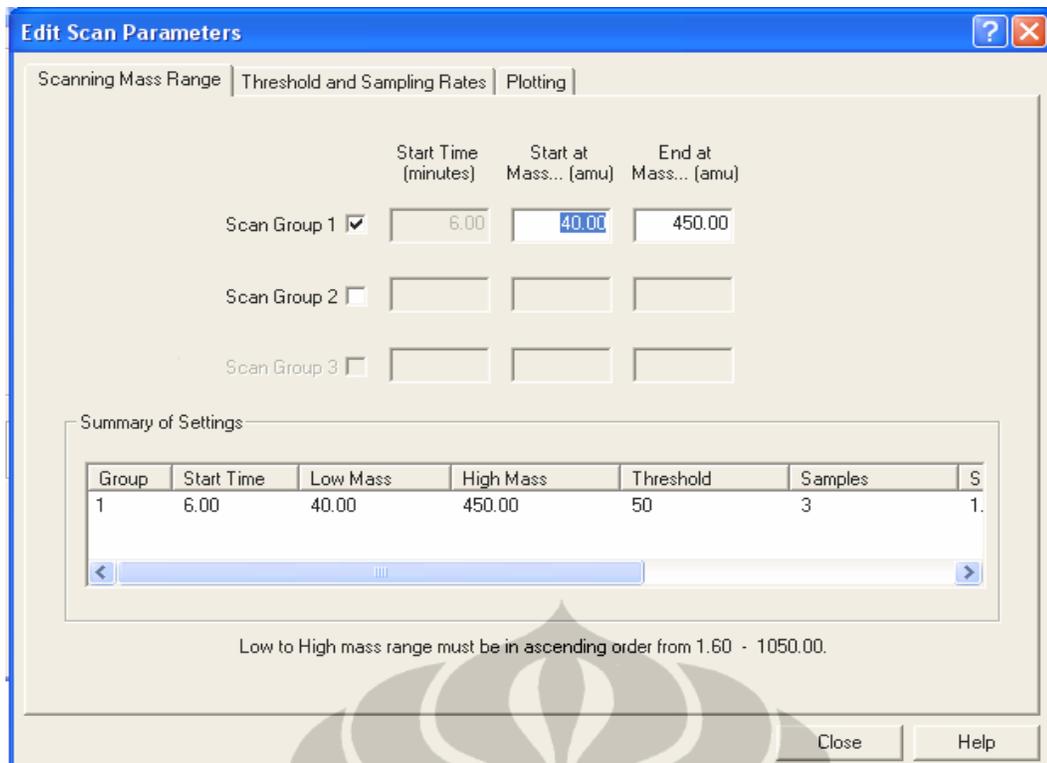
Lampiran 12 Data perhitungan LC_{50} sampel *n*-heksana, etil asetat, dan metanol daun sirih merah

Sampel	Kosentrasi Ekstrak (ppm)	Log Konsentrasi	% Kematian	Nilai Probit
Ekstrak Heksana	10	1	0	0
	100	2	30,00	4,4
	1000	3	100,00	8,93
Ekstrak Etil Asetat	10	8	26,67	4,39
	100	2	36,67	4,67
	1000	3	100,00	8,93
Ekstrak Metanol	10	1	50,00	5,00
	100	2	76,67	5,74
	1000	3	100,00	8,93
Blanko Air Laut		0	0	0

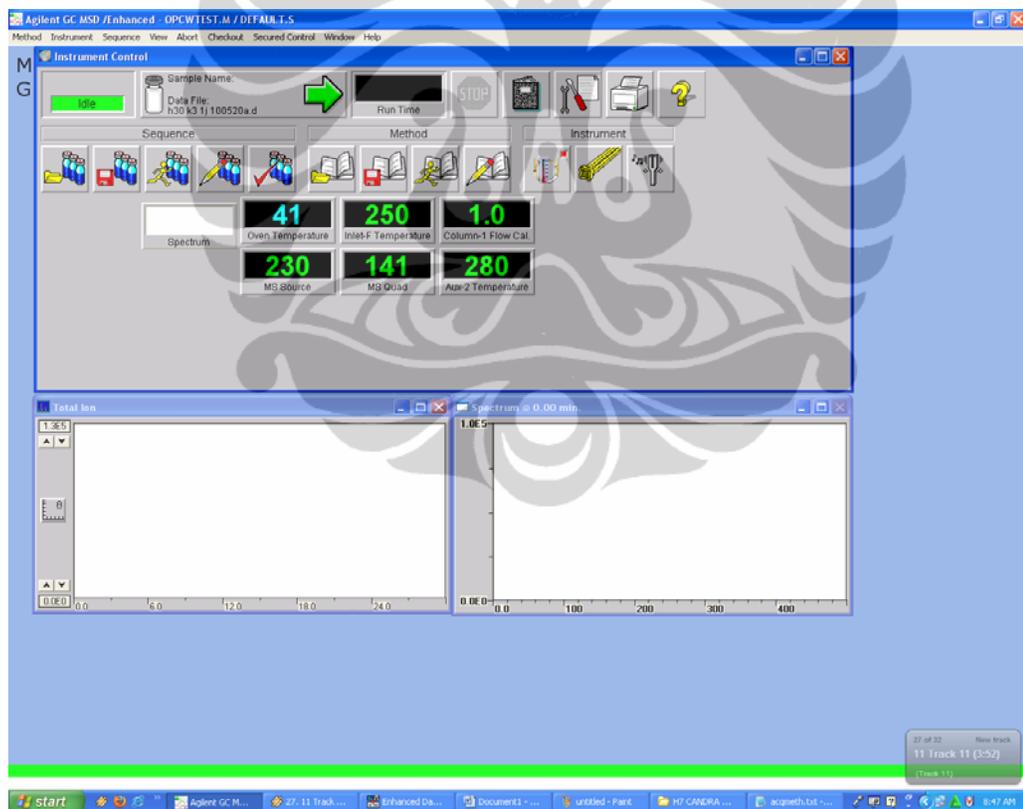
Lampiran 13 Kondisi operasi alat GC-MS



lanjutan Lampiran 14



lanjutan Lampiran 15



lanjutan Lampiran 16

GC Edit Parameters

SSL - Front

Split-Splitless Inlet

<input checked="" type="checkbox"/> Heater:	250 °C	Gas Saver: <input checked="" type="checkbox"/> On	
<input checked="" type="checkbox"/> Pressure:	7 psi	20 mL/min	After: 3 min
Total Flow:	53.994 mL/min		
<input checked="" type="checkbox"/> Septum Purge Flow:	3 mL/min		
Septum Purge Flow Mode:	Standard		

Mode:	Splitless	Purge Flow to Split Vent:	
		50 mL/min	at 0.7 min

OK Cancel Help

