



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN UJI AKTIVITAS BIOLOGI
DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN COCOR BEBEK
(*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken)**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

**SOFA FAJRIAH
0906577274**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Sofa Fajriah
NPM : 0906577274
Tanda Tangan : 
Tanggal : 15 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : Sofa Fajriah
NPM : 0906577274
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul Tesis : Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Biologi dari
Fraksi Etil Asetat Daun Cocor Bebek (*Bryophyllum
pinnatum* (Lam.) Oken)

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc (.....)
Pembimbing : Dr. Muhammad Hanafi, M.Sc (.....)
Penguji : Dr. Endang Saefudin (.....)
Penguji : Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana (.....)
Penguji : Dr. Emil Budiarto (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 15 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena berkat rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis dengan judul “ Isolasi , Identifikasi, dan Aktivitas Biologi dari Fraksi Etil Asetat Daun Cocor Bebek (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken)” dilakukan sebagai syarat untuk mencapai gelar Magister Sains bidang kekhususan Kimia Hayati pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam penyusunan tesis ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak baik moril maupun materiil. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga pada Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Sc dan Dr. Muhammad Hanafi, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya untuk memberikan arahan, bimbingan dan masukan yang berguna selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan dan dukungan yang telah diberikan oleh:

1. Dr. Endang Saefudin dan Dr. Asep Saefumillah, M. Si, selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi beserta seluruh staf pengajar pascasarjana Ilmu Kimia.
2. Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran selama mengikuti perkuliahan dan menyelesaikan penelitian ini.
3. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang telah memberikan beasiswa kepada penulis sehingga dapat diberi kesempatan untuk menyelesaikan pendidikan S2.
4. Dr. Linar Zalinar Udin, selaku Pimpinan Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian dan menggunakan fasilitas alat di Laboratorium Kimia Bahan Alam, Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong.

5. Keluarga kecilku tercinta, suami Didin Syahbudin dan anakku M. Ziyad Naufal Fasya serta ayahanda dan ibunda tercinta atas do'a, dukungan moril maupun materil, serta pengertiannya selama penulis menyelesaikan tesis ini.
6. Ahmad, Mega, Lia, Mimin, Nita, Risa, Kiki, Yati, Lala, Andini, Ibu Puspa, Ibu Nina, Ibu Dewi dan semua staf Pusat Penelitian Kimia-LIPI yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di Puslit Kimia LIPI Serpong.
7. Evi, Nurul, Ellya, Yetty, Tanti, Safa, dan rekan-rekan mahasiswa pascasarjana serta seluruh staf karyawan Jurusan Kimia FMIPA UI yang telah memberi bantuan dan dorongan semangat kepada penulis.
8. Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis ini, sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan penulis sangat berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya khususnya pada ilmu kimia.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Sofa Fajriah
NPM : 0906577274
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : FMIPA
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 :

Isolasi, Identifikasi, dan Aktivitas Biologi dari Fraksi Etil Asetat Daun Cocor Bebek (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken)

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/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 : Depok

Pada tanggal : 15 Juli 2011

Yang menyatakan


(Sofa Fajriah)

ABSTRAK

Nama : Sofa Fajriah
Program Studi : Kimia
Judul : Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Biologi dari Fraksi Etil Asetat Daun Cocor Bebek (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken)

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken merupakan salah satu tumbuhan obat yang banyak tersedia di Indonesia, tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam daun *B. pinnatum* dan menguji aktivitas biologinya, diantaranya uji antidiabetes terhadap enzim α -glukosidase, antioksidan dengan metode DPPH, toksisitas (BSLT), dan antikanker terhadap sel kanker P-388. Ekstrak metanol daun *B. pinnatum* difraksinasi berturut-turut dengan *n*-heksana-air (1:1) dan etil asetat-air (1:1). Fraksi etil asetat selanjutnya dipisahkan lebih lanjut menggunakan teknik kromatografi kolom cepat dan diperoleh dua buah fraksi yang dominan (Fraksi 7 dan 9). Fraksi 7 dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi dan diperoleh isolat A. Fraksi 9 dikristalisasi dengan kloroform-metanol dan diperoleh isolat B. Isolat A dan B diidentifikasi menggunakan spektroskopi UV/Vis, FT-IR, LC-MS, dan FT-NMR, masing-masing adalah quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida dan quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida. Quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida mempunyai aktivitas biologi (antidiabetes, antioksidan, BSLT, sitotoksik terhadap sel kanker P-388) yang lebih baik/aktif dibandingkan senyawa quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida.

Kata Kunci : *Bryophyllum pinnatum*, Quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida dan Quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida, aktivitas biologi

xiv + 79 halaman : 15 gambar; 13 tabel
Daftar Pustaka : 40 (1980-2010)

ABSTRACT

Name : Sofa Fajriah
Study Program : Chemistry
Title : Isolation, Identification, and Biological Activities Assay from Ethyl Acetate Fraction of Cocor Bebek Leaves (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken)

Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken is one of the medicinal plants are widely available in Indonesia, but not fully utilized. Therefore, it has been done research to isolate the chemical compounds contained in the leaves of *B. pinnatum* and its biological activity, including antidiabetic test against α -glucosidase enzymes, antioxidants with DPPH method, toxicity (BSLT), and anticancer against P-388 cancer cells. Methanol extract of the leaves of *B. pinnatum* fractionated with n-hexane - water (1:1), then ethyl acetate - water (1:1). The ethyl acetate fraction separated further using vacuum column chromatography technique and obtained two dominant fractions (fractions 7 and 9). Fraction 7 further purified by gravity column chromatography and obtained isolate A. Fraction 9 crystallized with chloroform-methanol and obtained isolate B. Isolates A and B were identified using UV/Vis, FT-IR, LC-MS, and FT-NMR, respectively, quercetin-3- *O*- α -L-rhamnopyranoside and quercetin-3- *O*- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopyranoside. Quercetin-3- *O*- α -L-rhamnopyranoside has biological activity (antidiabetic, antioxidant, BSLT, cytotoxic against cancer cells P-388) better/active than quercetin-3- *O*- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopyranoside.

Key words : *Bryophyllum pinnatum* , Quercetin-3- *O*- α -L-rhamnopyranoside, Quercetin-3- *O*- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopyranoside

xiv +79 pages : 15 pictures; 13 tables
Bibliography : 40 (1980-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Hipotesis Penelitian	2
1.4. Tujuan Penelitian	2
1.5. Manfaat Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tanaman <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	4
2.1.1. Uraian Tanaman	4
2.1.2. Kandungan Kimia dan Aktivitas Farmakologi	5
2.2. Aktivitas Biologi Senyawa Kimia	8
2.2.1. Uji aktivitas antidiabetes tumbuhan obat	8
2.2.1.1. Mekanisme Kerja Inhibitor α -Glukosidase	10
2.2.1.2. Mekanisme Pengujian Inhibisi Aktivitas α -Glukosidase	12
2.2.2. Toksisitas terhadap <i>Brine Shrimp</i>	13
2.2.3. Antioksidan	14
2.2.4. <i>Murine Leukemia</i> P-388	16
3. METODE PENELITIAN	18
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian Pengumpulan	18
3.2. Alat dan Bahan	18
3.3. Cara Kerja	
3.3.1. Pengumpulan dan Pengidentifikasian Sampel	19
3.3.2. Isolasi daun cocor bebek (<i>Bryophyllum pinnatum</i>)	20
3.3.3. Elusidasi Senyawa Murni.....	21
3.3.4. Uji Aktivitas Biologi.....	22
3.3.4.1. Uji Aktivitas Penghambatan enzim α -Glukosidase <i>in vitro</i>	22
3.3.4.2. Uji Toksisitas terhadap <i>Brine Shrimp</i>	25
3.3.4.3. Uji Aktivitas Antioksidan	26

	Halaman
3.3.4.4 Uji Antikanker <i>Murine Leukemia</i> P-388	27
3.4 Bagan Pelaksanaan Penelitian	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari fraksi etil asetat daun <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	29
4.2 Penentuan Struktur Molekul	32
4.2.1 Penentuan Struktur Molekul Isolat A	32
4.2.2 Penentuan Struktur Molekul Isolat B	40
4.3 Hasil Uji Aktivitas Biologi	49
4.3.1 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase	49
4.3.2 Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	51
4.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan	51
4.3.4 Hasil Uji Antikanker <i>in vitro</i> dengan P-388	53
5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
DAFTAR PUSTAKA	56

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Daun <i>Bryophyllum pinnatum</i>	5
Gambar 2.2	Struktur beberapa senyawa aktif insektisidal dari marga <i>Kalanchoe</i>	6
Gambar 2.3	Struktur dari kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (1), kuersetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (2), 4',5-dihidroksi-3'-8-dimetoksiflavon-7- <i>O</i> - β -D-glukopiranosida (3), dan kuersitrin	7
Gambar 2.4	Beberapa struktur inhibitor α -glukosidase. (1) akarbosa, (2) metil α,β - acarviosinida, (3) 1-deksinojirimisin	10
Gambar 2.5	Mekanisme kerja inhibitor α -glukosidase	11
Gambar 2.6	Mekanisme reaksi penguraian substrat <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glukopiranosida	12
Gambar 2.7	Mekanisme reaksi <i>Radical Scavenger</i>	15
Gambar 2.8	Mekanisme reaksi DPPH denga antioksidan	16
Gambar 3.1	Bagan pelaksanaan penelitian	28
Gambar 4.1	Kromatogram fraksi 1 s/d 9 hasil pemisahan kromatografi kolom cepat dari fraksi etil asetat daun <i>B. pinnatum</i> pada lempeng KLT silika gel GF ₂₅₄ dengan eluen <i>n</i> -heksana: etil asetat (1:1) (a) dan etil asetat:metanol (9:1) (b)	29
Gambar 4.2	Kromatogram fraksi 1 s/d 5 hasil pemisahan kromatografi kolom gravitasi dari fraksi 7 pada lempeng KLT silika gel GF ₂₅₄ dengan eluen kloroform:metanol (9:1)	31
Gambar 4.3	Kromatogram fraksi yang larut kloroform (tengah) dan yang tidak larut kloroform (kanan) hasil kristalisasi fraksi 9 pada lempeng KLT silika gel GF ₂₅₄ dengan eluen etil asetat:metanol (8:2)	31
Gambar 4.4	Spektrum LC (<i>Liquid Chromatography</i>) Isolat A	33
Gambar 4.5	Spektrum MS (<i>Mass Spectrometry</i>) Isolat A	34
Gambar 4.6	Ilustrasi kerangka aromatik isolat A.	35
Gambar 4.7	Korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat A.	39

	Halaman
Gambar 4.8 Struktur senyawa isolat A dari penggabungan korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat A.	39
Gambar 4.9 Struktur senyawa quercetin 3-O- α -L-ramnosida	40
Gambar 4.10 Hasil Kromatogram LC Isolat B	41
Gambar 4.11 Hasil Pengukuran Spektroskopi MS Isolat B	41
Gambar 4.12 Struktur molekul α -L-ramnosa (a) dan α -L-arabinopiranosida (b)	43
Gambar 4.13 Korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat B.....	47
Gambar 4.14 Struktur senyawa isolat A dari penggabungan korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat B	47
Gambar 4.15. Struktur senyawa quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida	48
Gambar 4.16 Kromatogram ekstrak metanol (1), fraksi etil asetat (2), quercetin 3-O- α -L-ramnosida (3) dan quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (4) dari daun <i>B. pinnatum</i> dengan eluen kloroform-metanol (8:2)	49
Gambar. 4.17 Reaksi reduksi DPPH	53

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Tabel 4.1 Data perbandingan eluen pada kromatografi kolom cepat dari fraksi etil asetat dari daun <i>B. pinnatum</i> serta fraksi gabungan yang diperoleh	30
Tabel 4.2 Data pergeseran kimia ¹ H- NMR isolat A	35
Tabel 4.3 Data pergeseran kimia ¹³ C- NMR dan DEPT 135 isolat A	36
Tabel 4.4 Perbandingan ¹ H- dan ¹³ C-NMR isolat A dengan quercetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnosida	37
Tabel 4.5 Data pergeseran kimia HMQC dan HMBC isolat A	38
Tabel 4.6 Data pergeseran kimia ¹ H- NMR isolat B	43
Tabel 4.7 Data pergeseran kimia ¹³ C- NMR dan DEPT 135 isolat B	44
Tabel 4.8 Perbandingan ¹ H- dan ¹³ C-NMR isolat B dengan quercetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida	45
Tabel 4.9 Data spektrum HMQC dan HMBC isolat B	46
Tabel 4.10 Hasil uji penghambatan enzim α -glukosidase secara invitro	50
Tabel 4.11 Analisa hasil <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	51
Tabel. 4.12 Data analisa hasil uji antioksidan isolat A dan B	52
Tabel 4.13 Hasil uji anti kanker <i>Murine Leukemia</i> P-388	54

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil Identifikasi Sampel Tanaman	60
Lampiran 2. Spektrum UV-Vis Isolat A	61
Lampiran 3. Spektrum IR Isolat A	62
Lampiran 4. Spektrum ¹ H-NMR Isolat A	63
Lampiran 5. Spektrum ¹³ C-NMR dan DEPT 135 Isolat A	64
Lampiran 6. Spektrum HMQC Isolat A	65
Lampiran 7. Spektrum HMBC Isolat A	66
Lampiran 8. Spektrum UV/Vis Isolat B	67
Lampiran 9. Spektrum FT-IR Isolat B	68
Lampiran 10. Spektrum ¹ H-NMR Isolat A	69
Lampiran 11. Spektrum ¹³ C-NMR dan DEPT 135 Isolat B	70
Lampiran 12. Spektrum HMQC Isolat B	71
Lampiran 13. Spektrum HMBC Isolat B	72
Lampiran 14. Grafik hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase terhadap kuersitrin, isolat A dan isolat B	73
Lampiran 15. Grafik hasil uji BSLT (<i>Brine Shrimp Lethally Test</i>) isolat A dan B	74
Lampiran 16. Grafik hasil uji antioksidan dengan metode DPPH dari kuersetin, isolat A dan isolat B	75
Lampiran 17. Hasil Uji Antikanker P-388 Isolat A	76
Lampiran 18. Perhitungan IC ₅₀ uji antikanker <i>Murine leukemia</i> P-388 dari isolat A	77
Lampiran 19. Hasil Uji Antikanker P-388 Isolat B	78
Lampiran 20. Perhitungan IC ₅₀ uji antikanker <i>Murine leukemia</i> P-388 dari isolat A	79

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan bahan alam, baik itu digunakan untuk obat maupun untuk tujuan yang lain, kini semakin meningkat, terlebih lagi dengan adanya isu *back to nature* serta krisis yang menyebabkan menurunnya daya beli masyarakat. Adanya pergeseran gaya hidup tersebut semakin mendorong berbagai tindakan penelitian untuk memperoleh hasil yang dapat digunakan secara maksimal untuk meningkatkan kesejahteraan manusia.

Obat merupakan hal yang sangat penting bagi kehidupan manusia. Sejalan dengan laju pertumbuhan penduduk dan munculnya jenis-jenis penyakit yang merebak luas di masyarakat mengakibatkan kebutuhan obat menjadi suatu hal yang sangat penting. Tetapi di Indonesia kondisi tersebut tidak diimbangi dengan ketersediaan bahan baku obat yang umumnya masih diimpor. Negeri kita dikenal kaya akan berbagai jenis tumbuhan, namun baru sebagian yang telah dimanfaatkan sebagai obat. Sebagai solusi atas kurangnya bahan baku obat tersebut, maka perlu dilakukan upaya alternatif, seperti pencarian bahan baku obat alami yang tersedia di Indonesia.

Salah satu dari keanekaragaman hayati yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat tradisional adalah cocor bebek (*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken). Tanaman ini termasuk tanaman *sukulen* (mengandung air) yang berasal dari Madagaskar. Tanaman ini terkenal dikarenakan cara reproduksinya melalui tunas daun (tunas adventif). Penelitian mengenai kandungan fitokimia dan aktivitas biologi *B. pinnatum* telah banyak dilakukan. *B. pinnatum* merupakan tanaman obat yang tumbuh tahunan (perennial) yang digunakan sebagai anti inflamasi, antileishmanial (Muzitano, M.F., *et al.*, 2006), *antiulcer* (Pal, *et al.*, 1991), antibakteri (Akinpelu, 2000), insektisidal alami (Supratman, U., *et al.*, 2000), hepatoprotektif (Yadav, N.P & Dixit, V.K., 2003), anti histamin (Cruz, E.A., *et al.*, 2008), dan antitumor (Supratman, U., *et al.*, 2001). Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman ini terutama merupakan golongan bufadienolida, terpenoid dan flavonoid

(Muzitano, M.F., *et al.*, 2006), diantaranya bersaldegenin-1,3,5-orthoacetate, bufadienolide-bryophyllin B, bryophyllol, bryophollone, bryophollenone, bryophynol, 2(9-decenyl)-phenanthrene dan 2-(undecenyl)-phenanthrene (Yadav, N.P & Dixit, V.K., 2003). Di Indonesia, penelitian mengenai kandungan fitokimia dan aktivitas biologi *B. pinnatum* belum banyak dilakukan. Mudah-mudahan perkembangan dan adanya potensi aktivitas biologi dari *B. pinnatum*, penelitian mengenai kandungan senyawa metabolit sekunder dari *B. pinnatum* perlu dilakukan agar dapat dikembangkan menjadi obat herbal terstandar dan fitofarmaka.

1.2 Rumusan Masalah

Cocor bebek (*B. pinnatum*) merupakan salah satu tumbuhan obat yang banyak tersedia di Indonesia, namun belum banyak penelitian yang dilakukan untuk mengeksplorasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya, sehingga kekayaan dan manfaat serta khasiat yang dimiliki belum dimanfaatkan secara maksimal, khususnya sebagai antidiabetes dan antioksidan.

1.3 Hipotesis Penelitian

B. pinnatum diduga mengandung senyawa metabolit sekunder dan memiliki aktivitas biologi sebagai antidiabetes, antioksidan, toksisitas dan antikanker leukemia.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun *B. pinnatum* serta menguji aktivitas biologinya, diantaranya uji antidiabetes terhadap enzim α -glukosidase, antioksidan dengan metode DPPH, toksisitas (BSLT), dan antikanker terhadap sel kanker P-388.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai kandungan kimia *B. pinnatum* dan beberapa aktivitas biologinya, serta menambah khasanah Ilmu Pengetahuan khususnya Kimia Bahan Alam.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken

2.1.1 Uraian Tanaman

Tanaman *Bryophyllum pinnatum* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Bangsa	: Rosales
Suku	: Crassulaceae
Marga	: Kalanchoe
Jenis	: <i>Kalanchoe pinnata</i> Lam. Pers
Sinonim	: <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken

Bryophyllum pinnatum mempunyai sinonim *Bryophyllum calycinum* Salisb., *B. germinans*, *B. pinnatum*, *Cotyledon calycina*, *C. calyculata*, *C. pinnata*, *C. rhizophilla*, *Crassuvia floripendia*, *Crassula pinnata*, *Sedum madagascariense*, *Verea pinnata* dengan nama umum sosor bebek, nama daerahnya didingin banen (Aceh), dun sejuk (Melayu), Buntiris (Sunda), sosor bebek (Jawa Tengah), daun ancar bebek (Madura), mamala (Halmahera), rau kufri (Ternate), kabi-kabi (Tidore) (Efizal, 2007).

B. pinnatum merupakan tumbuhan sukulen (mengandung air) yang berasal dari Madagaskar. Tanaman ini terkenal karena metode reproduksinya melalui tunas daun (tunas/adventif). Cocor bebek populer digunakan sebagai tanaman hias di rumah tetapi banyak pula yang tumbuh liar di kebun-kebun dan pinggir parit yang tanahnya banyak berbatu. Cocor bebek memiliki batang yang lunak dan beruas (Gambar 2.1). Daunnya tebal berdaging dan mengandung banyak air. Warna daun hijau muda (kadang kadang abu-abu). Bunga majemuk, buah kotak. Bila dimakan cocor bebek rasanya agak asam dan dingin. Cocor bebek menjadi tanaman yang umum di daerah beriklim tropika seperti Asia, Australia, Selandia Baru, India Barat, Makaronesia, Maskarenes, Galapagos, Melanesia, Polinesia, and Hawaii. Di banyak daerah tersebut, seperti di Hawaii, tanaman ini dianggap

sebagai spesies yang invasif. Alasan utama penyebarannya yang besar adalah karena kepopuleran tanaman ini sebagai tanaman hias (id.wikipedia.org/wiki/Cocor_bebek).



Gambar 2.1 Daun *Bryophyllum pinnatum*

(<http://members.gardenweb.com/members/exch/adamsmom>)

B. pinnatum digunakan secara tradisional untuk pengobatan wasir, pusing, penurunan panas, batuk, dan peluruh air seni (Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI, 2000).

2.1.2 Kandungan Kimia dan Aktivitas Farmakologi

Kalanchoe kaya akan alkaloid, triterpen, glikosida, flavonoid, steroid, dan lipid. Daunnya mengandung sekelompok zat kimia yang disebut bufadienolida yang sangat aktif. Bufadienolida sangat mirip dalam struktur dan aktivitasnya seperti dua glikosida jantung lainnya, digoksin dan digitoxin (obat yang digunakan untuk gagal jantung) (www.rain-tree.com).

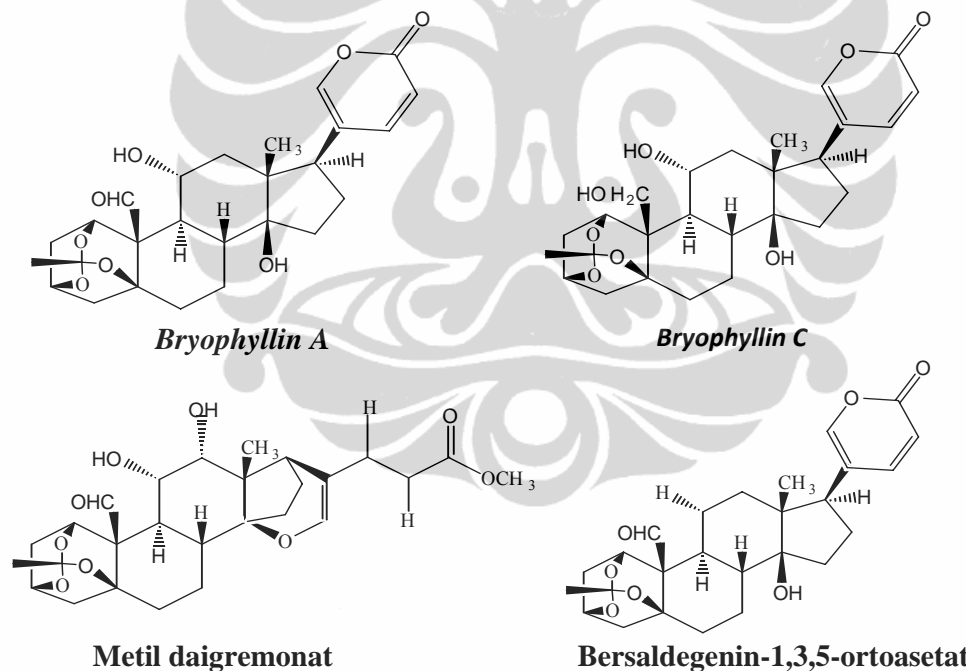
Kandungan utama yang ditemukan dalam Kalanchoe meliputi asam arakidat, astralagin, asam behenat, β -amirin, β -sitosterol, briofolenon, briofolon, briofilin, briofilin A-C, briofilol, briofinol, briotoksin C, bufadienolida, asam kafeat, kamfesterol, kardenolida, asam sinamat, klerosterol, klionasterol, kodisterol, asam kumarat, eikalokatekin, asam ferulat, friedelin, glutinol, hentriakonten, isofukosterol, kaemferol, asam oksalat, asam oksaloasetat, asam

Universitas Indonesia

palmitat, patuletin, peposterol, fosfofenolpiruvat, pseudotaraksasterol, asam prokatekat, steroid, stigmasterol, asam suksinat, asam siringat, tarakserol, dan triakontana (www.rain-tree.com).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap *B. pinnatum* antara lain:

- Selain *Bryophyllin A*, dari ekstrak metanol tumbuhan *B. pinnatum* juga telah diisolasi senyawa *Bryophyllin C* yang keduanya bersifat aktif insektisidal terhadap larva ulat sutera, sedangkan *Kalanchoe daigremontiana x tubiflora* diketahui mengandung empat senyawa aktif insektisidal, yaitu: metil daigremonat, bersaldegenin-1,3,5-ortoasetat, daigremontianin, dan *Bryophyllin A* (Supratman *et al.*, 2001). Struktur senyawa aktif tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.2.

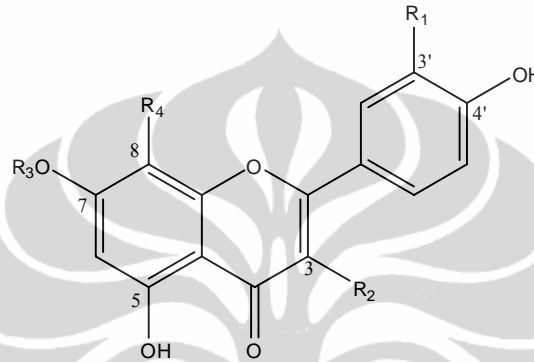


Gambar 2.2 Struktur beberapa senyawa aktif insektisidal dari marga *Kalanchoe* (Supratman *et al.*, 2001)

- Kuersitrin (kuersetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranosida merupakan salah satu kandungan senyawa biologi aktif yang diperoleh dari ekstrak air *B. pinnatum*, memperlihatkan aktivitas antileishmanial yang kuat (IC₅₀ sekitar 8 μ g/mL (Muzitano, M.F., *et al.*, 2006). Selain kuersitrin, Muzitano dkk berhasil

Universitas Indonesia

mengisolasi tiga flavonoid glikosida yang lain yang juga mempunyai aktivitas sebagai antileishmanial, yaitu kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), kuersetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida ($IC_{50} > 45 \mu\text{g/mL}$), dan 4',5-dihidroksi-3'-8-dimetoksiflavon-7-*O*- β -D-glukopiranosida ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Struktur tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.3 di bawah ini.



Flavonoid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	H	<i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida	H	H
2	OH	<i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida	H	H
3	OMe	H	β -D-glukopiranosida	OMe
kuersitrin	OH	α -L-ramnopiranosida	H	H

Gambar 2.3 Struktur dari kaempferol-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (1), kuersetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (2), 4',5-dihidroksi-3'-8-dimetoksiflavon-7-*O*- β -D-glukopiranosida (3), dan kuersitrin.

- Ekstrak air *B. pinnatum* juga mempunyai aktivitas sebagai antinosisseptif (analgesik), antiinflamasi, dan antidiabetes secara *in vivo* (Ojewole, J.A.O., 2005).
- Ekstrak etanol *B. pinnatum* mempunyai aktivitas sebagai hepatoprotektif baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo* (Yadav & Dixit, 2003).

2.2 Aktivitas Biologi Senyawa Kimia

Beberapa senyawa bahan alam yang telah diisolasi, dikarakterisasi dan dipublikasikan tanpa pernah diuji suatu bioaktivitasnya menyebabkan kegunaan senyawa aktif biologi tersebut tidak diketahui. Bila suatu tumbuhan diketahui aktif bersifat toksik pada dosis yang ditetapkan, kemungkinan untuk dikembangkan lebih lanjut secara pendekatan untuk mendeteksi awal zat aktif menggunakan bioassay sistem hewan yang sederhana dan efektif. Apabila senyawa diketahui aktif telah diisolasi maka bioassay yang lebih spesifik dan lebih canggih dapat digunakan (Triono, I K., 2010).

2.2.1 Uji aktivitas antidiabetes tumbuhan obat

Tumbuhan obat atau ekstraknya telah lama digunakan secara oral berdasarkan pengobatan tradisional untuk penyakit diabetes. Sementara itu, senyawa-senyawa hipoglikemik sintetik ternyata dapat menimbulkan efek samping yang serius dan juga tidak dapat digunakan selama kehamilan. Oleh karena itu, pencarian senyawa hipoglikemik yang lebih efektif dan aman secara berkelanjutan menjadi faktor penting penelitian (Suba, V., *et al.*, 2004).

Model *in vivo* terhadap hewan percobaan merupakan cara yang utama untuk mempelajari tanaman obat dengan aktivitas hipoglikemik. Tetapi metode *in vivo* mempunyai beberapa kelemahan yaitu memerlukan hewan percobaan yang banyak, jumlah zat uji harus banyak, isolasi dan purifikasi memerlukan waktu yang lama dan hasilnya sedikit. Oleh karena itu, digunakan metode *in vitro* yang mempunyai kelebihan antara lain: lebih spesifik karena dapat dipelajari mekanisme secara molekuler, subseluler dan seluler; pada tahap skrining, sejumlah besar senyawa dapat diuji aktivitas farmakologisnya; senyawa uji lebih sedikit; penggunaan lebih efisien; dan ratusan senyawa dapat diuji dengan suatu metode pengujian sekaligus (Rotshteyn & Zito, 2004).

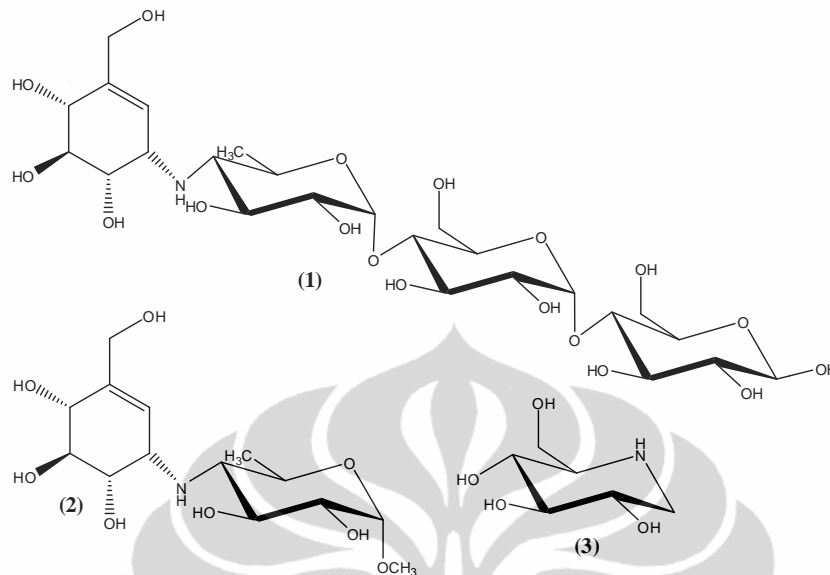
Meskipun begitu, aktivitas penghambatan secara *in vitro* tidak selalu berkorelasi dengan aktivitas *in vivo* untuk memberikan efek fisiologi, sehingga aktivitas *in vitro* perlu dilakukan konfirmasi dengan aktivitas *in vivo* melalui pemberian oral (Ohta, T., *et al.*, 2002). Metode farmakologi *in vitro* sering menjadi

pilihan untuk memperoleh hasil penapisan efek suatu bahan uji dengan cepat, tetapi metode *in vitro* tidak memperhitungkan nasib bahan uji tersebut di dalam tubuh yang hanya dapat jika dilakukan penapisan secara *in vivo* (Soemardji, 2004).

Salah satu metode uji aktivitas antidiabetes yaitu metode penghambatan enzim α -glukosidase. Akarbosa, voglibosa dan miglatol merupakan senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai inhibitor α -gukosidase di dalam saluran cerna sehingga dapat menurunkan kadar gula darah pascamakan. Akarbosa merupakan pseudo tetra sakarida dan maglitol merupakan analog heksosa yang dihasilkan dari mikroorganisme.

Akarbosa merupakan senyawa antidiabetes yang telah banyak diteliti dalam kelompoknya secara intensif dan yang paling luas penggunaannya. (Cheng & Josse, 2004). Penelitian secara acak pada penggunaan jangka lama akarbosa dapat memperbaiki kontrol glikemik tanpa penambahan berat badan pada 50% pasien diabetes tipe 2, hal ini tidak dapat dicapai bila pengobatan dilakukan hanya dengan diet atau diet yang dikombinasikan dengan metformin, sulfonilurea atau insulin (Johnston *et al.*, 1998) tetapi telah dilaporkan juga bahwa inhibitor α -glukosidase sintetik dapat mengakibatkan efek samping seperti kembung, diare dan kejang perut, bahkan dapat meningkatkan resiko timbulnya tumor ginjal, kerusakan hati yang serius dan hepatitis akut (Cheng *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 1998).

Sumber baru inhibitor α -glukosidase alami sebagai alternatif baru dan untuk mengurangi efek samping yang timbul telah banyak diteliti terutama dari tanaman dan mikroorganisme. Beberapa tanaman herbal dilaporkan mempunyai aktivitas sebagai inhibitor α -glukosidase baik secara *in vitro*, *in vivo* bahkan klinis.

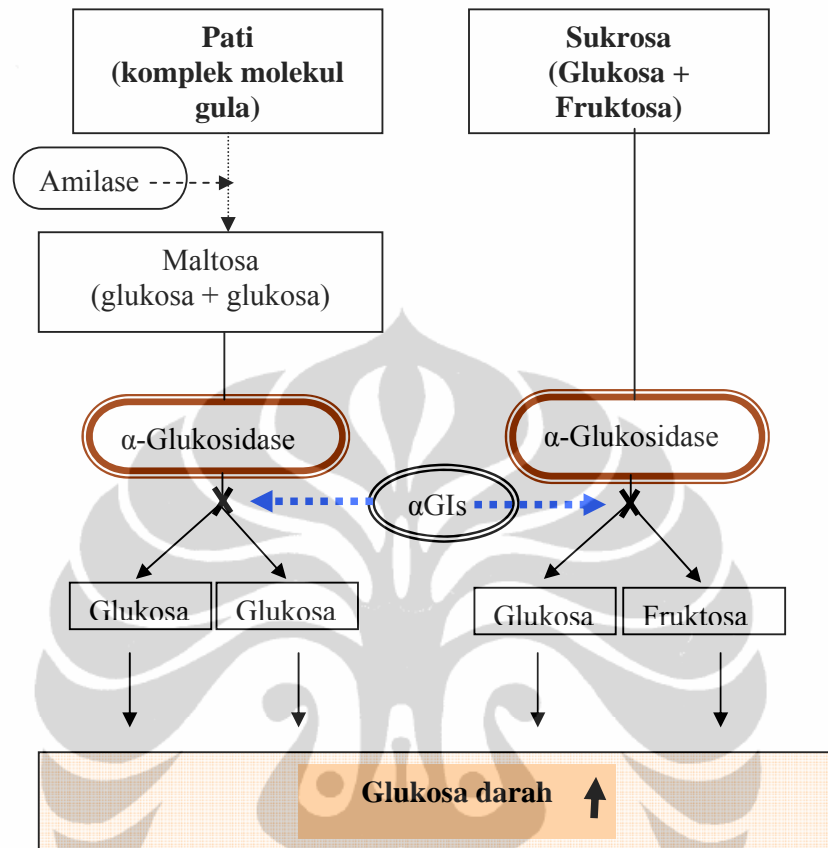


Gambar 2.4 Beberapa struktur inhibitor α -glukosidase. (1) akarbosa, (2) metil α,β -acarviosinida, (3) 1-deoksinojirimisin.

2.2.1.1 Mekanisme Kerja Inhibitor α -Glukosidase

Tahap awal dalam proses metabolisme karbohidrat adalah merubah karbohidrat kompleks dari makanan menjadi bentuk polimer oligosakarida yang lebih sederhana, mudah larut dan dapat diangkut melalui dinding usus dan dapat dibawa ke jaringan. Pemecahan polimer gula dimulai didalam mulut melalui kerja enzim α -amilase yang terdapat dalam saliva. Enzim ini melepaskan ikatan α -1,4 sehingga terbentuk karbohidrat sederhana (oligosakarida) dan karbohidrat yang kompleks (dekstran) (Cheng & Josse, 2004; Christopher & Van Holde, 1980). Proses ini diperlihatkan pada Gambar 2.5.

Kerja amilase menjadi inaktif pada pH yang lebih asam, seperti halnya lambung. Setelah masuk kedalam usus, pemecahan karbohidrat dilanjutkan untuk memecah karbohidrat kompleks menjadi oligosakarida dan dekstran melalui kerja α -amilase pankreas. Oligosakarida dan disakarida tidak dapat diserap oleh mukosa usus halus, dan hanya monosakarida yang dapat diabsorpsi oleh karena itu diperlukan enzim khusus yang dapat memecah disakarida menjadi monosakarida (Christopher & Van Holde, 1980).



Gambar 2.5 Mekanisme kerja inhibitor α -glukosidase (<http://www.nipponsapuri.com>)

Enzim α -glukosidase yang terdapat dalam usus halus akan memecah disakarida menjadi monosakarida. Proses tersebut berlangsung cepat umumnya karbohidrat dicerna dan diserap di bagian atas jejunum dan sedikit bagian yang mencapai distal jejunum atau ileum. Hasil akhir dari pemecahan karbohidrat berbentuk monosakarida yang diangkut melewati dinding usus, selanjutnya diserap dan masuk ke dalam aliran darah dan jaringan lain. Kondisi ini akan merangsang kelenjar pankreas untuk mengeluarkan hormon insulin yang berfungsi untuk menstimulasi pemasukan glukosa ke dalam sel untuk digunakan sebagai sumber energi dan membantu penyimpanan glikogen di dalam sel otot dan hati (Christopher & Van Holde, 1980; <http://www.smallcrab.com>).

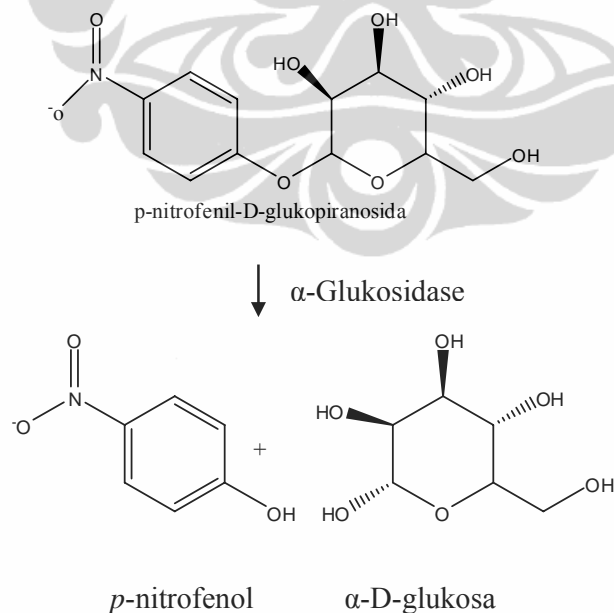
Penyerapan karbohidrat dapat diperlambat dengan adanya pengontrol glikemik yang disebut inhibitor α -glukosidase (α -GIs). Fungsi utama senyawa α -

GIs adalah memperlambat peningkatan kadar gula darah pascamakan dan kadar gula total.

Senyawa penghambat α -glukosidase secara kompetitif terikat pada sisi ikatan karbohidrat pada enzim α -Glukosidase, dengan demikian berkompetisi dengan oligosakarida dan mencegah pemecahan monosakarida yang dapat diabsorpsi. Karbohidrat yang tidak tercerna dapat masuk ke usus besar dan dimetabolisme oleh bakteri menjadi asam lemak rantai pendek (seperti asetat, butirat dan propionat) dan produk samping lainnya, termasuk gas seperti metana dan hidrogen (Cheng *et al.*, 2004).

2.2.1.2 Mekanisme Pengujian Inhibisi Aktivitas α -Glukosidase

Mekanisme reaksi α -glukosidase adalah dengan mengkatalisis reaksi pemecahan substrat menjadi *p*-nitrofenol dan glukosa. Substrat yang digunakan adalah *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, pada suhu 37°C. Aktivitas enzim ini diukur berdasarkan serapan *p*-nitrofenol yang dihasilkan. Jika sampel memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -glukosidase maka *p*-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang (Artanti, N., dkk, 2002).



Gambar 2.6. Mekanisme reaksi penguraian substrat *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida.

Metode enzimatik *in vitro* untuk pengujian kemampuan aktivitas α -glukosidase merupakan alternatif yang lebih murah dan cepat untuk skrining awal, dan kemudian hanya ekstrak yang benar-benar berpotensi diuji dengan metode *in vivo* pada hewan coba.

2.2.2 Toksisitas terhadap Larva Udang (*Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*)

Suatu cara yang cepat dan murah dalam bioassay untuk skrining dan fraksionasi fisiologi aktif dari ekstrak tanaman, Meyer, *et al.*, 1982 telah melakukan penelitian menggunakan hewan yang sangat kecil berkulit tebal yaitu udang laut (*brine shrimp*) sebagai bahan uji bioassay secara umum. Telur udang *Artemia salina* Leach dapat diperoleh dengan mudah dan murah di toko hewan peliharaan. Bila ditempatkan di air laut maka telur akan menetas dalam waktu 48 jam menjadi larva. Larva tersebut dapat segera digunakan untuk bermacam-macam sistem bioassay. Aplikasi yang pernah digunakan adalah untuk analisis residu pestisida, mikotoksin, polusi sungai, anestetik, toksindinoflagelat, uji sejenis morfin, dan senyawa-senyawa toksin dalam lingkungan laut.

Cara uji *Brine shrimp* ini cukup sederhana untuk ekstrak kasar, fraksi atau senyawa-senyawa murni dibuat konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) pada alat uji yang mengandung 100 μL air laut (vial yang mengandung 5 mL air laut) dan 10 ekor udang dengan 3 kali pengulangan. Setelah 24 jam diamati jumlah kematian, kemudian dihitung dengan cara regresi linier atau dimasukkan dalam program untuk menentukan LC_{50} dengan batas/ limit kepercayaan 95 %. Toksisitas suatu senyawa cukup berarti bila $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$.

Bioassay *brine shrimp* sangat menguntungkan karena cepat hanya 24 jam, murah, sederhana karena tidak memerlukan tehnik-tehnik aseptik, mudah dilakukan untuk pengujian dalam jumlah banyak dan tidak perlu peralatan khusus. Sejumlah penelitian juga banyak menggunakan bioassay *brine shrimp* untuk skrining ekstrak tanaman (Krishnaraju, A.V., *et al.*, 2006).

2.2.3 Antioksidan

Banyak definisi telah diberikan untuk menggambarkan “ Antioksidan”. Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, mencegah dan memperlambat proses oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah. Arti khusus antioksidan adalah zat yang dapat mencegah atau menunda terjadinya reaksi oksidasi oleh radikal bebas dalam oksidasi lipid (Kochhar dan Rossell, 1990).

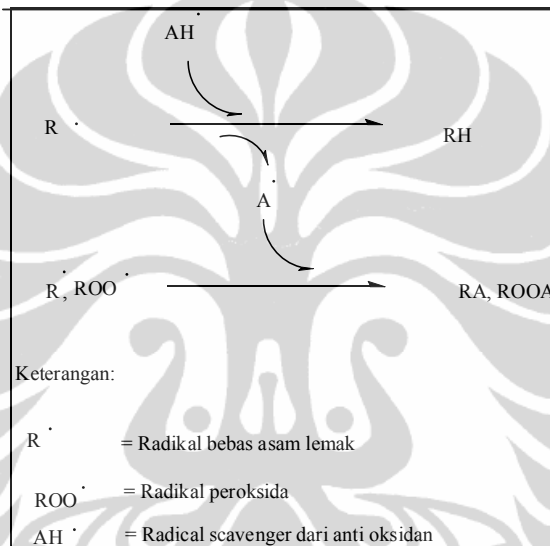
Antioksidan sangat banyak jenisnya, berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alam). Menurut Hudson (1990), senyawa antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarat, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional, sedangkan antioksidan sintetis yang cukup dikenal adalah BHA (*butylated hydroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*).

Pada dasarnya, senyawa antioksidan menghambat proses oksidasi suatu zat dengan cara bereaksi dengan zat pengoksidasi (seperti radikal peroksida dan hidroksi) membentuk senyawa hasil oksidasi yang lebih stabil daripada zat yang dilindunginya. Senyawa fenolik melindungi suatu zat dari oksidasi dengan cara bereaksi dengan zat pengoksidasi membentuk radikal fenolik yang stabil, dimana radikal yang terbentuk distabilkan dengan delokalisasi elektron pada cincin benzen.

Antioksidan dalam menghambat jalannya reaksi oksidasi dapat melalui beberapa mekanisme, yaitu mekanisme donor proton, *radical scavenger*, *oxygen quencher*, inhibisi dengan enzim dan *synergist*.

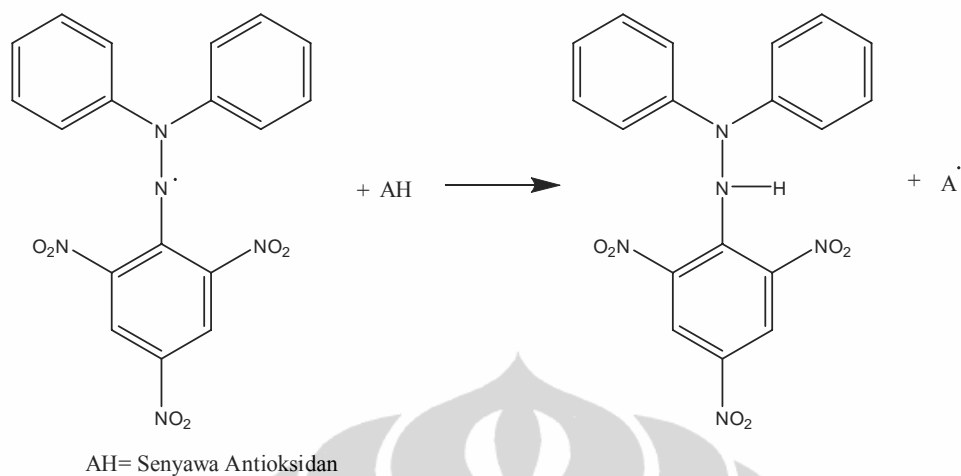
Mekanisme reaksi *radical scavenger* dapat dilihat pada Gambar 2.7. Pada mekanisme *radical scavenger*, asam lemak jika diberi inisiator, misalnya cahaya, panas, enzim atau logam berat, maka akan terjadi tahap reaksi inisiasi membentuk radikal bebas (R), selanjutnya radikal bebas ini akan bereaksi dengan oksigen (O₂) membentuk radikal peroksida (ROO) yang sangat reaktif. Radikal-radikal yang

terbentuk dapat dideaktifkan dengan jalan mengikatnya dengan senyawa yang dikenal sebagai *radical scavenger*. Pada tahap permulaan, *radical scavenger* akan memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas, sehingga dapat menghambat pembentukan radikal peroksida. Penghilangan radikal dengan memberikan senyawa yang merupakan *radical scavenger* akan memutuskan rantai reaksi. Radikal antioksidan yang terbentuk bersifat stabil dan dapat bergabung langsung dengan radikal lain untuk membentuk senyawa yang inert.



Gambar 2.7 Mekanisme reaksi *Radical Scavenger*

Salah satu metode *radical scavenger* yang sering digunakan dalam pengujian bahan alam adalah dengan menggunakan larutan DPPH (1,1-difenil-2-hidrazil) dalam metanol. Mekanisme reaksi yang terjadi antara antioksidan dengan DPPH ditunjukkan pada reaksi berikut:



Gambar 2.8 Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan

Peredaman warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin).

2.2.4 *Murine Leukemia* P-388

Murine Leukemia P-388 merupakan salah satu jenis sel kanker leukemia yang sering digunakan dalam uji sitotoksitas untuk mengetahui aktivitas suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Sel kanker ini dikembangkan dari sel tikus yang dikenai agen leukemia. Pengujian senyawa terhadap P-388 antara lain digunakan pada senyawa viniverin dan vitikanol A yang menunjukkan IC_{50} masing-masing 7,8 $\mu\text{g/mL}$ dan 27,0 $\mu\text{g/mL}$ (Juliawati, 2005), dan bergenin yang menunjukkan $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ (Hakim, 2003).

Metode MTT adalah suatu uji laboratorium dan merupakan suatu metode standar berdasarkan kolorimetri (satu metode yang berdasarkan pengukuran perubahan warna) karena mengukur perkembangbiakan selular (pertumbuhan sel). Metode ini dapat juga digunakan untuk menentukan sitotoksitas dari zat-zat yang berpotensi sebagai obat dan bahan-bahan yang bersifat toksik lainnya.

MTT (3-[4,5-dimetiliazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromida) berwarna kuning direduksi menjadi formazan yang berwarna ungu di dalam mitokondria sel yang hidup. Suatu pelarut (biasanya digunakan dimetil sulfoksida, etanol yang diasamkan, atau suatu natrium dodesil sulfat yang dilarutkan dalam asam

hidroklorida) ditambahkan untuk melarutkan produk formazan (ungu) yang tidak larut menjadi larutan yang berwarna. Absorbansi dari larutan yang diwarnai ini dapat diketahui dengan pengukuran pada suatu panjang gelombang tertentu (biasanya antara 500 dan 700 nm) menggunakan spektrofotometer. Reduksi ini hanya dapat berlangsung jika enzim reduktase pada mitokondria aktif, dan oleh karena itu konversi ini secara langsung dapat dihubungkan dengan banyaknya sel yang hidup (*viability cell*). Ketika jumlah formazan (ungu) yang dihasilkan oleh sel yang dikenai / diperlakukan (*treated*) dengan satu zat uji dibandingkan dengan jumlah dari formazan yang dihasilkan oleh sel (kontrol) yang tidak mengalami perlakuan, maka efektivitas / kemampuan dari zat uji dalam menyebabkan kematian dari sel dapat ditentukan, yaitu melalui hubungan jumlah formazan yang dihasilkan dari suatu kurva hubungan dosis (konsentrasi) vs respon / intensitas warna (absorbansi). Absorbansi maksimum tergantung pada pelarut yang digunakan (Adinata, E., 2007).

Metode MTT (3-[4,5-dimetiliazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromida) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk uji sitotoksisitas suatu sampel terhadap sel kanker yang didasarkan atas pengukuran intensitas warna yang terjadi sebagai hasil metabolisme suatu substrat oleh sel hidup yang mampu merubah warna MTT. Garam MTT dalam media akan terlibat dalam kerja enzim dehidrogenase. MTT akan direduksi oleh sistem reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat di dalam mitokondria aktif menjadi formazan. Formazan merupakan zat warna ungu yang tidak larut dalam air, sehingga dilarutkan menggunakan SDS (*sodium dodecyl sulfate*). Intensitas warna ungu berkorelasi secara langsung dengan sejumlah sel yang aktif melakukan metabolisme, dengan demikian berkorelasi langsung dengan viabilitas sel (Adinata, E., 2007).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Juni 2010 sampai dengan Mei 2011 di Laboratorium Bahan Alam Pangan dan Farmasi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Puspiptek Serpong dan uji sitotoksik terhadap sel kanker *Murine Leukemia* P-388 di Laboratorium Kimia Organik, Institut Teknologi Bandung (ITB).

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang dipakai adalah alat-alat gelas kimia yang biasa digunakan di laboratorium, alat maserasi, corong pisah, botol 100 mL, botol kecil 5 mL (vial), neraca teknis Mettler Pc 2000, neraca analitik Mettler Toledo AB 204, vacuum evaporator Buchii, kolom kromatografi, inkubator, lampu UV Shimadzu λ 254 nm dan λ 366 nm, *hot plate*, *eppendorf*, tabung reaksi, Lampu 14 W, spektrofotometer UV/Vis Hitachi U-2000, spektrofotometer FT-IR Shimadzu IR Prestige-21, spektrometer LC-MS Mariner Biospectrometry, dan spektrometer FT-NMR JEOL JNM ECA 500.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun cocor bebek (*B. pinnatum*), pelarut organik (*n*-heksana teknis, etil asetat teknis, metanol teknis, kloroform p.a, DMSO (*dimethyl sulfoxide*), H₂SO₄ 10 % dalam metanol, lempeng silika gel G₆₀, silika gel 60 G, silika gel 60 mesh 0,040-0,063 mm.

Bahan yang digunakan untuk uji penghambatan enzim α -glukosidase yaitu sampel uji, enzim α -glukosidase, *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranoside, buffer fosfat, Na₂CO₃, air suling, DMSO, dan kuersetin. Untuk uji antioksidan, bahan yang digunakan yaitu sampel uji, 1,1-difenil-2-hidrazil (DPPH), metanol, dan kuersetin. Untuk uji BSLT, bahan yang digunakan yaitu sampel uji, telur udang, air laut, dan DMSO. Untuk uji sitotoksik (antikanker *Murine leukemia* P-388), bahan yang digunakan yaitu sampel uji, kultur sel *Murine leukemia* P-388, DMSO, media RPMI 1640, FBS (*fetal bovine serum*), PBS (*phosphoric buffer*

solution pH 7,30-7,65), MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida], dan SDS (*sodium dodecyl sulfate*).

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Pengumpulan dan Pengidentifikasian Sampel

Sampel daun segar diperoleh dari Ballitro (Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik). Identifikasi/determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi - LIPI Bogor (Lampiran 1).

3.3.2 Isolasi Daun Cocor Bebek (*Bryophyllum pinnatum*)

Sebanyak 10 kg daun segar *B. pinnatum* dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C selama 2 X 24 jam dan diperoleh daun kering *B. pinnatum* sebanyak 1,7 kg. Daun kering *B. pinnatum* diekstraksi dengan pelarut metanol dengan cara maserasi selama 3 X 24 jam sekali-sekali diaduk dengan menggunakan pelarut 3 X 20 L, kemudian disaring. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40° C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 186,7 g.

Sebanyak 100 g ekstrak metanol selanjutnya dipartisi (fraksinasi) menggunakan *n*-heksana-air (1:1) diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi air ini selanjutnya dipartisi kembali dengan etil asetat - air (1:1) dan diperoleh fraksi air dan etil asetat.

Terhadap 4,0 g fraksi etil asetat dilakukan pemisahan lebih lanjut menggunakan teknik kromatografi kolom cepat menggunakan fase diam silika gel 60 G dan fase gerak dengan elusi bergradien yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan metanol dengan berbagai perbandingan konsentrasi dari *n*-heksana 100% sampai etil asetat 100% kemudian dilanjutkan dengan etil asetat 100% sampai metanol 100%. Fraksi-fraksi yang diperoleh ditampung sebanyak 100 mL dalam botol kaca, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40° C. Seluruh fraksi yang diperoleh diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan kemiripan noda yang timbul pada lempeng diamati, baik secara langsung

Universitas Indonesia

maupun di bawah sinar ultra lembayung pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm serta penyemprotan dengan pereaksi H₂SO₄ 10% dalam metanol yang kemudian dipanaskan di atas pelat panas (*hot plate*). Warna dan nilai R_f (waktu retensi) dari noda yang terbentuk diamati. Fraksi-fraksi yang mempunyai kemiripan noda digabungkan, selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 40°C sampai bobot tetap, kemudian ditimbang, dan diperoleh 9 fraksi. Selanjutnya terhadap fraksi 7 (0,6546 g) dan 9 (1,238 g) dilakukan pemisahan lebih lanjut dikarenakan diperoleh fraksi yang lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain dan mempunyai pola noda yang dominan dari fraksi lainnya.

Fraksi 7 sebanyak 0,5 g dipisahkan menggunakan kromatografi kolom gravitasi menggunakan fasa diam silika gel 60 mesh 0,040-0,063 mm dengan fasa gerak sistem gradien yaitu *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan konsentrasi mulai *n*-heksana 100% sampai etil asetat 100%. Fraksi-fraksi yang diperoleh ditampung dalam botol kaca (±50 mL) dan diperoleh 89 fraksi, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40° C. Seluruh fraksi yang diperoleh diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), dan kemiripan noda yang timbul pada lempeng diamati, baik secara langsung maupun di bawah sinar ultra lembayung pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm serta penyemprotan dengan pereaksi H₂SO₄ 10% dalam metanol yang kemudian dipanaskan di atas pelat panas (*hot plate*). Warna dan nilai R_f (waktu retensi) dari noda yang terbentuk diamati. Fraksi-fraksi yang mempunyai kemiripan noda digabungkan, selanjutnya dikeringkan dalam oven suhu 40°C sampai bobot tetap, kemudian ditimbang, dan diperoleh 5 fraksi. Fraksi 5 (isolat A) memperlihatkan adanya kristal kuning dan dari hasil KLT terdapat satu spot tunggal. Selanjutnya isolat A diidentifikasi lebih lanjut menggunakan spektroskopi UV/Vis, FT-IR, LC-MS dan FT-NMR.

Sebanyak 50 mg fraksi 9 dilakukan kristalisasi menggunakan metanol-kloroform dan diperoleh filtrat dan residu. Filtrat dan residu yang diperoleh di kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen etil asetat-metanol (8:2). Dari

hasil KLT, filtrat menunjukkan satu spot berwarna kuning coklat setelah penyemprotan dengan H₂SO₄ 10% dalam metanol yang selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar dan diperoleh isolat yang berwarna kuning berbentuk pasta (isolat B). Isolat B selanjutnya diidentifikasi untuk mengetahui struktur molekulnya dengan menggunakan spektroskopi UV/Vis, FT-IR, LC-MS dan FT-NMR.

3.3.3 Elusidasi Senyawa Murni

3.3.3.1 Pengukuran Spektroskopi UV-Visibel

Pengukuran spektroskopi ultra violet-visibel dilakukan dengan melarutkan 1 mg senyawa uji dalam 10 mL pelarut metanol sehingga terbentuk larutan yang homogen. Larutan tersebut ditentukan panjang gelombangnya pada daerah 200 - 400 nm. Panjang gelombang dari absorbansi maksimum adalah nilai karakteristik suatu serapan oleh senyawa sampel dinyatakan sebagai λ_{\max} .

3.3.3.2 Pengukuran Spektroskopi inframerah (FT-IR)

Sebanyak 1 mg senyawa uji digerus dengan 50 mg KBr dalam mortal sampai homogen selanjutnya diletakkan dalam cetakan pelet, pelet KBr diukur pada rentang bilangan gelombang 4000-660 cm⁻¹.

3.3.3.3 Pengukuran Spektroskopi LC-MS

Satu mg senyawa uji dilarutkan dalam metanol 98 %, kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μ L kedalam LC- MS Mariner Biospectrometry (Hitachi L 6200, Asquire 3000 plus-01073, Shimadzu) Sistem ESI (Electrospray Ionisation) model ion positif, kolom C 18 (RP 18) superco, panjang kolom 150 mm, diameter dalam kolom 2 mm, ukuran partikel 5 μ m dengan kecepatan alir diatur 1 mL/ menit, dengan rentang waktu selama 30 menit. Hasil pengukuran disajikan dalam bentuk grafik LC dan MS.

3.3.3.4 Pengukuran Spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)

Sebanyak ± 10 mg senyawa uji dilarutkan dalam 0,6 -0,75 mL pelarut deuterium sampai kira-kira setinggi 4 cm. Selanjutnya dimasukkan ke dalam *tube* dan dilakukan pengukuran terhadap sampel. Frekuensi yang dipergunakan 500 MHz untuk $^1\text{H-NMR}$ dan 125 MHz untuk $^{13}\text{C-NMR}$.

3.3.4 Uji Aktivitas Biologi

Senyawa hasil isolasi diuji aktivitas biologinya, yaitu: aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase *in vitro*, toksisitas, antioksidan dan anti kanker.

3.3.4.1 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -glukosidase *In vitro* (Lee & Lee, 2001)

Uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan dengan sebagai berikut:

a. Persiapan pereaksi

Buffer fosfat pH 7,0

Sebanyak 6,95 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 500 mL air suling (Larutan A). Sebanyak 17,925 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 500 mL air suling (Larutan B). Sebanyak 39 mL larutan A diambil, selanjutnya ditambah 61 mL larutan B, kemudian diencerkan dengan air suling sampai 200 mL.

p-nitrofenil α -D-glukopiranosida

Sebanyak 301,0 mg *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 50 mL buffer fosfat pH 7,0.

Enzim α -glukosidase

Sebanyak 1,0 mg enzim α -glukosidase ditimbang, kemudian ditambah dengan 100 mg *bovine serum albumin*, selanjutnya dilarutkan dalam 10 mL bufer fosfat pH 7,0. Sebanyak 1,0 mL larutan dipipet, kemudian dilarutkan dalam 14 mL buffer fosfat pH 7,0.

Na₂CO₃ 0,2 M

Sebanyak 2,12 g natrium karbonat ditimbang secara seksama, kemudian dilarutkan dalam 100 mL air suling.

b. Persiapan larutan uji

Sebanyak \pm 4,0 mg sampel uji ditimbang secara seksama, dilarutkan dalam 100 μ L DMSO, kemudian dilakukan pengenceran secara bertingkat yaitu masing-masing konsentrasi menjadi setengahnya, yaitu dari larutan awal diambil 50 μ L kemudian ditambahkan 50 μ L DMSO sehingga diperoleh 4 tingkatan konsentrasi larutan uji. Kemudian terhadap seluruh konsentrasi larutan uji dilakukan pengujian baik dengan penambahan atau tanpa penambahan larutan enzim dengan tahap-tahap sebagai berikut:

Dengan penambahan larutan enzim

Sebanyak 5 μ L diambil dari masing-masing konsentrasi larutan uji, ditambahkan 250 μ L larutan p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida, kemudian ditambahkan 450 μ L larutan buffer fosfat pH 7,0, larutan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit dalam penangas air, selanjutnya ditambahkan 250 μ L larutan enzim α -glukosidase. Campuran larutan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit dalam penangas air. Setelah inkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan 1000 μ L larutan Na₂CO₃ 0,2 M. Kemudian jumlah p-nitrofenol yang dibebaskan diukur dengan spektrofotometri UV/Vis

pada λ 400 nm. Tingkatan konsentrasi akhir yang diperoleh adalah 100, 50, 25, 12,5 dan 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

Tanpa penambahan larutan enzim

Pengujian dilakukan dengan tahap-tahap yang sama pada pengujian dengan penambahan larutan enzim, tetapi penambahan 250 μL larutan enzim α -glukosidase diganti dengan 250 μL larutan buffer fosfat pH 7,0. Pengujian ini dilakukan untuk koreksi nilai absorbansi pada saat pengukuran absorbansi pada spektrofotometer UV/Vis.

c. Larutan kontrol positif

Sebanyak 2,0 mg kuersetin dilarutkan dalam 100 μL DMSO, kemudian dilakukan pengenceran secara bertingkat yaitu masing-masing konsentrasi menjadi setengahnya sehingga diperoleh 7 variasi konsentrasi larutan kontrol positif. Kemudian terhadap seluruh konsentrasi larutan kontrol positif dilakukan pengujian baik dengan penambahan atau tanpa penambahan larutan enzim dengan seperti pada tahap sebelumnya dengan konsentrasi larutan akhir yang diperoleh adalah 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 dan 0,39 $\mu\text{g/mL}$.

d. Larutan kontrol negatif

Pengujian terhadap larutan kontrol negatif dilakukan dengan tahap-tahap yang sama seperti pada pengujian terhadap larutan uji tetapi tanpa penambahan larutan uji yaitu diganti dengan 5 μL DMSO.

e. Penghitungan aktivitas penghambatan

Aktivitas penghambatan dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas } \textit{penghambatan} (\%) = \frac{(K - S)}{K} \times 100\%$$

K = Absorbansi larutan kontrol negatif

S = Absorbansi larutan uji atau larutan kontrol positif

3.3.4.2 Uji toksisitas terhadap *Brine Shrimp*

Pengujian sifat toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethal Test*) melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. Penetasan Larva Udang

Kira-kira 50 mg telur udang ditetaskan di dalam tempat persegi panjang (10 X 20 cm) yang dilengkapi pembatas berlubang 2 mm dan sudah diisi air laut, ditutup dengan kertas aluminium pada bagian yang ada telurnya, biarkan selama 48 jam di bawah sinar lampu 14 Watt, maka telur akan menetas kemudian diambil larva-larva udang yang akan diuji dengan pipet dari sisi yang terang.

2. Persiapan Larutan yang akan Diuji

Ekstrak dan senyawa murni yang akan diuji dibuat konsentrasi 1000, 500, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dalam air laut, apabila sampel tidak larut tambahkan 2 tetes DMSO (Dimetil sulfoksida).

3. Uji Toksisitas Metode Meyer

Larva udang yang hidup sebanyak 10-15 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 μL air laut, tambahkan larutan contoh yang akan diuji masing-masing 10, 100, 500 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan dengan tidak menambahkan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam, selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati dan yang masih hidup. Kemudian dihitung tingkat kematiannya atau mortalitas dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah larva udang.

Dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai LC_{50} didapat dengan cara menarik garis pada nilai 50 % dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik, perpotongan garis ditarik ke garis konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50 % larva yang disebut LC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$. (Meyer, 1982).

3.3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Langkah – langkah pengujian aktivitas antioksidan meliputi: Pembuatan larutan DPPH 0,5 mM, menimbang dengan teliti 3,9 mg DPPH (Mr : 394,32), kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL metanol p.a. Larutan disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat larutan baru.

Persiapan larutan dan uji aktivitas antioksidan, ditimbang sebanyak 4 mg sampel kemudian dilarutkan dalam 4 mL metanol (1000 µg/mL). Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL dan 15 µg/mL, dengan cara memipet 2,5 µL, 12,5 µL, 25 µL dan 37,5 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi, kemudian masing – masing ditambahkan 500 µL larutan DPPH 0,5 mM dan diencerkan dengan metanol sampai 2,5 mL. Sebagai standar dipergunakan kuersetin dengan konsentrasi yang sama dengan sampel. Absorbansi DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm, setelah diinkubasi sampai dengan 30 menit, pada suhu 37°C. Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan konsentrasi sampel. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel tersebut dinyatakan dengan persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut :

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

Keterangan : Abs_{kontrol} = Absorbansi kontrol setelah 30 menit

Abs_{sampel} = Absorbansi sampel setelah 30 menit

Selanjutnya nilai hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan linier dengan konsentrasi (µg/mL) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu Y). Nilai IC₅₀ dari perhitungan artinya pada saat persentase inhibisi sebesar 50 %.

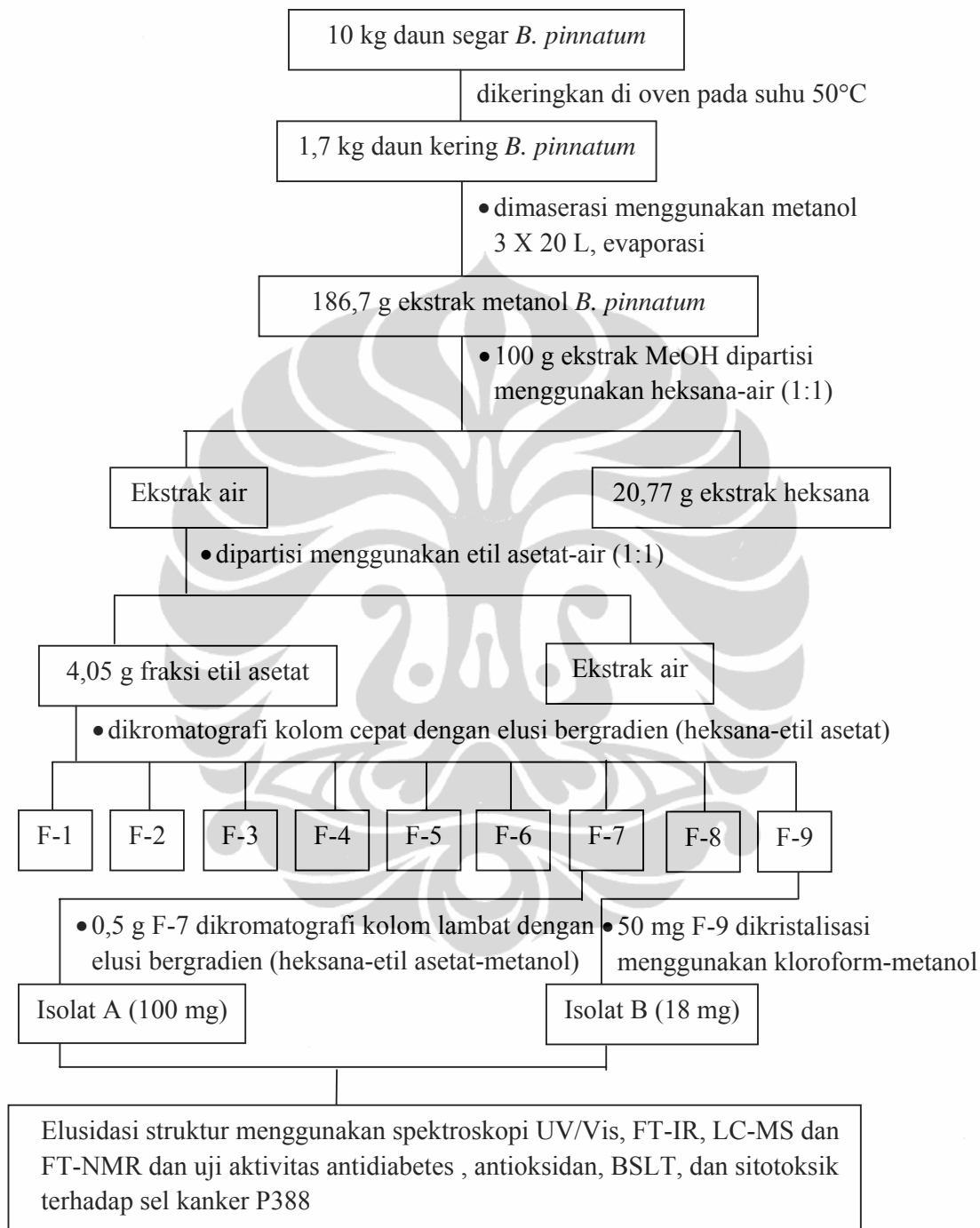
3.3.4.4 Uji Antikanker *Murine leukemia* P-388

Uji antikanker dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Institut Teknologi Bandung (ITB). Sel kanker *Murine leukemia* P-388 dengan pertumbuhan pada fase logaritma, dilarutkan dalam tabung kultur dengan jumlah sel sekitar 3×10^3 sel/mL dalam media RPMI 1640. Sel diinokulasikan dalam microplate 96 lubang dasar rata dan dikultivasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam untuk menumbuhkan sel.

Selanjutnya dilakukan penambahan sampel yang dilarutkan dalam pelarut DMSO. Sampel diencerkan dengan menambahkan larutan buffer fosfat (PBS) pH (7,30–7,65). Sampel dengan konsentrasi yang beragam ditambahkan ke dalam sel dalam microplate lalu dikocok dengan microplate mixer dan disimpan kembali dalam inkubator CO₂. Sebagai kontrol negatif digunakan larutan PBS dan kontrol positif digunakan larutan PBS dan DMSO. Sel diinkubasi selama 48 jam, kemudian ditambahkan reagen MTT [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida] dan dikocok menggunakan microplate mixer. Inkubasi dilanjutkan selama 4 jam, kemudian ditambahkan stop solution (SDS) dan dikocok dengan baik tanpa meninggalkan busa yang mengganggu dalam pengamatan. Inkubasi dilanjutkan kembali selama 24 jam.

Pengukuran rapatan optis / *optical density* (OD) dilakukan dengan menggunakan *microplate reader*, 24 jam setelah penambahan SDS. Nilai IC₅₀ ditentukan dari kurva grafik hubungan antara konsentrasi senyawa bahan uji ($\mu\text{g/mL}$) dan rapatan optis setelah perlakuan dengan bahan uji. IC₅₀ merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk penghambatan pertumbuhan sel sebesar 50% (Alley *et al*, 1988).

3.4 Bagan Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Pelaksanaan Penelitian

BAB 4

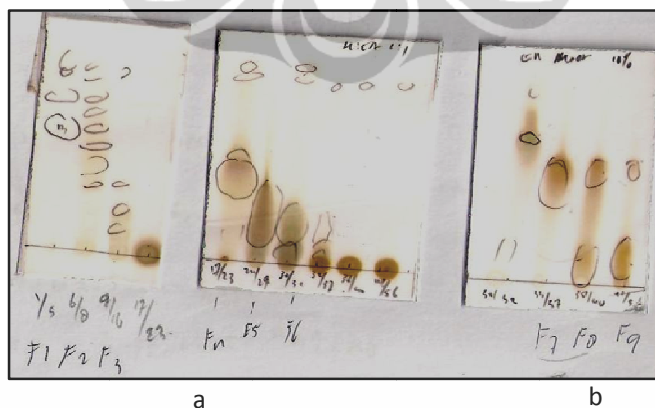
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil isolasi dan pemurnian senyawa dari fraksi etil asetat daun *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken

Pengeringan daun *B. pinnatum* dari 10 kg daun segar diperoleh daun kering sebanyak 1,7 kg dengan rendemen 17%. Rendemen yang kecil ini disebabkan tanaman *B. pinnatum* merupakan tanaman sukulen, artinya tanaman tersebut kandungan air yang cukup banyak sekitar 80-90% sehingga diperlukan bahan yang cukup banyak. Proses pengeringan material bahan dilakukan menggunakan oven blower pada suhu 50°C selama 2 X 24 jam.

Maserasi 1,7 kg daun kering *B. pinnatum* dengan metanol menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 186,7 gram (rendemen 10,98 %). Maserasi dilakukan menggunakan metanol agar senyawa yang terkandung di dalam daun *B. pinnatum* dapat tersari seluruhnya.

Ekstrak metanol sebanyak 100 g dilakukan fraksinasi berturut-turut dengan *n*-heksana-air (1:1) dan etil asetat-air (1:1). Fraksi etil asetat sebanyak 4 g selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom cepat dengan eluen *n*-heksana-etil asetat-metanol yang derajat kepolarannya dinaikkan secara gradien (Tabel 4.1) dan diperoleh 9 fraksi gabungan setelah di Kromatografi Lapis Tipis (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Kromatogram fraksi 1 s/d 9 hasil pemisahan kromatografi kolom cepat dari fraksi etil asetat daun *B. pinnatum* pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (1:1) (a) dan etil asetat:metanol (9:1) (b)

Tabel 4.1 Data perbandingan eluen pada kromatografi kolom cepat dari fraksi etil asetat dari daun *B. pinnatum* serta fraksi gabungan yang diperoleh

Fraksi	Perbandingan eluen			Fraksi gabungan	
	<i>n</i> -heksana	Etil asetat	Metanol	Fraksi	Berat (g)
1	100	0	0	1	0,0022
2	90	10	0		
3	80	20	0		
4	70	30	0	2	0,0107
5	60	40	0		
6	50	50	0	3	0,0892
7	40	60	0		
8	30	70	0	4	0,0737
9	20	80	0		
10	10	90	0	5	0,2745
11	0	100	0		
12	0	90	10	6	0,2745
13	0	80	20		
14	0	70	30		
15	0	60	40	7	0,6546
16	0	50	50		
17	0	40	60		
18	0	30	70		
19	0	20	80	8	0,3902
20	0	10	90		
21	0	0	100		
				9	1,238

Fraksi 7 dan 9 hasil gabungan kromatografi kolom cepat mempunyai rendemen yang lebih banyak dibandingkan fraksi gabungan lainnya sehingga dimurnikan lebih lanjut.

Hasil kromatografi kolom lambat dari fraksi 7 (0,5 g) diperoleh 5 fraksi gabungan setelah di KLT (Gambar 4.2). Dari hasil KLT, fraksi 5 hasil gabungan ini mempunyai spot tunggal yang dominan berwarna kuning coklat pada λ 256 nm dan setelah penyemprotan dengan larutan 10% H₂SO₄ dalam metanol berwarna kuning. Setelah dikeringkan pada suhu kamar, fraksi 5 tersebut berbentuk kristal

kuning (isolat A) sebanyak ± 100 mg. Isolat A selanjutnya dilakukan penentuan struktur molekul berdasarkan spektroskopi UV/Vis, FTIR, LCMS, dan FT-NMR.



Gambar 4.2 Kromatogram fraksi 1 s/d 5 hasil pemisahan kromatografi kolom gravitasi dari fraksi 7 pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen kloroform:metanol (9:1)

Kristalisasi fraksi 9 (50 mg) dengan melarutkan dalam metanol sesedikit mungkin, lalu ditambahkan kloroform hingga terbentuk endapan, diperoleh 2 fraksi, fraksi yang larut dalam kloroform, dan yang tidak larut dalam kloroform, kemudian di KLT (Gambar 4.3). Fraksi yang tidak larut dalam kloroform ini berbentuk pasta dan berwarna kuning coklat (isolat B) sebanyak 18 mg. Isolat B selanjutnya dilakukan penentuan struktur berdasarkan spektroskopi UV/Vis, FTIR, LCMS, dan FT-NMR.



Gambar 4.3 Kromatogram fraksi yang larut kloroform (tengah) dan yang tidak larut kloroform (kanan) hasil kristalisasi fraksi 9 pada lempeng KLT silika gel GF₂₅₄ dengan eluen kloroform:metanol (8:2) (a) dan kloroform:metanol (7:3) (b).

4.2 Penentuan Struktur Molekul

Hasil isolasi senyawa dari fraksi etil asetat diperoleh dua senyawa murni isolat A dan B. Untuk menentukan struktur molekul senyawa murni dilakukan analisis spektroskopi antara lain :

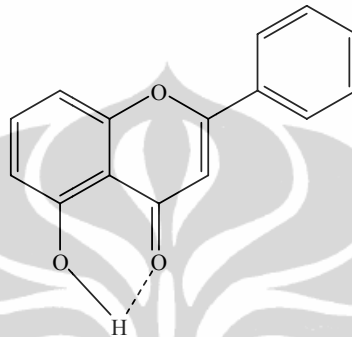
- Spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan adanya kromofor, yaitu gugus yang menyerap radiasi di daerah UV yang merupakan ikatan tidak jenuh.
- Spektroskopi infra merah (IR) untuk mengidentifikasi adanya gugus-gugus fungsi.
- Spektrometer Massa (LCMS), untuk menentukan data berat molekul
- Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti meliputi $^1\text{H-NMR}$ untuk mengetahui jumlah proton; $^{13}\text{C NMR}$ untuk menentukan jumlah atom karbon; DEPT 135 untuk menentukan jenis karbon; HMQC untuk menentukan pasangan proton dan karbon ($^1J_{\text{C,H}}$); dan HMBC untuk menentukan korelasi proton dan karbon dari suatu senyawa dengan jarak 2-3 ikatan.

4.2.1 Penentuan Struktur Molekul Isolat A

Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis, isolat A dalam pelarut metanol menunjukkan puncak serapan panjang gelombang (λ) maksimum pada 210, 255, dan 349 nm (Lampiran 2), puncak-puncak absorbansi tersebut menunjukkan suatu senyawa yang memiliki kerangka flavonoid, senyawa flavonoid memiliki spektrum dengan absorbansi maksimum 350-390 dan 250-270 nm (Harborne, 1984). Selain itu, hasil pengamatan spektrum UV-Vis untuk senyawa kuersitrin (flavonoid glikosida) mempunyai serapan maksimum pada λ 218,4, 256,4, dan 350,8 nm (Jamilah, 2003). Didukung oleh data spektrum infra merah pada Lampiran 3, isolat A menunjukkan puncak-puncak absorbansi pada bilangan gelombang 1602 cm^{-1} (medium) yang merupakan vibrasi ulur dari gugus C=O terkonjugasi. Pita serapan pada bilangan gelombang 3530 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur dari gugus -OH yang didukung oleh vibrasi tekuk pada bilangan gelombang 1300 cm^{-1} , vibrasi ulur ikatan C-H dari -CH₃ dan -CH₂ ditunjukkan pada pita serapan 2951 dan 2868 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1442 cm^{-1}

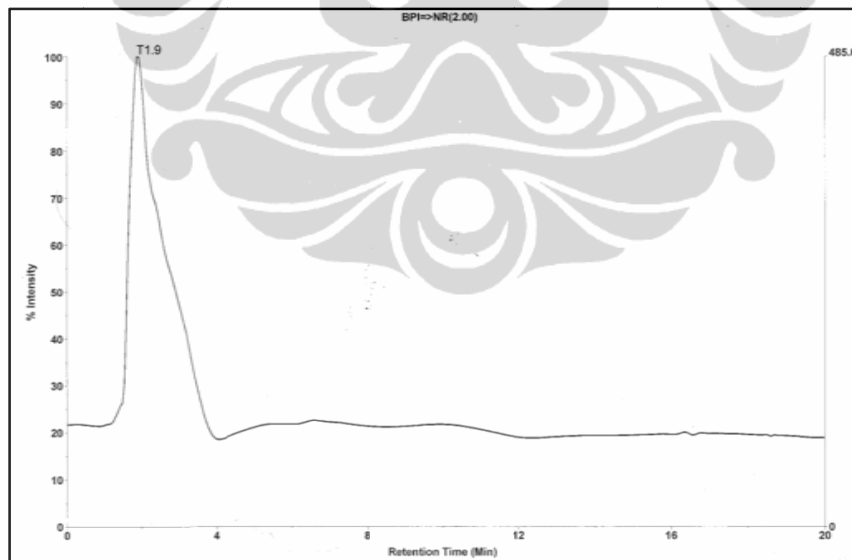
merupakan vibrasi tekuk dari C-H aromatik, ikatan C-O-C ditunjukkan pada pita serapan dengan bilangan gelombang 1144 dan 1063 cm^{-1} .

Berdasarkan hasil analisis data UV dan IR, isolat A diketahui merupakan senyawa golongan flavonoid yang mempunyai gugus C-H aromatik, C-O-C, C=O (karbonil) terkonjugasi serta gugus -OH yang membentuk jembatan hidrogen pada kerangka flavonoid.



Struktur ikatan hidrogen pada kerangka flavonoid

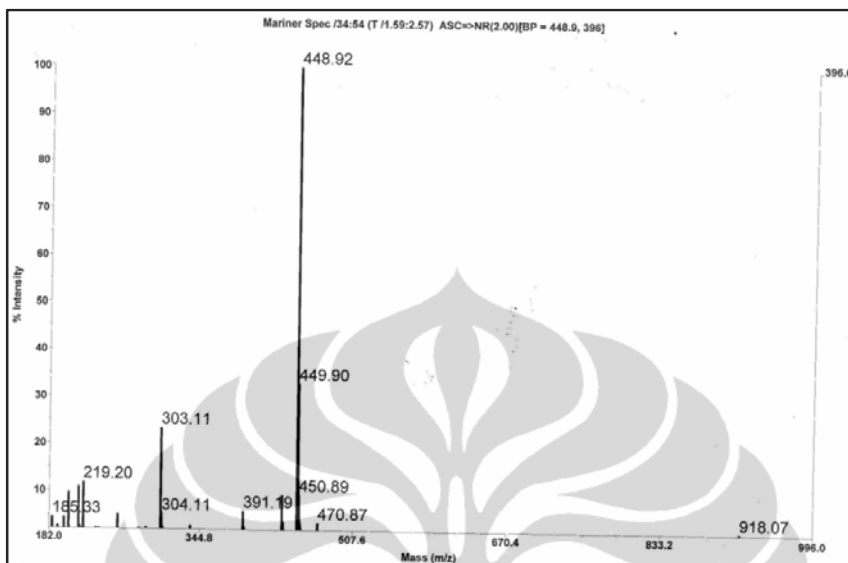
Dengan menggunakan spektroskopi LC-MS, kristal kuning isolat A yang dilarutkan dalam metanol, menghasilkan puncak tunggal pada waktu retensi 1,9 menit seperti Gambar 4.4 berikut:



Gambar 4.4 Spektrum LC (*Liquid Chromatography*) Isolat A

Hasil kromatogram LC isolat A memberikan satu puncak, hal tersebut menunjukkan bahwa isolat A mempunyai tingkat kemurnian yang cukup murni.

Berdasarkan analisa MS-nya diperoleh puncak dasar tertinggi (100 %) $[M+H]^+ = 448,92$, dengan m/z $447,92 \approx 448$ seperti Gambar 4.5.

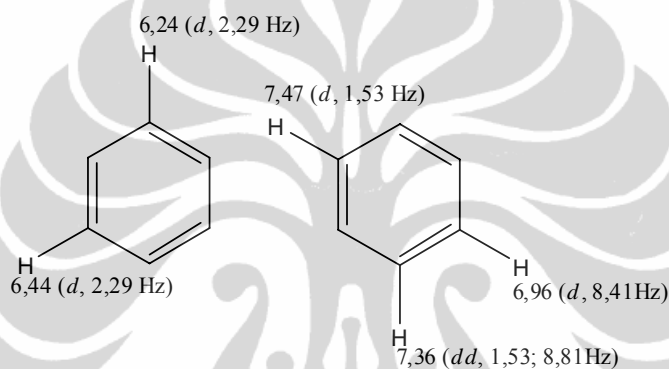


Gambar 4.5 Spektrum MS (*Mass Spectrometry*) Isolat A

Pergeseran kimia H (δ_H , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (dalam aseton- d_6 , 500 MHz) (tampilan spektrum disajikan pada Lampiran 4) menunjukkan adanya 1 buah metil doublet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm) 0,88 (3H, H-6'', *d*, J 6,12 Hz); dan adanya pergeseran kimia yang khas untuk gula pada daerah 3,32-5,49 ppm yang terdiri dari 4 buah proton metin hidroksida (HC-OH) pada (δ_H , ppm) 3,32 (1H, H-4'', *dd*, $J = 8,41$; 9,17 Hz); 3,37 (1H, H-5'', *dq*, $J = 9,94$; 6,12 Hz); 3,68 (1H, H-3'', *dd*, $J = 3,82$; 3,82); dan 4,18 (1H, H-2'', *dd*, $J = 1,5$ dan 1,5 Hz) dengan proton anomerik pada 5,49 (1H, H-1'', *d*, $J = 1,3$ Hz). Nilai konstanta J kapling dari proton anomerik yang kecil yaitu 1,3 Hz menunjukkan bahwa gugus gula tersebut mempunyai konfigurasi α . Selain itu, pada H-5'' mempunyai nilai konstanta J kapling $J(4''-5'')$ sebesar 9,94 Hz dan $J(5''-6'')$ 6,12 Hz yang berarti bahwa pada H-5'' mempunyai posisi aksial-aksial terhadap H-4'', dan aksial-ekuatorial terhadap H-6''. Pada sistem *six-membered ring*, nilai kapling konstan untuk J_{aa} sebesar 8-14 Hz, J_{ae} sebesar 1-7 Hz, dan J_{ee} sebesar 1-7 Hz (Williams & Fleming, 1980). Berdasarkan data tersebut, isolat A diduga mempunyai gula dari golongan ramnosa dengan konfigurasi L.

Pergeseran kimia pada daerah antara 6,24-7,47 ppm menunjukkan adanya proton sp^2 olefinik atau aromatik sebanyak 5 buah, yaitu pada δ_H 6,24 (1H, H-6, *d*,

$J = 2,29$ Hz), 6,44 (1H, H-8, d , $J = 2,29$ Hz), 6,96 (1H, H-5', d , $J = 8,41$ Hz), 7,36 (1H, H-6', dd , $J = 1,53$ dan 8,41 Hz), dan 7,47 ppm (1H, H-2', d , $J = 1,53$ Hz). Nilai konstanta J kapling sebesar 2,29 Hz pada δ_H 6,24 ppm (H-6) menunjukkan korelasi posisi meta terhadap proton pada 6,44 (1H, H-8, d , $J = 2,29$ Hz), dan pada pergeseran kimia 7,36 ppm (H-6') dengan nilai konstanta J kapling sebesar 1,53 dan 8,41 Hz mempunyai posisi meta terhadap proton pada pergeseran kimia 7,47 ppm (1H, H-2', d , $J = 1,53$ Hz) dan posisi orto terhadap proton pada pergeseran kimia 6,96 (1H, H-5', d , $J = 8,41$ Hz), sehingga isolat A ini mempunyai dua buah cincin aromatik yang dapat diilustrasikan dengan Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Ilustrasi kerangka aromatik isolat A

Sinyal pada daerah pergeseran kimia δ_H 12,71 (1H, 5-OH, s) menunjukkan adanya gugus hidroksi intramolekular yang membentuk ikatan hidrogen dengan O dari gugus karbonil (C=O). Data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ isolat A

Proton No	δ_H (ppm)	ΣH , Multiplisitas, J (Hz)	Proton No	δ_H (ppm)	ΣH , Multiplisitas, J (Hz)
6	6,24	1H, d , 2,29	1''	5,49	1H, d , 1,30
8	6,44	1H, d , 2,29	2''	4,18	1H, dd , 1,5; 1,5
2'	7,47	1H, d , 1,53	3''	3,68	1H, dd , 3,82; 3,82
5'	6,96	1H, d , 8,41	4''	3,32	1H, dd , 8,41; 9,17
6'	7,36	1H, dd , 1,53 dan 8,41	5''	3,37	1H, dq , 9,17; 6,12
5-OH	12,71	1H, s	6''	0,88	3H, d , 6,12

Pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C -NMR dan DEPT 135 (dalam aseton- d_6 , 125 MHz) (Lampiran 5) diperoleh data bahwa isolat A mempunyai 21 karbon terdiri dari 1 buah metil pada pergeseran kimia δ_C 16,9 ppm (C-6''); 10 buah metin (5 buah metin yang khas untuk daerah gula pada δ_C 72,2 (C-4''); 70,52 (C-5''); 71,3 (C-3''); dan 70,6 ppm (C-2'') dengan karbon anomerik pada δ_C 101,9 ppm (C-1'') dan 5 buah karbon CH aromatik pada δ_C 98,7 (C-6); 93,7 (C-8); 115,3 (C-5'); 121,8 (C-6'); dan 115,9 ppm (C-2'); dan 10 buah karbon kuartener pada δ_C 104,9 (C-4a); 122,04 (C-1'); 134,9 (C-3); 145,0 (C-3'); 148,2 (C-4'); 157,1 (C-8a); 157,6 (C-2); 162,4 (C-5); 164,1 (C-7); dan 178,5 ppm (C-4). Karbonil pada δ_C 178,5 ppm merupakan karbonil yang terkonjugasi, dan dari data ^1H - dan ^{13}C -NMR, isolat A diduga merupakan flavonoid glikosida, dikarenakan adanya pergeseran yang khas untuk flavonoid dengan adanya kerangka $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ dan adanya pergeseran yang khas untuk daerah glikosida. Data ^{13}C -NMR dan DEPT 135 dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel. 4.3 Data pergeseran kimia ^{13}C - NMR dan DEPT 135 isolat A

Karbon No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT 135	Karbon No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT 135
2	157,6	C	3'	145,0	C
3	134,7	C	4'	148,2	C
4	178,5	C	5'	115,3	CH
4a	104,9	C	6'	121,8	CH
5	162,4	C	1''	101,9	CH
6	98,7	CH	2''	70,6	CH
7	164,1	C	3''	71,3	CH
8	93,7	CH	4''	72,2	CH
8a	157,1	C	5''	70,5	CH
1'	122,0	C	6''	16,9	CH ₃
2'	115,9	CH			

Berdasarkan spektrum ^1H - dan ^{13}C -NMR dari isolat A dan literatur (Peng, Z.F., *et al.*, 2003; Zhong, X-N., *et al.*, 1997), isolat A mempunyai kemiripan

struktur dengan quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida, dapat dilihat perbandingan pergeseran kimia ^1H - dan ^{13}C -NMR pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Perbandingan ^1H - dan ^{13}C -NMR isolat A dengan quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida

Proton & Karbon No	δ_{H} -NMR (ppm), multiplisitas, <i>J</i> (Hz)		δ_{C} -NMR (ppm)	
	Isolat A	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnosida	Isolat A	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-ramnosida
2			157,6	158,6
3			134,9	136,3
4			178,5	179,7
4a			104,9	105,9
5			162,4	163,3
6	6,24, <i>d</i> , 2,29	6,24, <i>d</i> , 2,2	98,7	99,8
7			164,1	165,9
8	6,44, <i>d</i> , 2,29	6,41, <i>d</i> , 2,2	93,7	94,7
8a			157,1	158,6
1'			122,0	122,9
2'	7,47, <i>d</i> , 1,53	7,38; <i>d</i> ; 2,1	115,9	116,9
3'			145,0	146,2
4'			148,2	149,8
5'	6,96, <i>d</i> , 8,41	6,95, <i>d</i> , 8,3	115,3	116,4
6'	7,36, <i>dd</i> , 1,53; 8,41	7,35, <i>dd</i> ; 8,3; 2,1	121,8	123
1''	5,49, <i>d</i> , 1,53	5,40, <i>d</i> , 1,7	101,9	103,6
2''	4,18, <i>dd</i> , 1,5; 1,5	4,26, <i>dd</i>	70,6	72,1
3''	3,68, <i>dd</i> , 3,82; 3,82	3,79, <i>dd</i>	71,3	72,1
4''	3,32, <i>dd</i> , 8,41; 9,17	3,46, <i>dd</i> , 9,6; 9,6	70,5	73,3
5''	3,37, <i>dq</i> , 9,17; 6,12	3,37, <i>dq</i> , 9,6; 6,0	72,2	71,9
6''	0,88, <i>d</i> , 6,12	0,98, <i>d</i>	16,9	17,7

Hal ini dapat diperkuat dengan data HMQC dengan data HMBC dari isolat A yang dapat dilihat pada Tabel 4.5. Berdasarkan data HMQC (Lampiran 6), dapat diketahui inti proton yang berkorelasi langsung dengan karbon-13 (^{13}C) atau berkorelasi satu ikatan ($^1J_{\text{C,H}}$) sehingga dapat diketahui dengan pasti pasangannya sendiri. Dari data HMBC (Lampiran 7), dapat dilihat adanya korelasi proton dan karbon dengan jarak dua (2J) sampai tiga ikatan (3J) yang dapat dilihat pada Gambar 4.7. Dari HMBC dapat dilihat dengan jelas bahwa isolat A merupakan senyawa flavonoid glikosida ditunjukkan adanya korelasi pada proton anomerik (δ_{H} 5,49 ppm (1H, H-1'', *d*, $J = 1,3$ Hz) dengan karbon kuartener sp² (δ_{C} 134,9 ppm (C-3) sehingga isolat A dapat diketahui mempunyai ikatan glikosida 1→3.

Tabel. 4.5 Data pergeseran kimia HMQC dan HMBC isolat A

Proton & Karbon No.	$^1\text{H-NMR}$	HMQC	HMBC (δ_{C} , ppm)
	(δ_{H} , ppm)	(δ_{C} , ppm)	
6	6,24	98,7	93,7; 104,9; 162,4
8	6,44	93,7	98,7; 104,9; 157,1; 164,1
2'	7,47	115,9	121,8; 145,0; 148,2; 157,6
5'	6,96	115,3	122,0; 145,0; 148,2
6'	7,36	121,8	115,9; 148,2; 157,6
1''	5,49	101,9	134,9; 70,5
2''	4,18	70,6	72,2
3''	3,68	71,3	72,2
4''	3,37	70,5	-
5''	3,32	72,2	70,5
6''	0,88	16,9	70,5

Untuk menentukan jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap yang membentuk isolat A, maka digunakan rumus indeks kekurangan hidrogen, sebagai berikut :

$$F = X - 0,5 Y + 0,5 Z + 1$$

Dimana : F = jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap

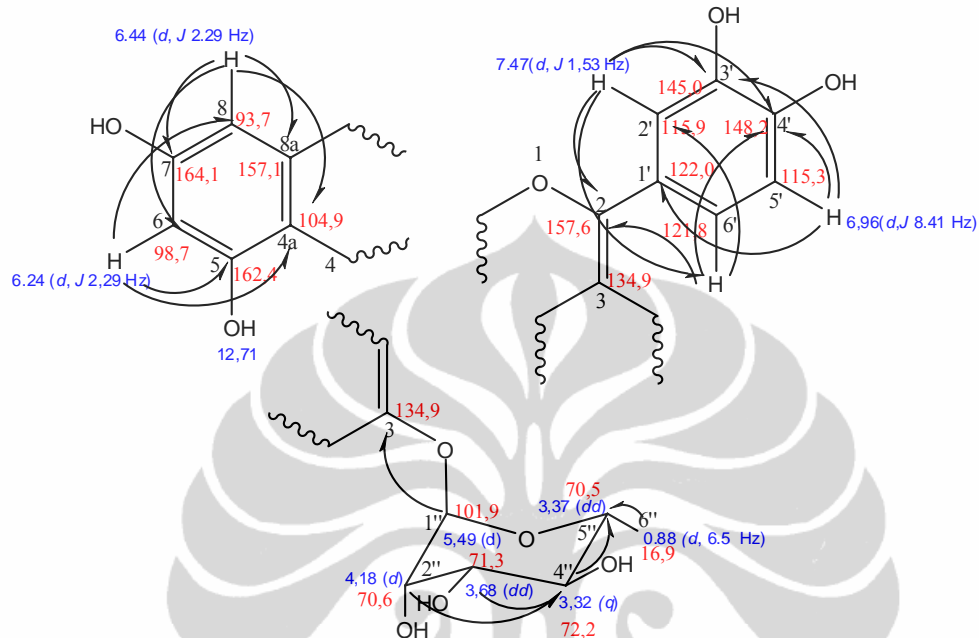
X = jumlah atom tetravalen, misal : C, Si

Y = jumlah atom monovalen, misal : H, Cl, Br, F

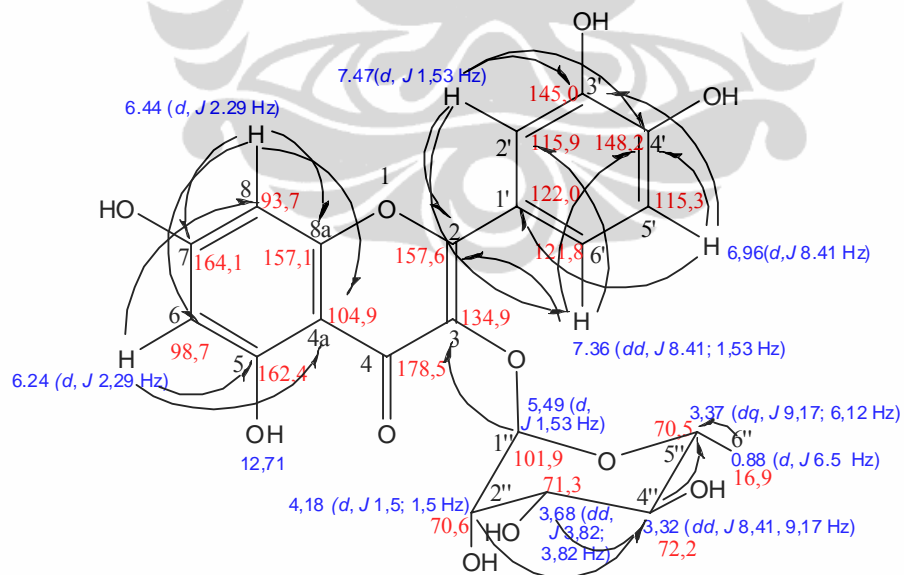
Z = jumlah atom trivalen, misal : N, P

$$\text{Jadi } F = 21 - (0,5 \times 20) + (0,5 \times 0) + 1 = 12$$

Hasil perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa isolat A mempunyai jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap sebanyak 12 (8 buah ikatan rangkap (1 satu) buah karbonil dan 7 (tujuh) berasal dari gugus $>C=<$) dan 4 buah cincin).



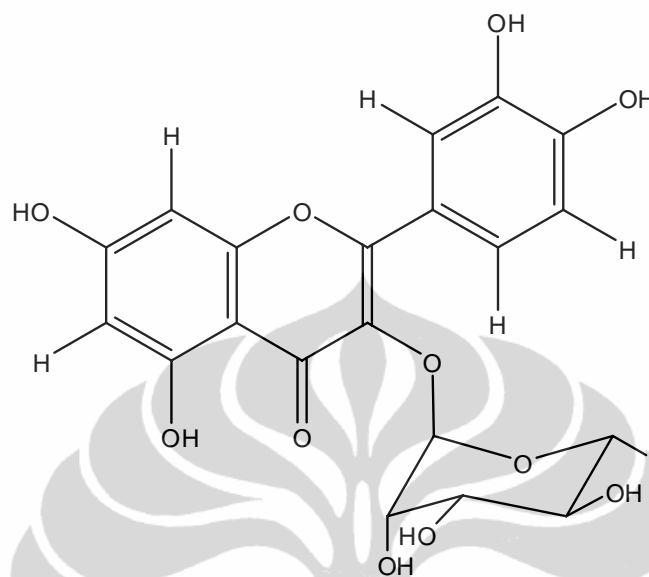
Gambar 4.7. Korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat A



Gambar 4.8 Struktur senyawa isolat A dari penggabungan korelasi proton dan karbon HMBC

Dari hasil pengukuran spektrum UV/Vis, FTIR, NMR dan perbandingan dengan data sebelumnya, serta didukung dengan data LC-MS dengan berat

molekul 448, isolat A merupakan quercetin 3-O- α -L-ramnosida (quercitrin) (Gambar 4.9).



Gambar 4.9 Struktur senyawa quercetin 3-O- α -L-ramnosida

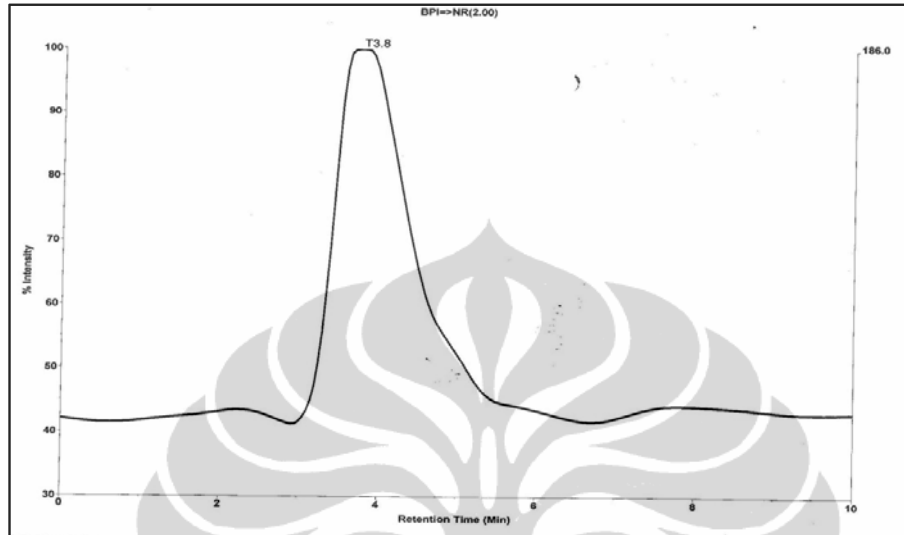
4.2.2 Penentuan Struktur Molekul Isolat B

Spektrum UV/Vis isolat B (Lampiran 8) yang dilarutkan dalam pelarut metanol terlihat adanya serapan pada λ_{maks} 210, 255, dan 347 nm. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan kerangka flavonoid yang mempunyai serapan pada λ_{maks} 350-390 dan 250-270 nm (Harborne, 1984). Flavonoid mempunyai kerangka dari sistem aromatik (benzena), dimana benzena menyerap dengan kuat pada 184 nm, 202 nm, dan mempunyai sederet pita absorpsi antara 230-270 nm (Fessenden & Fessenden, 1986).

Spektrum inframerah dari isolat B (Lampiran 9) menunjukkan bahwa isolat B mempunyai gugus hidroksida (OH) pada bilangan gelombang (ν) 3532 cm^{-1} (vibrasi ulur), gugus karbonil (C=O) terkonjugasi pada ν 1605 cm^{-1} (vibrasi ulur) dengan puncak yang kurang tajam, gugus alifatik -CH₃ dan -CH₂ pada ν 2912 dan 2868 cm^{-1} , gugus CH aromatik pada ν 1445 cm^{-1} (vibrasi tekuk), gugus eter (C-O-C) pada ν 1136 dan 1051 cm^{-1} . Berdasarkan hasil analisis data IR dan UV, isolat A diketahui mempunyai gugus C-H aromatik, C-O-C, C=O (karbonil) terkonjugasi dan tidak terkonjugasi serta gugus -OH yang membentuk jembatan

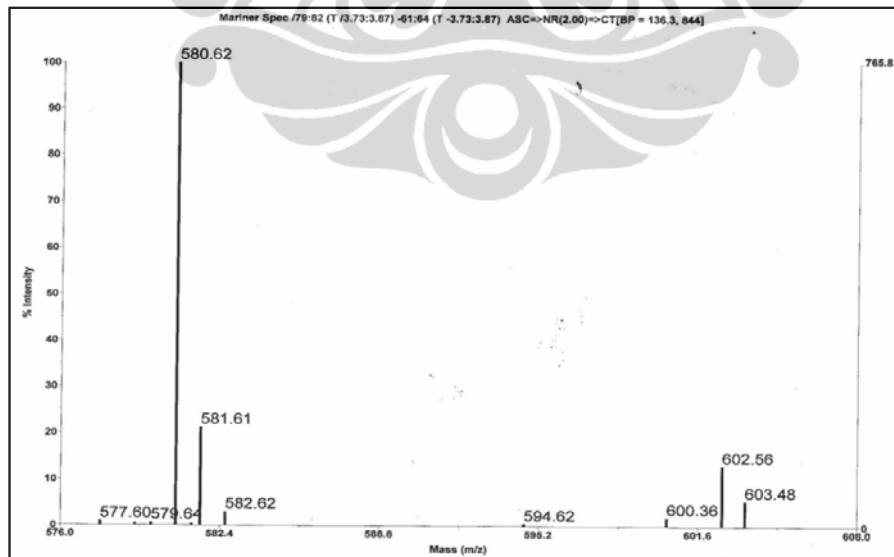
hidrogen pada kerangka flavonoid.

Spektrum LC-MS isolat B yang dilarutkan dalam metanol menghasilkan puncak tunggal dengan waktu retensi 3,8 menit (Gambar 4.10)



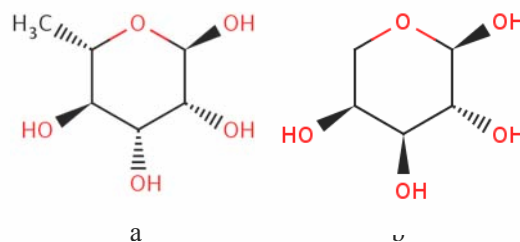
Gambar 4. 10 Hasil Kromatogram LC Isolat B

Hasil kromatogram LC isolat B menunjukkan satu puncak, hal tersebut dapat diperkirakan isolat B sudah cukup murni. Berdasarkan analisa MS nya diperoleh puncak dasar tertinggi (100 %) $[M+H]^+ = 580,62$, dengan m/z $579,62 \approx 580$ seperti Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Hasil Pengukuran Spektroskopi MS Isolat B

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari isolat B (CD_3OD , 500 MHz) (tampilan spektrum disajikan pada Lampiran 10 dan Tabel 4.6) menunjukkan adanya daerah aromatik pada pergeseran kimia 6,18-7,35 ppm dan daerah gula pada pergeseran kimia 3,33-4,17 ppm dengan 1 buah proton anomerik pada δ_{H} 5,35 ppm (H-1'') dan 1 buah metil doublet pada pergeseran kimia 1,0 ppm (3H, H-6'', $J = 6,12$ Hz). Pada daerah aromatik tersebut terdapat 5 buah CH aromatik pada δ_{H} 6,18 (1H, H-6, d , $J = 1,72$ Hz); 6,34 (1H, H-8, d , $J = 1,72$ Hz); 6,9 (1H, H-5', d , $J = 8,02$ Hz); 7,29 (1H, H-6', dd , $J = 1,72$ dan 8,02 Hz) dan 7,35 ppm (1H, H-2', d , $J = 1,72$ Hz). Daerah aromatik tersebut mempunyai dua cincin aromatik, yaitu pada δ_{H} 6,18 ppm (H-6) mempunyai posisi meta terhadap proton pada δ_{H} 6,34 ppm (H-8) dengan nilai J kapling sebesar 1,72 Hz, dan pada δ_{H} 7,29 ppm (H-6') mempunyai posisi meta terhadap proton pada δ_{H} 7,35 ppm (H-2') dengan nilai J kapling sebesar 1,72 Hz dan mempunyai posisi orto terhadap proton pada δ_{H} 6,9 ppm (H-5') dengan nilai J kapling sebesar 8,02 Hz. Sedangkan untuk daerah gula, dapat diketahui adanya dua jenis gula. Yang pertama terdapat 4 buah metin hidroksida (HC-OH) pada δ_{H} 3,88 (1H, H-5'', dq); 3,33 (1H, H-4'', dd , $J = 9,74$ dan 9,74 Hz); 3,85 (1H, H-3'', dd , 3,44); dan 4,17 ppm (1H, H-2'', m), proton anomerik pada δ_{H} 5,35 ppm (1H, H-1'', d , $J = 1,53$ Hz), nilai konstanta J kapling yang kecil menunjukkan konfigurasi α dan satu buah metil doublet pada pergeseran kimia 1,0 ppm (3H, H-6'', $J = 6,12$ Hz), berdasarkan data di atas diduga jenis gula yang pertama adalah ramnosa karena mempunyai 1 buah metil dan 5 buah metin (metil pentosa) seperti Gambar 4.11. Untuk jenis gula yang kedua, terdapat 4 buah metin hidroksida (HC-OH) pada δ_{H} 3,72 (1H, H-4''', m); 3,46 (1H, H-3''', dd , $J = 3,06$ dan 9,94 Hz); 3,51 (1H, H-2''', dd , $J = 7,64$ dan 9,17 Hz); dan 4,19 ppm (1H, H-1''', d , $J = 6,88$ Hz), dan terdapat metilen hidroksida ($\text{CH}_2\text{-OH}$) pada δ_{H} 3,63 (1H, H-5''', dd , $J = 2,29$ dan 13,0 Hz) dan 3,36 (1H, H-5''', *broadening doublet*, $J = 13,76$ Hz), sehingga diduga jenis gula yang kedua merupakan arabinopiranosida karena mempunyai 4 buah metin dan 1 buah metilen seperti Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Struktur molekul α -L-ramnosa (a) dan α -L-arabinopiranososa (b) (www.ebi.ac.uk)

Tabel 4.6 Data pergeseran kimia ^1H -NMR isolat B

Proton No	δ_{H} (ppm)	ΣH , Multiplisitas, J (Hz)	Proton No	δ_{H} (ppm)	ΣH , Multiplisitas, J (Hz)
6	6,18	1H, <i>d</i> , 1,72	4''	3,33	1H, <i>dd</i> , 9,74; 9,74
8	6,34	1H, <i>d</i> , 1,72	5''	3,88	1H, <i>dq</i> , 9,74; 6,12
2'	7,35	1H, <i>d</i> , 1,72	6''	1,0	3H, <i>d</i> , 6,12
5'	6,9	1H, <i>d</i> , 8,02	1'''	4,19	1H, <i>d</i> , 7,64
6'	7,29	1H, <i>dd</i> , 1,72 & 8,02	2'''	3,51	1H, <i>dd</i> , 7,64; 9,17
1''	5,35	1H, <i>d</i> , 1,53	3'''	3,46	1H, <i>dd</i> , 3,06; 9,17
2''	4,17	1H, <i>m</i>	4'''	3,72	1H, <i>m</i>
3''	3,85	1H, <i>dd</i> , 3,44	5'''	3,63 & 3,36	2H, <i>dd</i> , 2,29; 13,00 & <i>br d</i> , 13,00

Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT 135 (dalam CDCl_3 , 125 MHz) (Lampiran 11) diperoleh data bahwa isolat B mempunyai 26 karbon terdiri dari 1 buah metil pada δ_{C} 16,4 ppm (C-6'); 1 buah metilen hidroksida (CH_2OH) pada δ_{C} 66,1 ppm (C-5'''); 14 buah metin (9 buah metin yang khas untuk daerah gula pada δ_{C} 68,6 (C-4'''); 70,4 (C-3'); 70,6 (C-5'); 71,4 (C-2'''); 72,4 (C-4''); 72,9 (C-3'''); 81,4 (C-2'') dan 106,5 ppm (C-1'') dengan karbon anomerik pada δ_{C} 101,9 ppm (C-1'') dan 5 buah karbon CH aromatik pada δ_{C} 93,5 (C-8); 98,6 (C-6); 115,2 (C-5'); 115,5 (C-2') dan 121,4 ppm (C-6'); dan 10 buah karbon kuartener pada δ_{C} 104,4 (C-4a); 122,6 (C-1'); 135,5 (C-3); 145,2 (C-3'); 148,5 (C-4'); 157,2 (C-8a); 157,8 (C-2); 161,9 (C-5); 164,7 (C-7); dan 178,4 ppm (C-4). Karbonil pada δ_{C} 178,4 ppm (C-4) merupakan karbonil yang terkonjugasi, dan dari data ^1H - dan ^{13}C -NMR, isolat B diduga merupakan flavonoid glikosida. Data ^{13}C -NMR dan DEPT 135 dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel. 4.7 Data pergeseran kimia ^{13}C -NMR dan DEPT 135 isolat B

No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT 135	No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT 135
2	157,8	C	5'	115,2	CH
3	135,5	C	6'	121,4	CH
4	178,4	C	1''	101,9	CH
4a	104,4	C	2''	81,4	CH
5	161,9	CH	3''	70,4	CH
6	98,6	C	4''	72,4	CH
7	164,7	CH	5''	70,6	CH
8	93,5	CH	6''	16,4	CH ₃
8a	157,2	C	1'''	106,5	CH
1'	122,6	C	2'''	71,4	CH
2'	115,5	CH	3'''	72,9	CH
3'	145,2	C	4'''	68,6	CH
4'	148,5	C	5'''	66,1	CH ₂

Berdasarkan spektrum ^1H - dan ^{13}C -NMR dari isolat B dan literatur (Muzitano, M.F., *et al.*, 2006), isolat B mempunyai kemiripan struktur dengan quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-rhamnopyranosida, dapat dilihat perbandingan pergeseran kimia ^1H - dan ^{13}C -NMR pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Perbandingan ^1H - dan ^{13}C -NMR isolat B dengan quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida

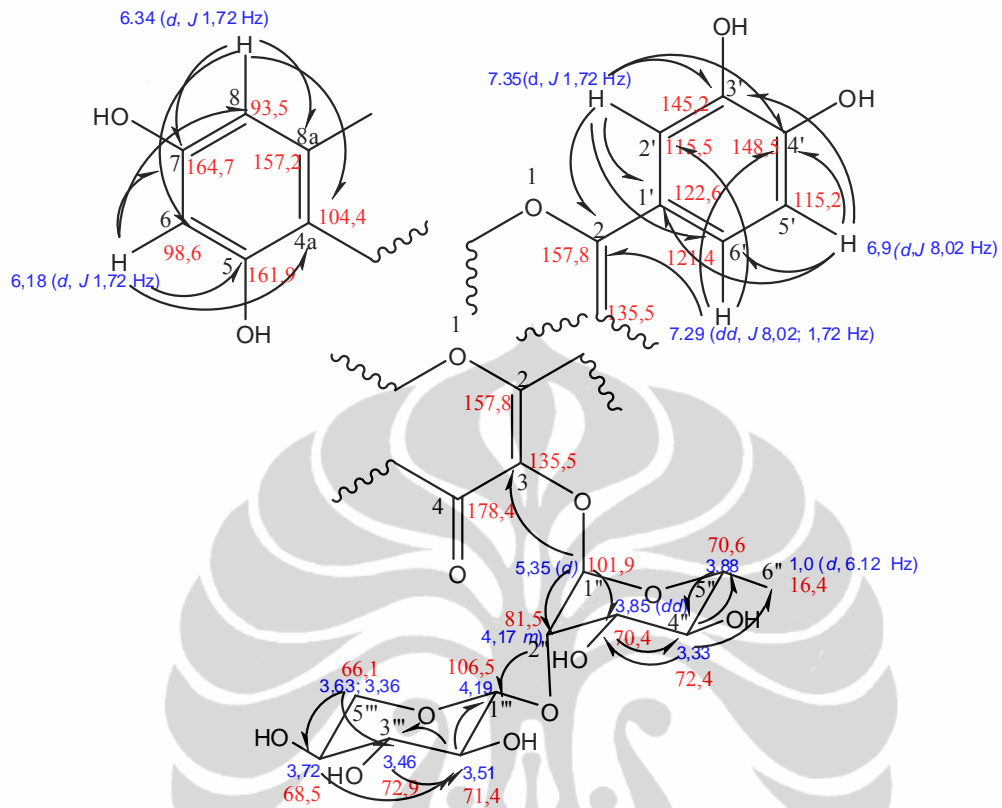
Proton & Karbon No.	δ_{H} -NMR (ppm), multiplisitas, <i>J</i> (Hz)		δ_{C} -NMR (ppm)	
	Isolat B	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida	Isolat B	Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida
2			157,8	157,5
3			135,5	134,9
4			178,4	178,3
4a			104,4	104,4
5			161,9	161,8
6	6,18 (<i>d</i> , 1,72)	6,19 (<i>d</i> , 2,0)	98,6	99,3
7			164,7	165,0
8	6,34(<i>d</i> , 1,72)	6,37 (<i>d</i> , 2,0)	93,5	94,2
8a			157,2	157,0
1'			122,6	121,2
2'	7,35(<i>d</i> , 1,72)	7,36 (<i>d</i> , 2,0)	115,5	116,2
3'			145,2	145,8
4'			148,5	149,2
5'	6,9 (<i>d</i> , 8,02)	6,93 (<i>d</i> , 8,32)	115,2	116,0
6'	7,29 (<i>dd</i> , 1,72; 8,02)	7,29 (<i>dd</i> , 2,07; 8,32)	121,4	121,0
1''	5,35 (<i>d</i> , 1,53)	5,37 (<i>d</i> , 0,93)	101,9	102,4
2''	4,17 (<i>m</i>)	4,19 (<i>m</i>)	81,4	81,1
3''	3,85 (<i>dd</i> , 3,44; 3,44)	3,89 (<i>dd</i> , 3,70; 3,70)	70,4	70,8
4''	3,33 (<i>dd</i> , 9,74; 9,74)	3,35 (<i>dd</i> , 9,70; 9,70)	72,4	73,0
5''	3,88 (<i>dq</i> , 9,74; 6,12)	3,87 (<i>dq</i> , 9,70; 6,20)	70,6	70,9
6''	1,0 (<i>d</i> , 6,12)	1,10 (<i>d</i> , 6,20)	16,4	17,8
1'''	4,19 (<i>d</i> , 7,64)	4,20 (<i>d</i> , 7,10)	106,5	106,9
2'''	3,51 (<i>dd</i> , 7,64; 9,17)	3,54 (<i>dd</i> , 7,10; 9,28)	71,4	71,6
3'''	3,46 (<i>dd</i> , 3,06; 9,17)	3,47 (<i>dd</i> , 3,25; 9,28)	72,9	72,3
4'''	3,72 (<i>m</i>)	3,72 (<i>m</i>)	68,5	68,3
5'''	3,63 (<i>dd</i> , 2,29; 13,00) 3,36 (<i>br d</i> , 13,00)	3,65 (<i>dd</i> , 12,45; 2,27) & 3,37 (<i>br d</i> , 12,45)	66,1	66,3

Hal ini dapat diperkuat dengan data HMQC dan data HMBC dari isolat B

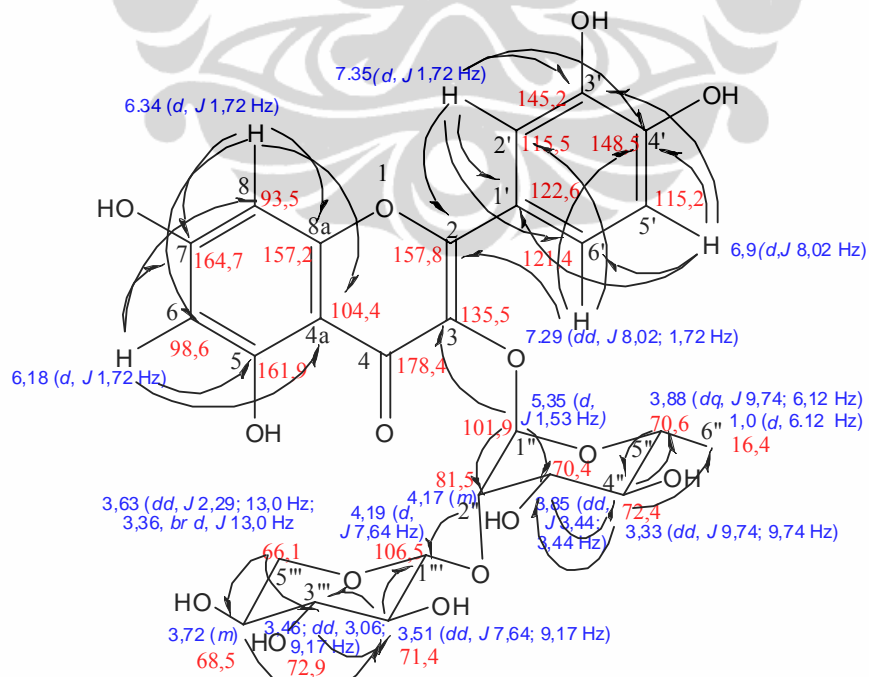
yang dapat dilihat pada Tabel 4.9. Berdasarkan data HMQC (Lampiran 12), dapat diketahui inti proton yang berkorelasi langsung dengan karbon-13 (^{13}C) atau berkorelasi satu ikatan ($^1J_{\text{C,H}}$) sehingga dapat diketahui dengan pasti pasangannya sendiri. Dari data HMBC (Lampiran 13), dapat dilihat adanya korelasi proton dan karbon dengan jarak dua (2J) sampai tiga ikatan (3J) yang dapat dilihat pada Gambar 4.12. Dari HMBC dapat dilihat dengan jelas bahwa isolat B merupakan senyawa flavonoid glikosida ditunjukkan adanya korelasi pada proton anomerik δ_{H} 5,35 ppm (H-1'') dengan karbon kuartener sp^2 δ_{C} 135,48 ppm (C-3) sehingga mempunyai ikatan glikosida 1 \rightarrow 3. Selain itu, dapat diketahui bahwa antara arabinopiranosida dan ramnosa dihubungkan dengan ikatan glikosida 1 \rightarrow 2, dimana H-2'' berkorelasi dengan karbon C-1''' dengan jarak 3 ikatan (3J).

Tabel. 4.9 Data spektrum HMQC dan HMBC isolat B

No	$^1\text{H-NMR}$	HMQC	HMBC (δ_{C} , ppm)
	(δ_{H} , ppm)	(δ_{C} , ppm)	
6	6,18	98,6	164,7; 161,9; 104,4; 93,5
8	6,34	93,5	164,7; 104,4; 98,6
2'	7,35	115,5	157,8; 148,5; 145,2; 121,4; 121,6
5'	6,9	115,2	148,5; 145,2; 121,4; 121,6
6'	7,29	121,4	148,5; 115,5
1''	5,35	101,9	135,5; 81,5; 70,4; 70,6
2''	4,17	81,4	106,5
3''	3,85	70,4	72,4
4''	3,33	72,4	70,4; 70,6; 16,4
5''	3,88	70,6	72,4
6''	1,0	16,4	71,4
1'''	4,19	106,5	81,4
2'''	3,51	71,4	106,5; 72,9
3'''	3,46	72,9	71,4
4'''	3,72	68,5	71,4
5'''	3,63 & 3,36	66,1	106,5; 72,9; 68,5



Gambar 4.13 Korelasi proton dan karbon HMBC dari isolat B.



Gambar 4.14 Struktur senyawa isolat B dari penggabungan korelasi proton dan karbon HMBC

Untuk menentukan jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap yang membentuk isolat A, maka digunakan rumus indeks kekurangan hidrogen, sebagai berikut :

$$F = X - 0,5 Y + 0,5 Z + 1$$

Dimana : F = jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen, misal : C, Si

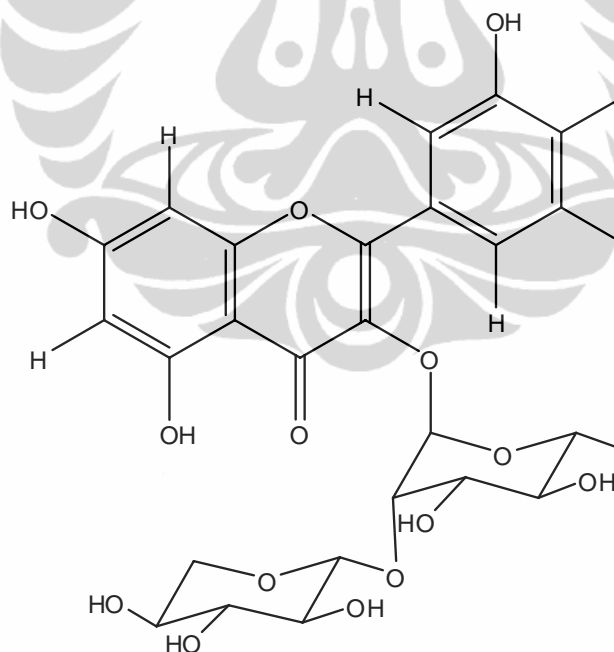
Y = jumlah atom monovalen, misal : H, Cl, Br, F

Z = jumlah atom trivalen, misal : N, P

$$\text{Jadi } F = 26 - (0,5 \times 28) + (0,5 \times 0) + 1 = 13$$

Dari hasil perhitungan di atas, dapat disimpulkan bahwa isolat B mempunyai jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap sebanyak 13 (8 buah ikatan rangkap (1 (satu) buah karbonil dan 7 (tujuh) berasal dari gugus $>C=C<$) dan 5 buah cincin).

Dari hasil pengukuran spektrum UV/Vis, FTIR, NMR dan perbandingan dengan data sebelumnya, dan didukung dengan data LC-MS dengan berat molekul 580, isolat B merupakan quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (Gambar 4.15).

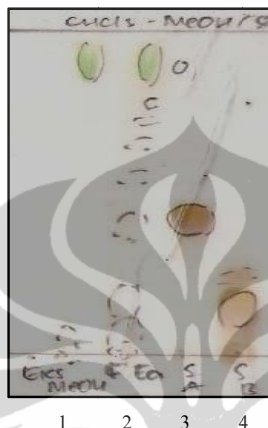


Gambar 4.15. Struktur senyawa quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida

Senyawa quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida ini merupakan senyawa yang tidak umum ditemukan pada jenis tumbuhan lain,

kecuali pada *Alphitonia philippensis* (Rhamnaceae) (Muzitano, M.F., *et al.*, 2006).

Untuk memastikan bahwa tidak terjadinya hidrolisis pada senyawa Quercetin 3-O- α -L-ramnosida dari quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida, maka dilakukan Kromatografi Lapis Tipis yang dibandingkan dengan ekstrak metanol dan fraksi etil asetat sebelum dimurnikan (Gambar 4.16).



Gambar 4.16 Kromatogram ekstrak metanol (1), fraksi etil asetat (2), quercetin 3-O- α -L-ramnosida (3) dan quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida (4) dari daun *B. pinnatum* dengan eluen kloroform-metanol (8:2).

Berdasarkan KLT di atas dapat diketahui bahwa senyawa quercetin 3-O- α -L-ramnosida dan quercetin-3-O- α -L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida terkandung dalam fraksi etil asetat daun *B. pinnatum*.

4.3 Hasil Uji Aktivitas Biologi

4.3.1 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase

Hasil uji aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase secara *in vitro* terhadap senyawa yang diperoleh dari hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 4.10 dengan grafik pada Lampiran 14.

Tabel 4.10 Hasil uji penghambatan enzim α -glukosidase secara *in vitro*

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibisi (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Kuersetin	0,78	12,231	5,67
	1,56	29,457	
	3,12	43,411	
	6,25	55,125	
	12,5	58,743	
Isolat A	6,25	11,197	83,83
	12,5	13,695	
	25	21,533	
	50	30,491	
	100	59,087	
Isolat B	6,25	10,422	110,52
	12,5	11,455	
	25	15,504	
	50	26,701	
	100	46,081	

Berdasarkan tabel di atas, dapat dilihat bahwa isolat A (IC₅₀ 83,83 $\mu\text{g/mL}$) dan B (IC₅₀ 110,52 $\mu\text{g/mL}$) mempunyai aktivitas penghambatan α -glukosidase lebih rendah dibandingkan standar kuersetin (IC₅₀ 5,67 $\mu\text{g/mL}$). Gugus -OH pada C-3 kuersetin merupakan gugus farmakofor (gugus yang mempunyai aktivitas farmasi) untuk aktivitas penghambatan α -glukosidase (Li, Y.Q., 2009). Pada isolat A dan B, gugus -OH pada C-3 aglikon (kuersetin) diganti dengan gugus gula (ramnosa dan ramnosa-arabinosa), sehingga menyebabkan gugus farmakofor (-OH pada C3) hilang dan hal tersebut menyebabkan aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase menurun.

Isolat A yang mengikat satu gugus gula (ramnosa) pada C3 mempunyai aktivitas penghambatan α -glukosidase lebih baik dibandingkan isolat B yang mengikat dua buah gugus gula (ramnosa dan arabinosa) pada C yang sama. Perbedaan jumlah gugus gula yang terikat pada C3, diduga merupakan faktor penyebab semakin rendahnya aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya penambahan gugus gula pada isolat B, sehingga menyebabkan aktivitas penghambatan α -glukosidase isolat B menurun.

4.3.2 Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji BSLT dilakukan terhadap isolat A dan B, sebagai kontrol dipergunakan air laut yang tidak ditambahkan sampel. Metode uji toksisitas ini dilakukan karena biayanya murah dan hasilnya dapat dipercaya. Pada uji ini diamati adalah tingkat mortalitas yang disebabkan oleh senyawa uji. Menurut Meyer, *et al.*, 1982, senyawa aktif akan menghasilkan mortalitas yang tinggi, senyawa dengan $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ dapat dikategorikan sebagai senyawa yang mempunyai potensi sebagai senyawa yang bersifat toksik, semakin kecil nilai LC_{50} nya maka senyawa tersebut dikatakan semakin aktif/toksik. Hasil uji BSLT dapat dilihat pada Tabel 4.11 dengan grafik pada Lampiran 15.

Tabel 4.11 Analisa hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sampel	Konsentrasi (K), ($\mu\text{g/mL}$)	Log K	Mati	Hidup	Akumulasi		Mortalitas	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
					Mati	Hidup		
Kontrol			0	31	0	125	0,000	
			0	30	0	95	0,000	
			0	30	0	63	0,000	
			0	31	0	32	0,000	
Isolat A	10	1,00	12	18	12	49	19,672	86,90
	100	2,00	15	15	27	31	46,552	
	500	2,70	19	11	46	16	74,194	
	1000	3,00	25	5	71	5	93,421	
Isolat B	10	1,00	13	17	13	58	18,310	158,85
	100	2,00	15	15	28	41	40,580	
	500	2,70	16	14	44	26	62,857	
	1000	3,00	18	12	62	12	83,784	

Pada Tabel 4.11 terlihat bahwa semua larva udang pada sampel kontrol tidak ada yang mati, hal ini berarti air laut yang dipergunakan dalam keadaan baik. Hasil analisa BSLT diperoleh LC_{50} untuk isolat A lebih kecil dibandingkan isolat B, hal ini berarti isolat A bersifat lebih toksik dibandingkan isolat B.

4.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Isolat A dan B dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode *radical scavenger* dapat dilihat pada Tabel 4.12 dengan grafik pada Lampiran 16. Sebagai pembanding digunakan kontrol dari senyawa antioksidan kuersetin.

Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 515 nm, setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C.

Tabel. 4.12 Data analisa hasil uji antioksidan isolat A dan B

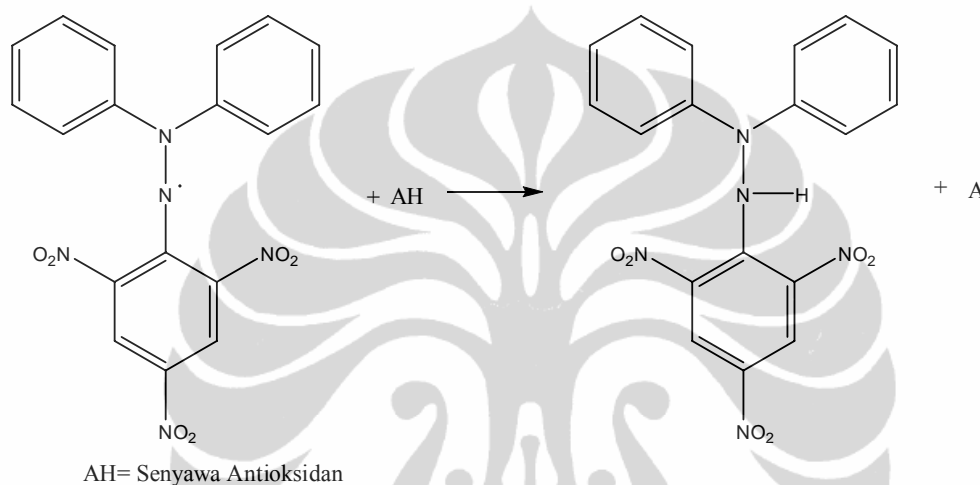
No	Sampel	Absorbansi ($\lambda=515$ nm)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	Blanko	2,168			7,6
2	Kuersetin	0,522	15	75,923	
3		0,849	10	60,839	
4		1,302	5	39,945	
5		1,618	1	25,369	
6	Isolat A	1,155	15	52,260	13,07
7		1,035	10	46,725	
8		1,419	5	34,548	
9		1,568	1	27,675	
10	Isolat B	1,05	20	51,568	19,34
11		1,33	15	38,653	
12		1,442	10	33,487	
13		1,77	5	18,358	
14		1,941	1	10,470	

Berdasarkan tabel di atas dapat diketahui bahwa dengan penambahan konsentrasi dapat menaikkan % inhibisi DPPH. Kenaikan % inhibisi ini mempunyai arti bahwa telah terjadi penangkapan radikal bebas DPPH oleh isolat. Penangkapan radikal bebas tersebut mengakibatkan warna diazo pada DPPH berkurang, karena ikatan rangkap terkonjugasi semakin panjang, sehingga terjadi kenaikan % inhibisi, yang disebabkan oleh menurunnya absorbansi.

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan jika bisa bertindak sebagai donor hidrogen ataupun akseptor elektron. Pemberian atom hidrogen oleh suatu antioksidan yang bertindak sebagai donor proton merupakan tahap awal mekanisme antioksidan melalui penangkap radikal (*radical scavenger*). Sampel uji isolat A dan B dapat bertindak sebagai donor hidrogen, karena dapat menangkap radikal bebas DPPH yang ditandai dengan terjadinya pengurangan intensitas warna pada DPPH, hal tersebut juga diperkuat dengan data hasil pengukuran serapan warna yang dilakukan dengan spektrofotometer, dimana nilai IC₅₀ isolat A dan B, masing-masing 13,07 dan 19,34 $\mu\text{g/ml}$ lebih rendah

dibandingkan dengan nilai IC_{50} dari standar quercetin yaitu 7,6 $\mu\text{g/mL}$. Namun demikian isolat A dan isolat B dapat dikategorikan sebagai senyawa aktif aktioksidan karena nilai IC_{50} -nya masih masuk dalam kategori aktif yaitu di bawah 100 $\mu\text{g/mL}$.

Penurunan intensitas warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazin)



Gambar. 4.17 Reaksi reduksi DPPH

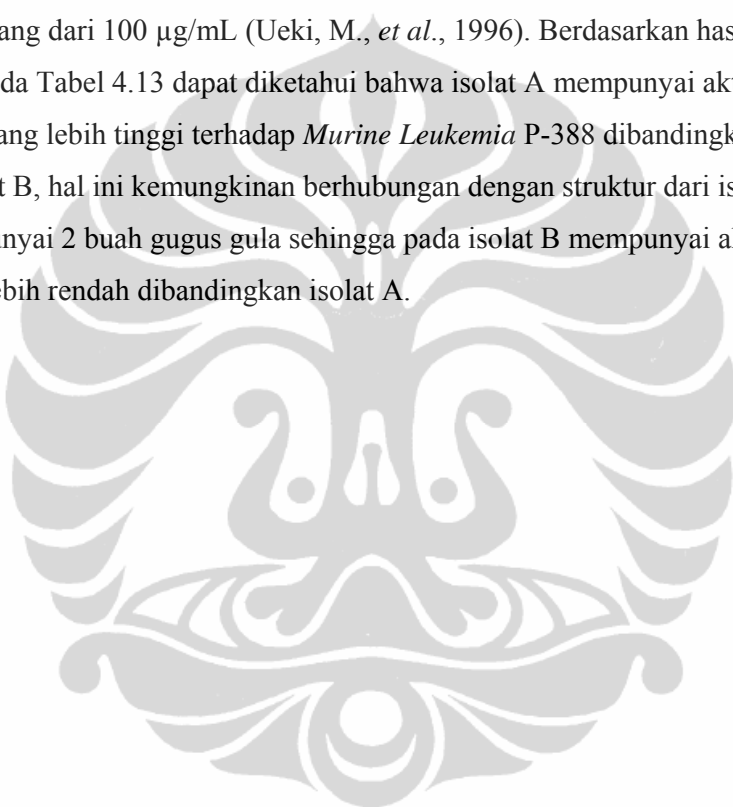
4.3.4 Hasil Uji Antikanker *in-vitro* dengan sel P-388

Hasil uji sitotoksitas isolat A dan B sebagai anti kanker dilakukan secara *in vitro* terhadap sel kanker *Murine Leukemia* P-388 dapat dilihat pada Tabel 4.13 dan perhitungan IC_{50} dapat dilihat pada Lampiran 17-20 dengan cara membuat kurva antara rapatan optis (*optical density*) (sumbu y) dan konsentrasi (sumbu x) sehingga diperoleh persamaan garis lurus, kemudian ditentukan nilai IC_{50} (Marlupi, U.D., 2007). Pada uji ini, digunakan larutan PBS (*phosphoric buffer solution*) dan DMSO sebagai kontrol positif, larutan PBS (*phosphoric buffer solution*) sebagai kontrol negatif, dan artonin E sebagai standar.

Tabel 4.13 Hasil uji anti kanker *Murine Leukemia* P-388

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)
Isolat A	64,3
Isolat B	205,1
Artonin E	0,06

Suatu senyawa dinyatakan memiliki aktivitas sebagai anti kanker apabila IC₅₀-nya kurang dari 100 µg/mL (Ueki, M., *et al.*, 1996). Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 4.13 dapat diketahui bahwa isolat A mempunyai aktivitas antikanker yang lebih tinggi terhadap *Murine Leukemia* P-388 dibandingkan dengan isolat B, hal ini kemungkinan berhubungan dengan struktur dari isolat B yang mempunyai 2 buah gugus gula sehingga pada isolat B mempunyai aktivitas antikanker lebih rendah dibandingkan isolat A.



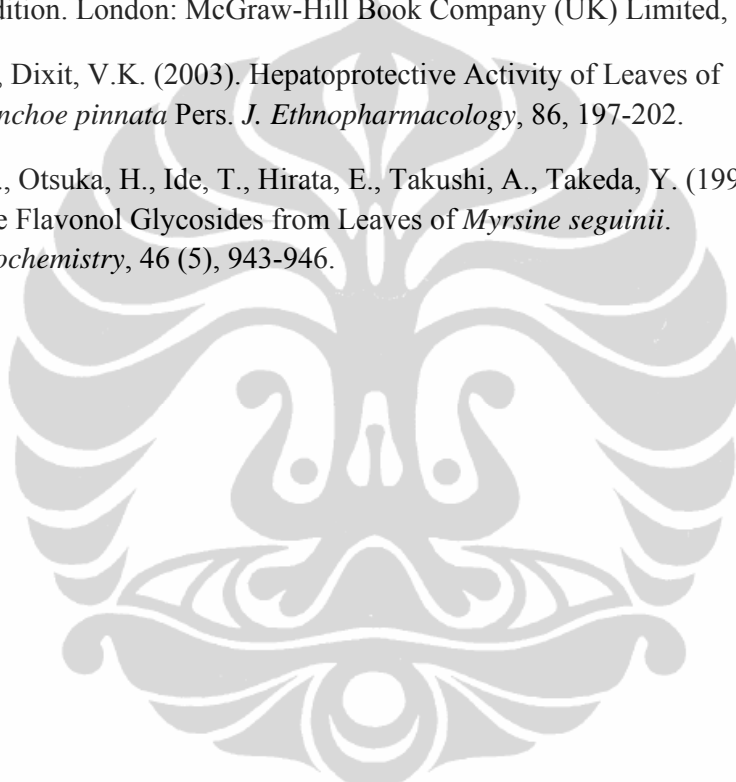
DAFTAR PUSTAKA

- Adinata, E. (2007). Sintesis Senyawa Analog UK-3A: 3-Hidroksipikolinil Diioktil Glutamat dan 2-Hidroksinikotinil Dioktil Glutamat dan Uji Sitotoksitas terhadap Sel Kanker *Murine Leukemia* P-388. Tesis, Depok: Universitas Indonesia.
- Akinpelu, D.A. (2000). Antimicrobial Activity of *Bryophyllum pinnatum* Leaves. *Fitoterapia*, 71, p 193-194.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., and Boyd, M.R. (1988). Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.*, 48 (3), 589-601.
- Artanti, N., Hanafi, M., Kardono, L.B.S. (2002). Aktivitas Penghambatan Ekstrak Gambir (*Uncaria gambir* Roxb) dan Ekstrak *Taxus sumatrana* (Miquel) De Launbenfels terhadap Enzim α -Glukosidase. *Prosiding Seminar Nasional V Kimia dalam Pembangunan*, Yogyakarta, 483-488.
- Cheng, A.Y.Y., and Josse, R.G. (2000). Intestinal Absorption Inhibitor for Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 1(2), 201-206.
- Christopher, M.K. and Van Holde, K.E. (1980). *Biochemistry 2nd*. Toronto: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 471-475.
- Cruz, E.A., Da-Silva, S.A.G., Muzitano, M.F., Silva, P.M.R., Costa, S.S., Rossi-Bergmann, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology*, 8, 1616-1621
- Departemen Kesehatan & Kesejahteraan Sosial RI. (2000). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I)*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jilid 1, hal. 147
- Efizal. (2007). Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Penghambat Enzim α -Glukosidase dari Daun *Kalanchoe pinnata* Pers. Secara *In Vitro* dan *In Vivo*. Tesis, Depok: Universitas Indonesia.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S. (1986). Kimia Organik (A. Hadyana Pudjaatmaka, Penerjemah.). Jilid 2, edisi ke-3, Jakarta: Erlangga.
- Hakim, E.H. (2003). Bergenin, Suatu Dihidrosukumarin dari Kayu dan Kulit Batang *Shorea stenoptera* Burek. *Prosiding ITB*, Vol. 35A, No. 2.

- Harborne, J. B. (1984). *Metode Fitokimia : penuntun cara modern menganalisa tumbuhan* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah.). Bandung: ITB.
- http://id.wikipedia.org/wiki/Cocor_bebek
- <http://members.gardenweb.com/members/exch/adamsmom>
- <http://www.nipponsapuri.com>
- [http://www.rain-tree.com/Tropical Plant Database](http://www.rain-tree.com/Tropical%20Plant%20Database), Raintree Nutrition, Inc., Carson City
- <http://www.smallcrab.com/diabetes/452-sekilas-mengenal-insulin>
- Hudson, B.J.F., Editor. (1990). *Food Antioxidant*. London: Elsevier Applied Science.
- Jamilah. (2003). *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Sitotoksik dari Daun Benalu Duku, *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) van Tiegh*. Tesis, Depok: Universitas Indonesia
- Johnston, P.S., Lebovits, E. H., Simonson, D.C., Munera, L. C. (1998), Advantages of α -Glucosidase Inhibition as Monotherapy in Elderly Type 2 Diabetic Patients. *Clin. Endocrinology and Metabolism*, 83(5), 1515-1522.
- Juliawati, L.D. (2005). Tiga Senyawa Oligostilbenoid dari Kulit Batang *Dipterocarpus retuses* Blume (Dipterocarpaceae). *Jurnal Matematika dan Sains*, Vol. 10, No. 4.
- Ketut, I K. (2010). *Isolasi dan Elusidasi Senyawa Kimia serta Uji Aktivitas Biologi Ekstrak n-Heksana Kulit Batang *Garcinia eugenifolia* Wall*. Tesis, Depok: Universitas Indonesia
- Kochhar, S.P. dan J.B. Rossell. (1990) *Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidant in Food Systems*. London: Elsevier Applied Science.
- Krishnaraju, A.V., Rao, T.V.N., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H-S., Subbaraju, G.V. (2006). Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *International Journal of Applied Science and Engineering*, 4 (2), 115-125.
- Lee, D.S. and Lee, S.H. (2001). Genistein, a Soy Isoflavone, is a Potent α -Glucosidase Inhibitor. *FEBS Letters*, 501, 84-86.
- Li, Y.Q., Zhou, F.C., Gao, F., Bian, J.S., Shan, F. (2009). Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. *J. Agricultural & Food Chemistry*, 57, 11463-11468.

- Marlupi, U.D. (2007). Sintesis Senyawa Analog UK-3A dan Uji Aktivitas Secara *In Vitro* terhadap Sel Kanker Murine Leukemia P-388. *Tesis*, Depok: Universitas Indonesia.
- Meyer B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Mc Laughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45, 31-34.
- Muzitano, M.F., Tinoco, L.W., Guette, C., Kaiser, C.R., Rossi-Bergmann, B., Costa, S.S. (2006). The Antileishmanial Activity Assessment of Unusual Flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, 67, 2071-2077.
- Ohta, T., Sasaki, S., Oohori, T., Yoshikawa, S., Kurihara, H. (2002). α -Glucosidase Inhibitory Activity of a 70% Methanol Extract from Ezoishige (*Pelvetia babingtonii* de Toni) and Its Effect on the Elevation of Blood Glucose Level in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 66 (7), 1552-1554.
- Ojewole, J.A.O. (2005). Antinociceptive, Anti-inflammatory and Antidiabetic Effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) Leaf Aqueous Extract, *J. Ethnopharmacology*, 99, 13-19.
- Pal, S., Nag, A.K., Chaudhary, N. (1991). Studies on the Antiulcer Activity of *Bryophyllum pinnatum* Leaf Extract in Experimental Animals, *J. Ethnopharmacology*, 33, 97-102.
- Peng, Z.F., Strack, D., Baumert, A., Subramaniam, R., Goh, N.K., Chia, T.F., Tan, A.N., Chia, L.S. (2003). Antioxidant Flavonoids from Leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*, 62, 219-228.
- Rotshteyn, Y and Zito, S.W. (2004). Application of Modified In Vitro Screening Procedure for Identifying Herbals Possessing Sulfonylurea-like Activity. *Ethnopharmacol*, 93, 337-344.
- Soemardji, A.A. (2004). Penentuan Kadar Gula Darah Mencit Secara Cepat: Untuk Diterapkan dalam Penapisan Aktivitas Antidiabetes In Vivo. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, Vol. XXIX, No. 3, 115-116.
- Suba, V., Murugesan, T., Rao, B., Ghosh, L., Pal, M., Mandal, S.C., and Saha, B.P. (2004). Antidiabetic Potential of *Barleria lupulina* Extract in Rats. *Fitoterapia*, 75, 1-4.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi, H. (2000). New Insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1309-1311.

- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi, H., Murakami, A., Sakai, H., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. (2001). Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 947-949.
- Ueki, M., Abe, K., Hanafi, M., Shibata, K., Tanaka, T., and Taniguchi, M. (1996). UK-2A, B, C and D, Novel Antifungal Antibiotics from *Streptomyces* sp. 517-02. *J. antibiotics*, 49 (7), 639-643.
- Williams, D.H., Fleming, I. (1980). Spectroscopic Methods in Organic Chemistry. 3rd edition. London: McGraw-Hill Book Company (UK) Limited, 143.
- Yadav, N.P., Dixit, V.K. (2003). Hepatoprotective Activity of Leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. *J. Ethnopharmacology*, 86, 197-202.
- Zhong, X-N., Otsuka, H., Ide, T., Hirata, E., Takushi, A., Takeda, Y. (1997). Three Flavonol Glycosides from Leaves of *Myrsine seguinii*. *Phytochemistry*, 46 (5), 943-946.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan


Berdasarkan hasil penelitian yang telah diuraikan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- ⦿ Dari hasil isolasi diperoleh dua isolat, yaitu isolat A dan isolat B, yang berdasarkan hasil elusidasi menggunakan spektroskopi (UV/Vis, FTIR, LCMS dan FT-NMR) diidentifikasi sebagai Quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida dan Quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida.
- ⦿ Senyawa Quercetin-3-*O*- α -L-ramnosida mempunyai aktivitas biologi (antidiabetes, antioksidan, BSLT, sitotoksik terhadap sel kanker P-388) yang lebih tinggi dibandingkan senyawa Quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranosil(1 \rightarrow 2) α -L-ramnopiranosida .

5.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap senyawa lain yang terdapat dalam daun cocor bebek *Bryophyllum pinnatum* dan dalam bagian pohon yang lainnya.
- Perlu dilakukan uji aktivitas antidiabetes secara *in vivo* untuk mengetahui aktivitasnya lebih jauh.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Sampel Tanaman



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, 6 Maret 2011

Nomor : 348/IPH.1.02/If.8/III/2011
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Marisa
 LIPI Kimia Serpong


Dengan hormat,

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


No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Sosor Bebek	<i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken	Crassulaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

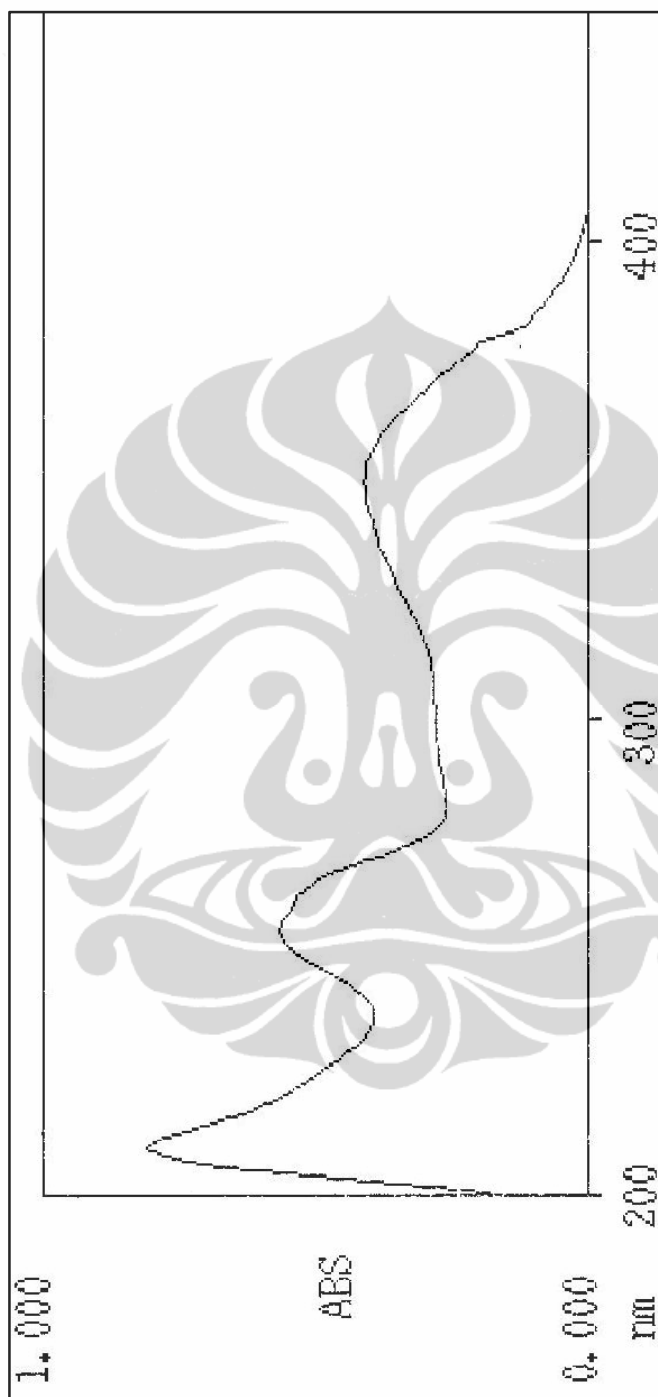


Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001



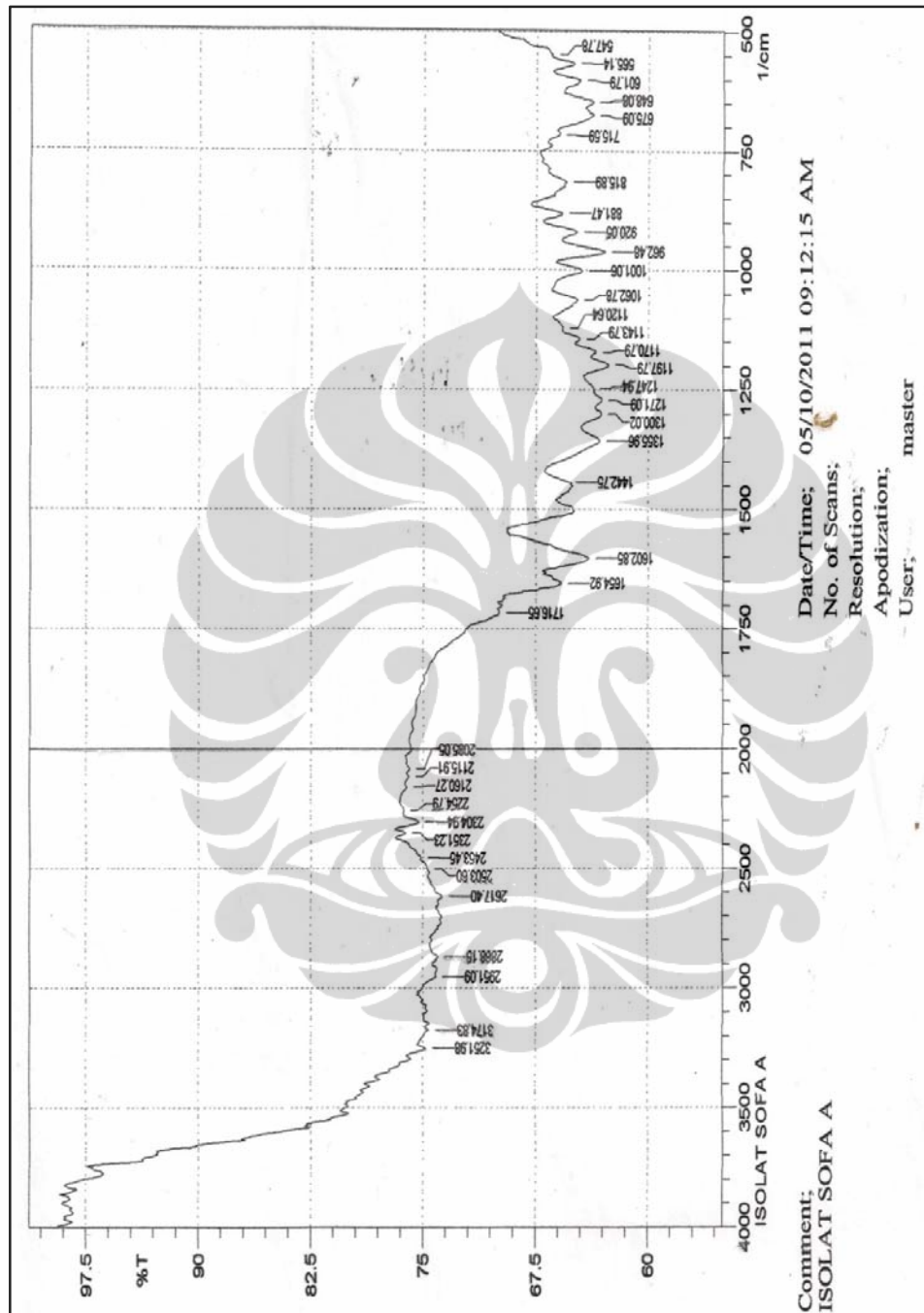
Universitas Indonesia

Lampiran 2. Spektrum UV-Vis Isolat A

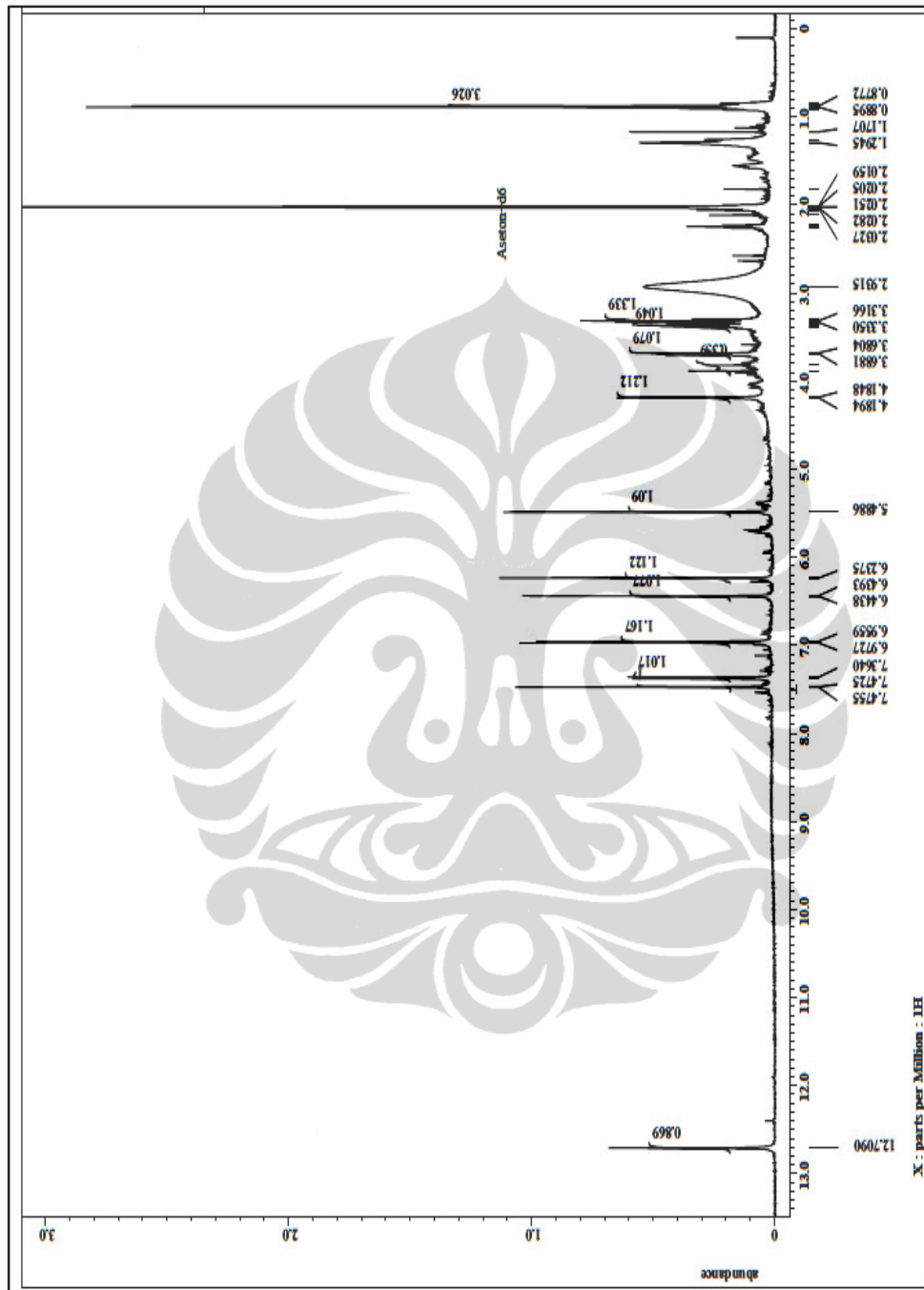


Universitas Indonesia

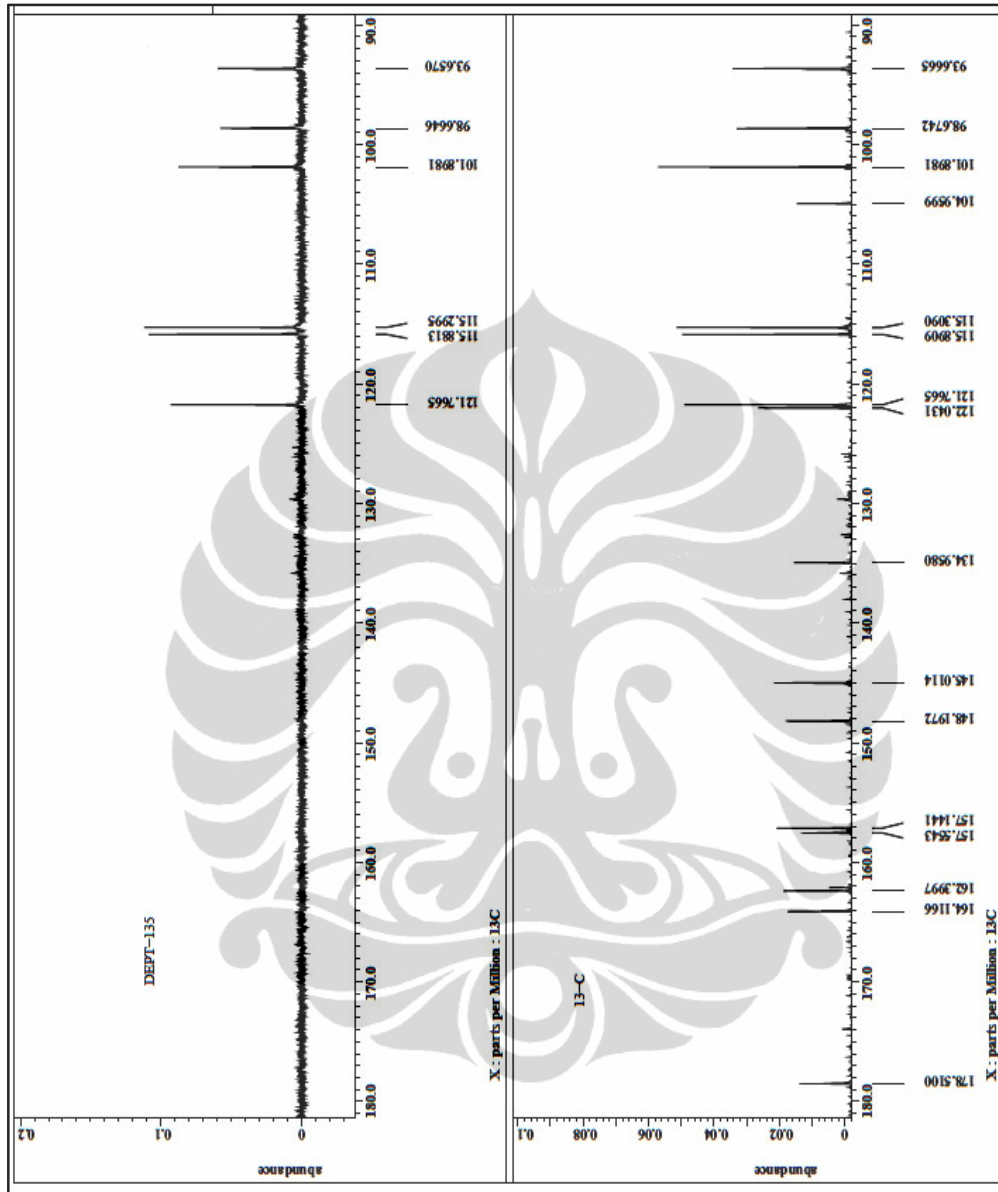
Lampiran 3. Spektrum IR Isolat A



Universitas Indonesia

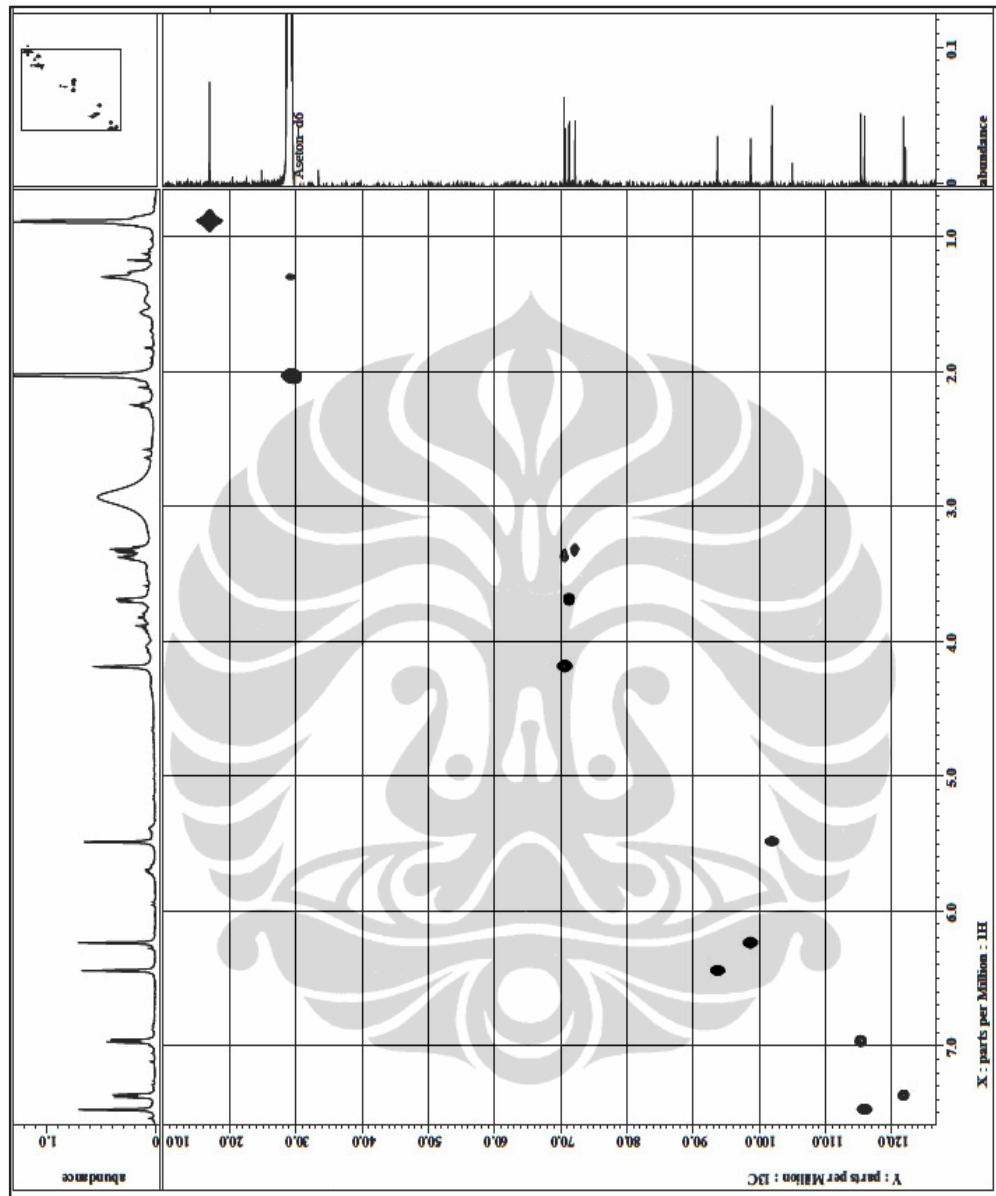
Lampiran 4. Spektrum ^1H -NMR Isolat A

Universitas Indonesia

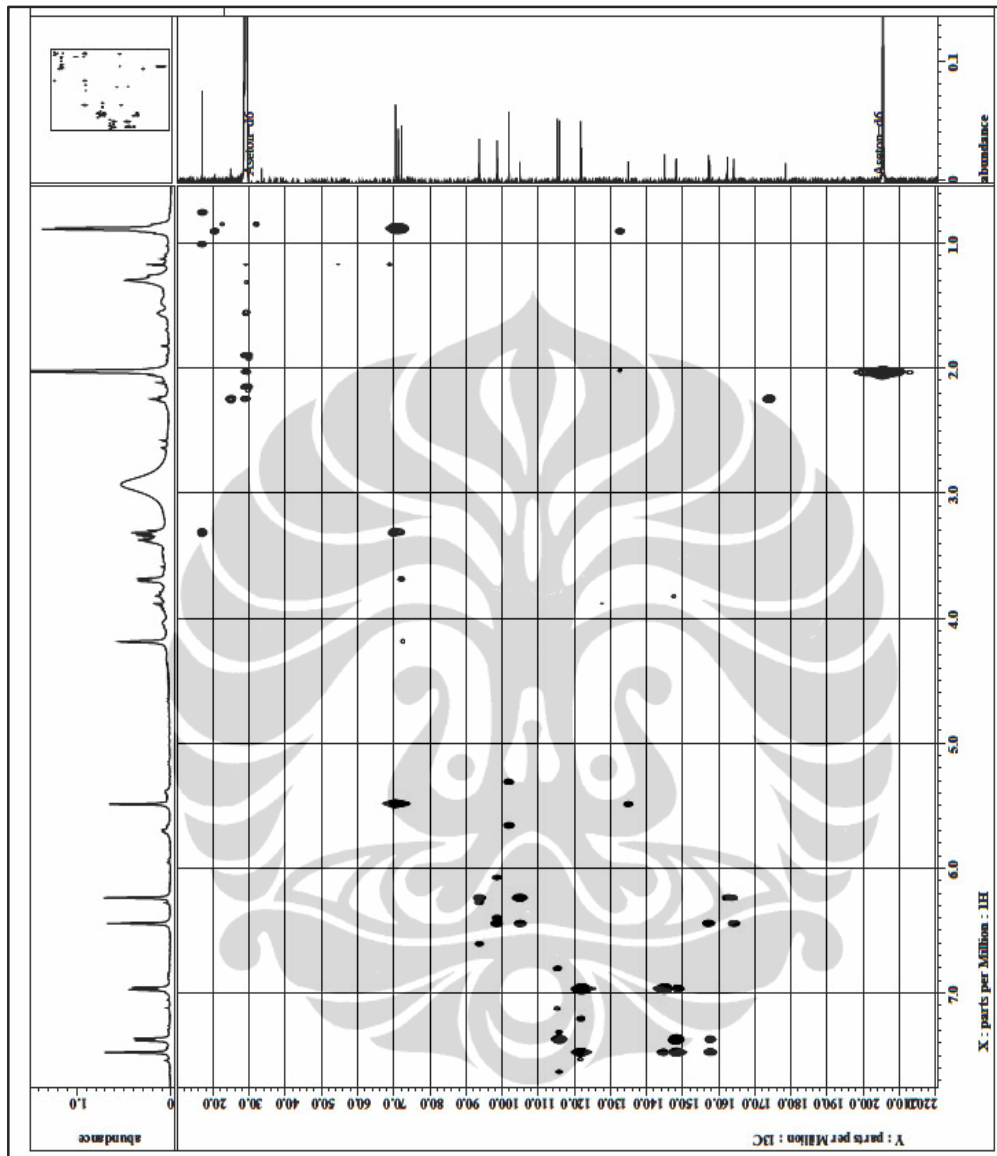
Lampiran 5. Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT 135 Isolat A

Universitas Indonesia

Lampiran 6. Spektrum HMQC Isolat A

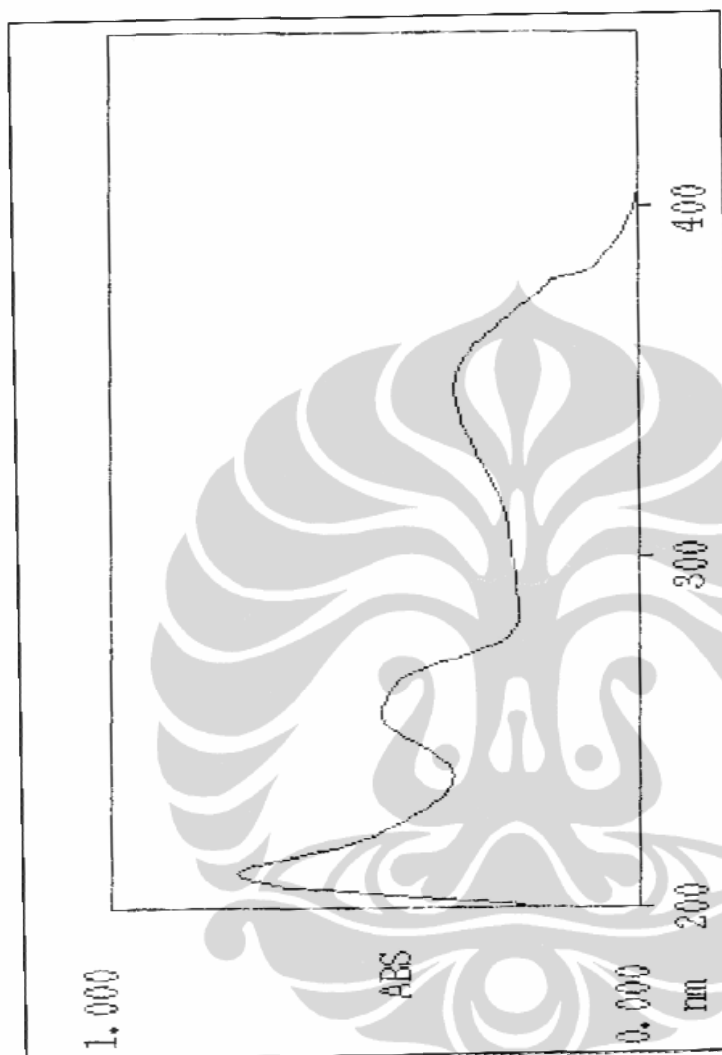


Lampiran 7. Spektrum HMBC Isolat A

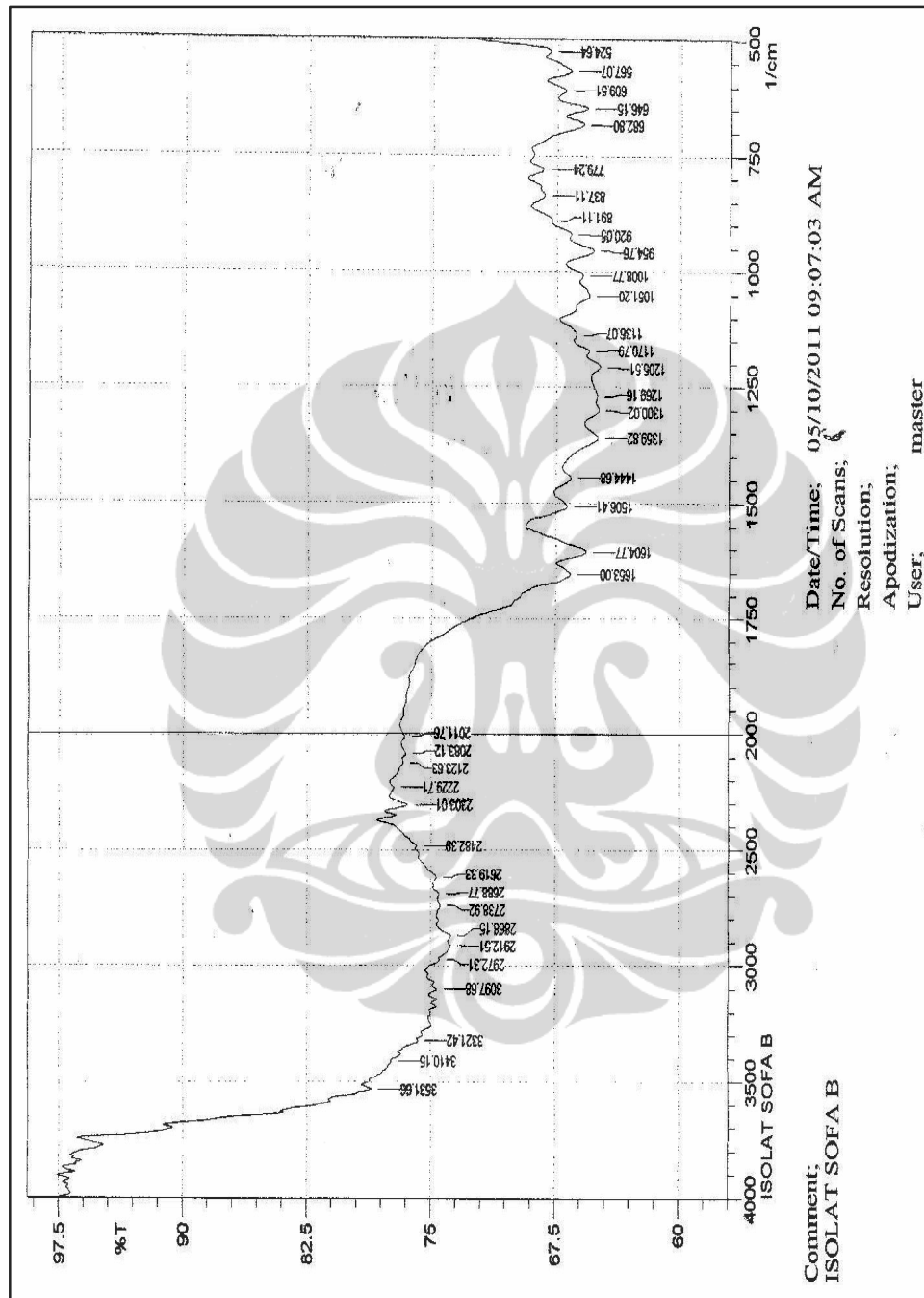


Universitas Indonesia

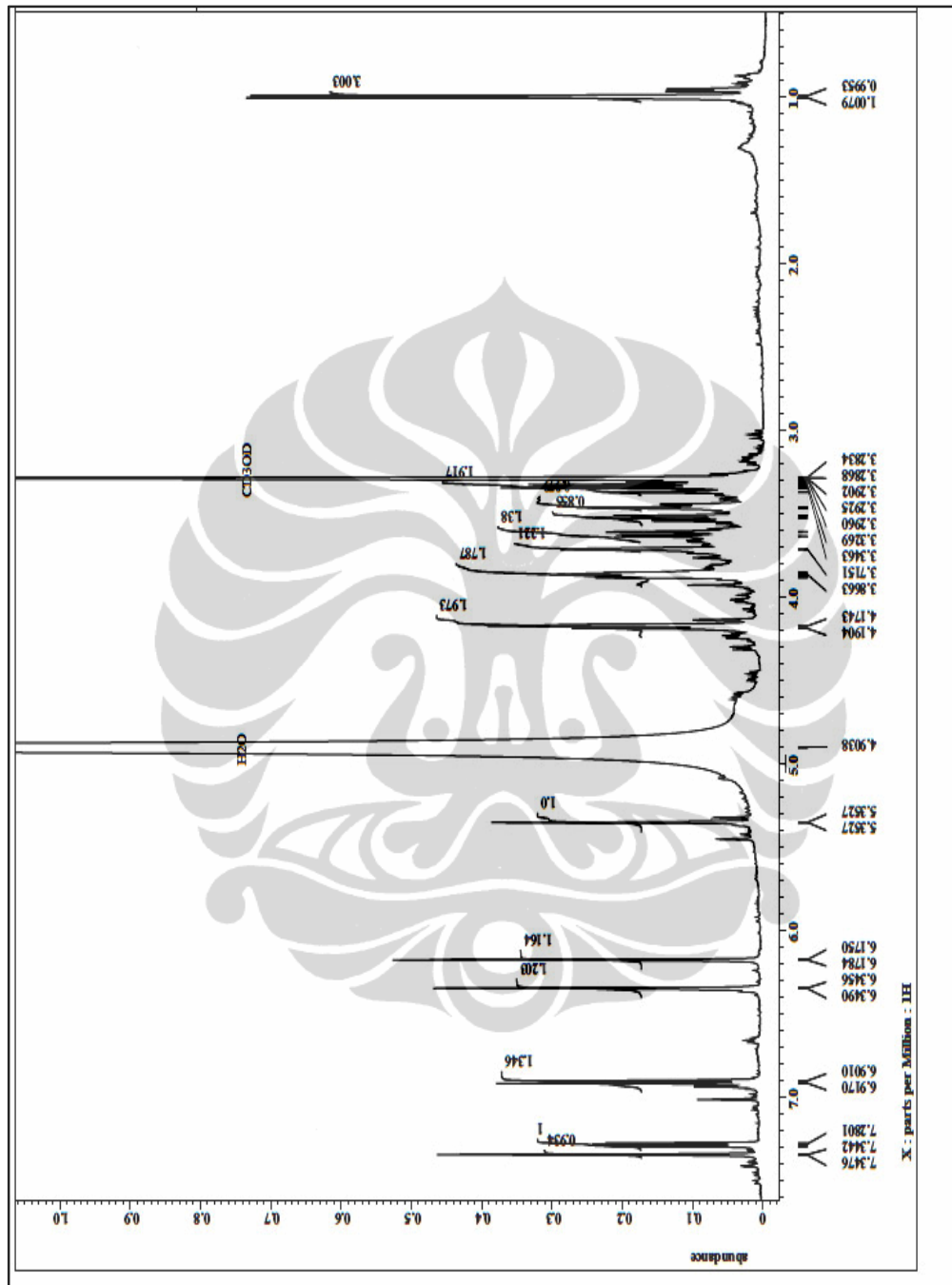
Lampiran 8. Spektrum UV/Vis Isolat B



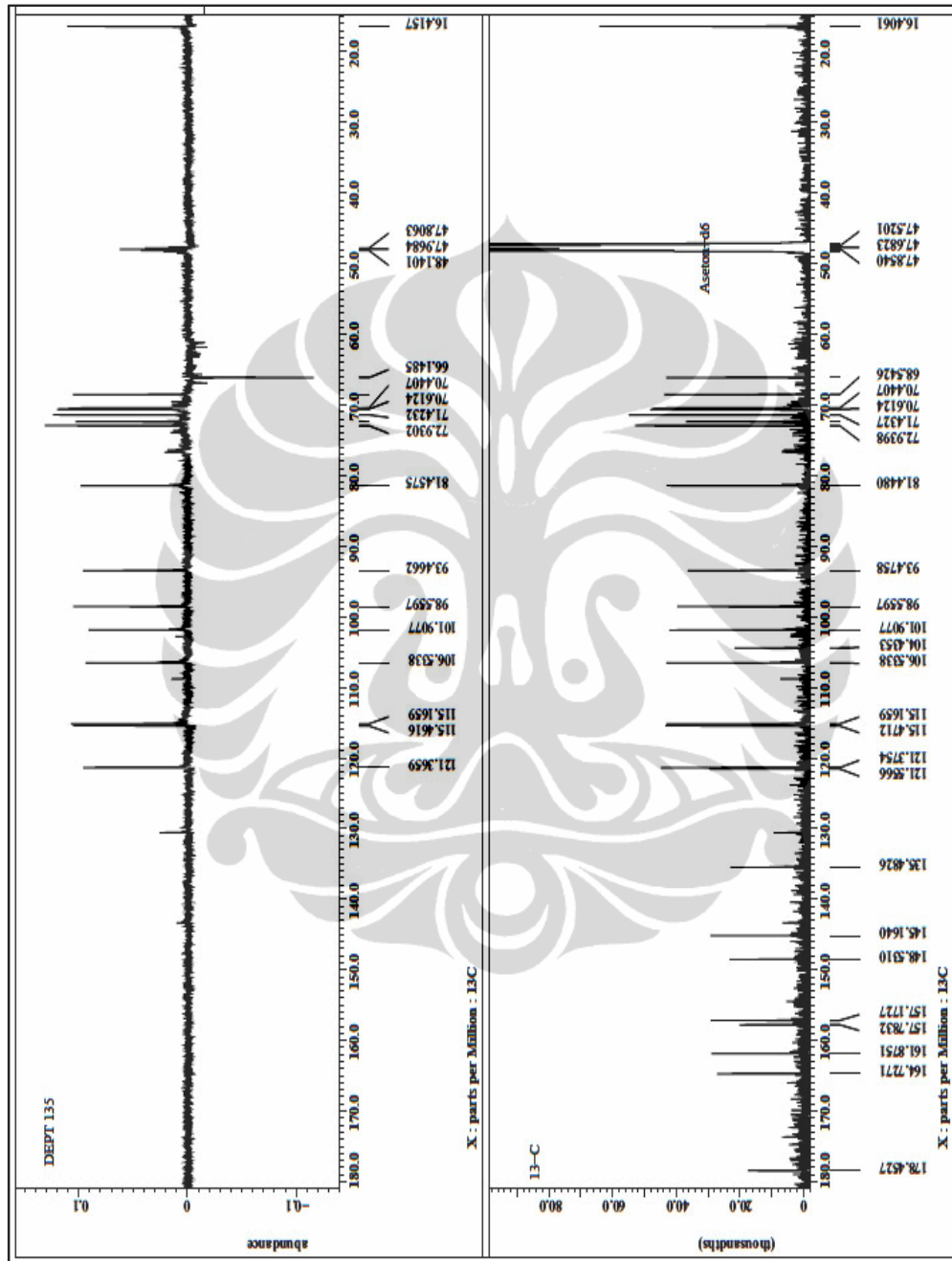
Lampiran 9. Spektrum FT-IR Isolat B



Universitas Indonesia

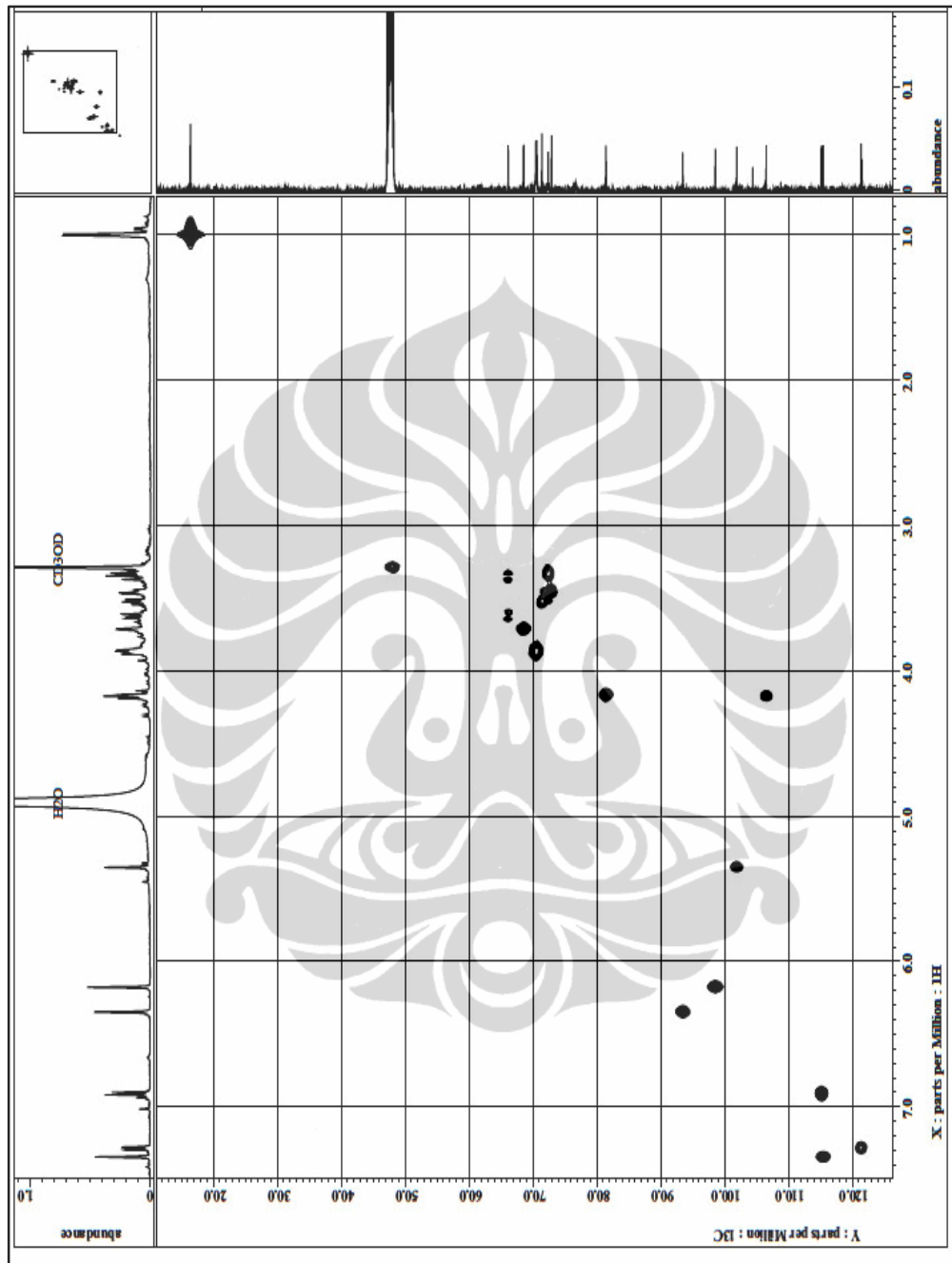
Lampiran 10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Isolat A

Universitas Indonesia

Lampiran 11. Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT 135 Isolat B

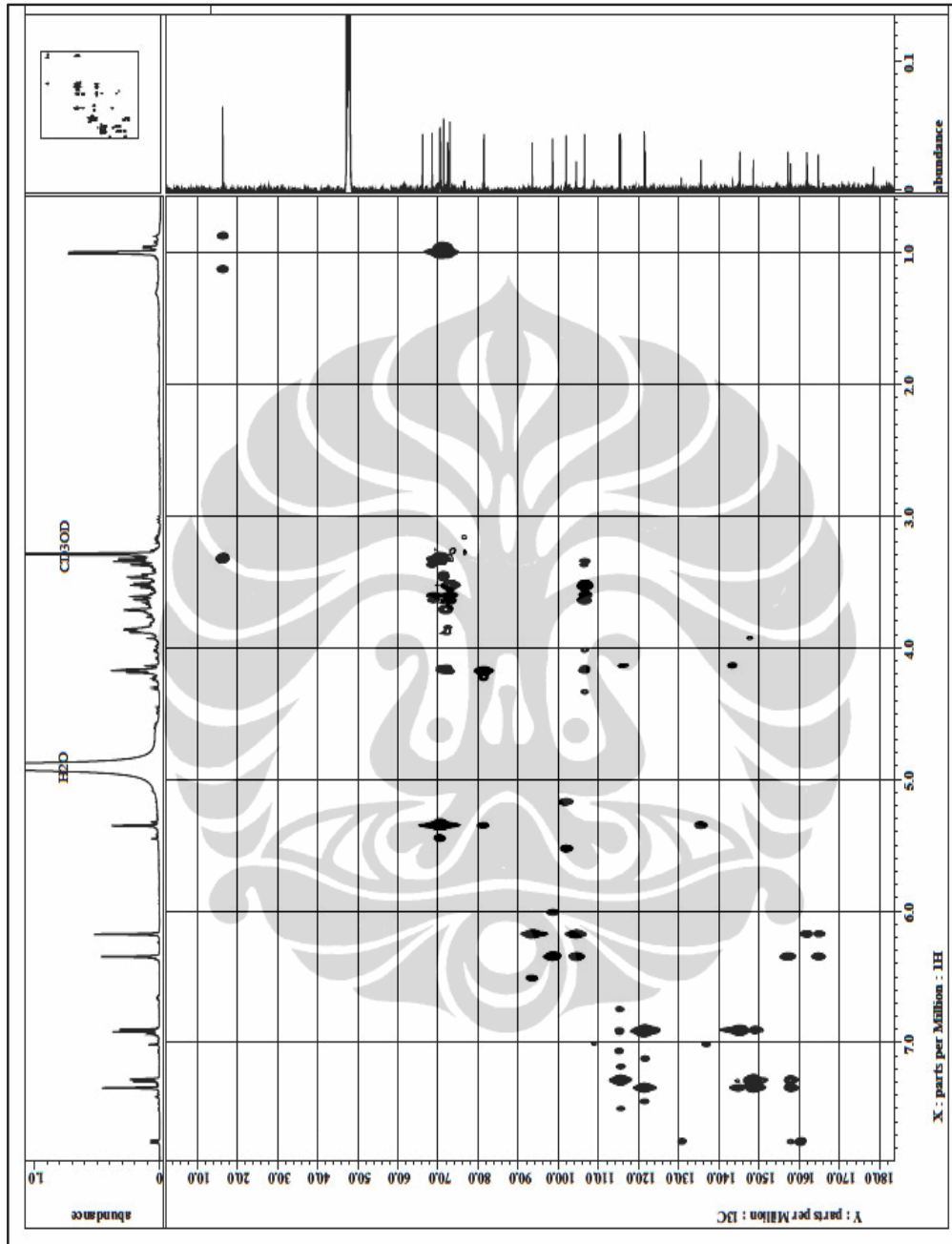
Universitas Indonesia

Lampiran 12. Spektrum HMQC Isolat B



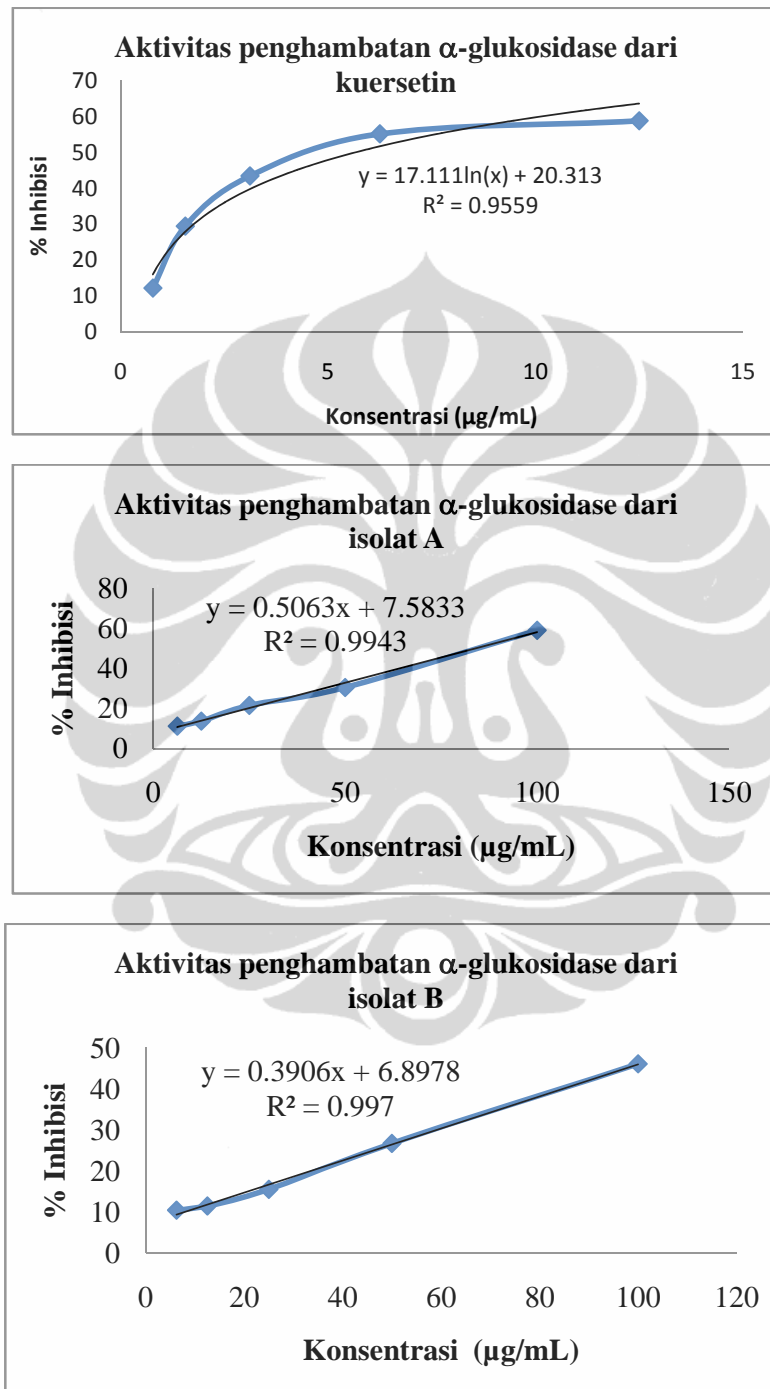
Universitas Indonesia

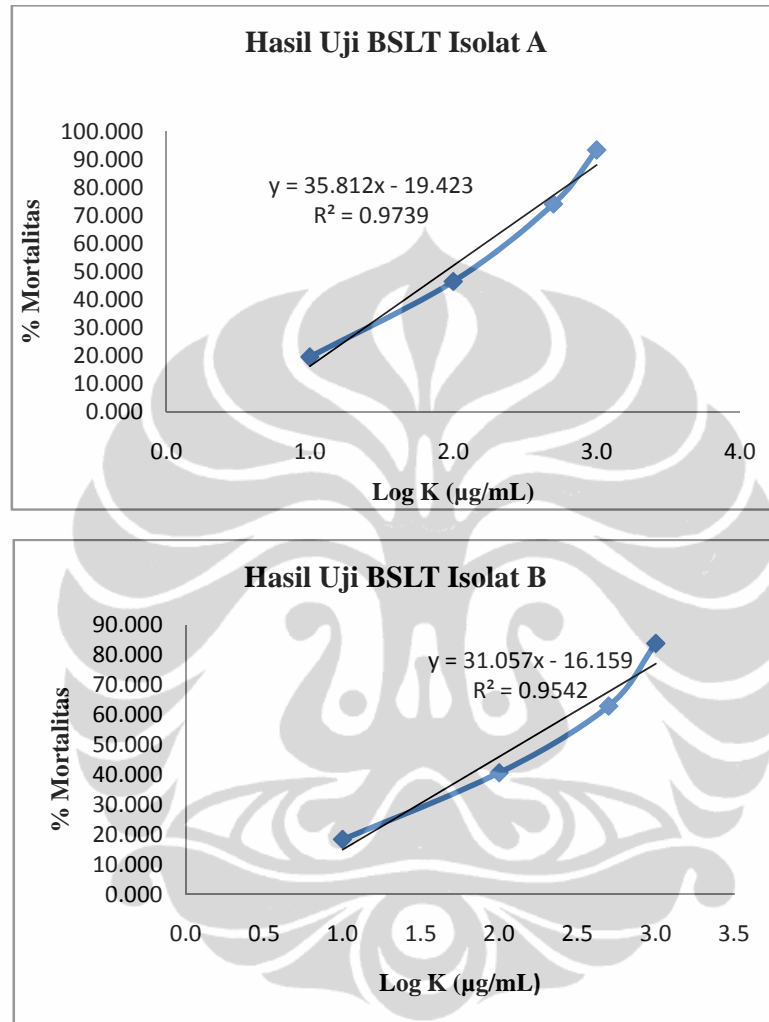
Lampiran 13. Spektrum HMBC Isolat B



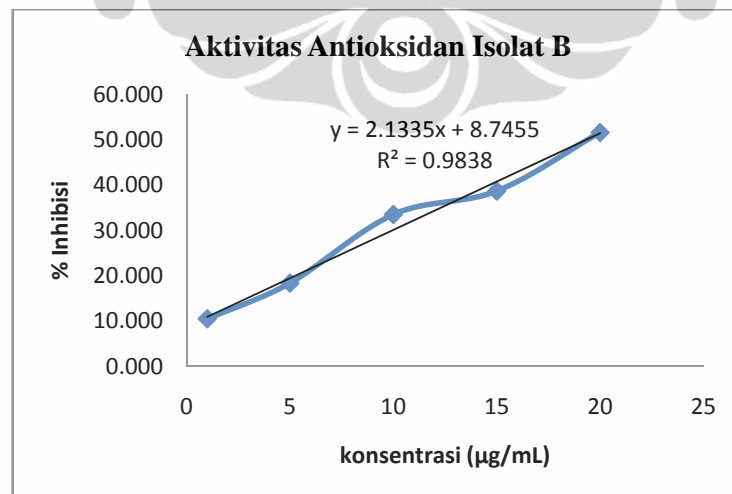
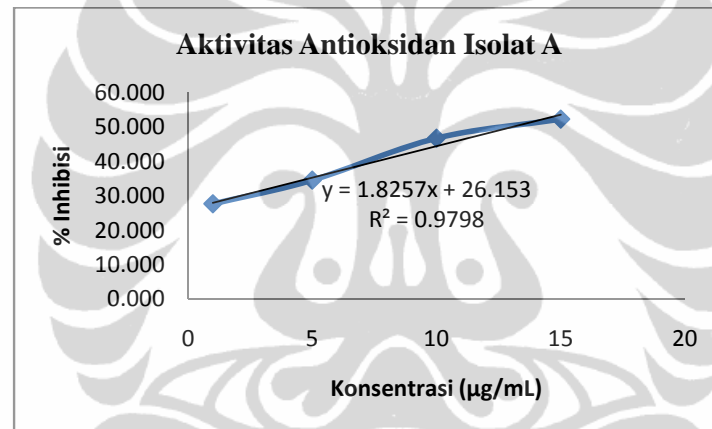
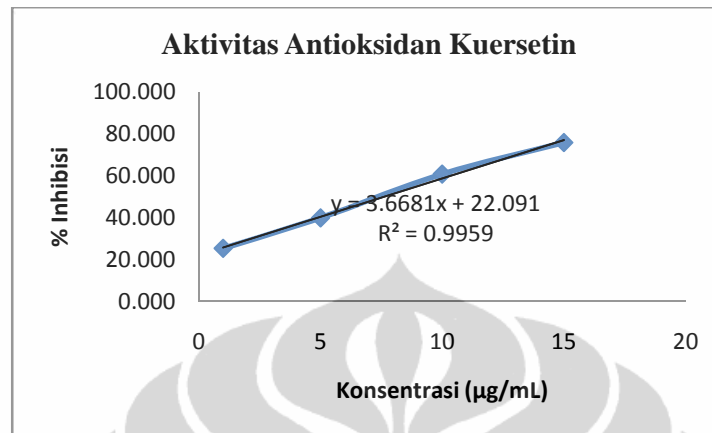
Universitas Indonesia

Lampiran 14. Grafik hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase terhadap kuersetin, isolat A dan isolat B




Lampiran 15. Grafik hasil uji BSLT (*Brine Shrimp Lethally Test*) isolat A dan B

Lampiran 16. Grafik hasil uji antioksidan dengan metode DPPH dari kuersetin, isolat A dan isolat B.



Lampiran 17. Hasil Uji Antikanker P-388 Isolat A

 **Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam**
Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung
Jalan Ganesha 10, Bandung 40132

Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap
Sel Murine Leukemia P388
[ex HSRRB Lot Number : 113098 seed (JCRB0017)]



Tanggal penerimaan : 4 Maret 2011

Tanggal pengerjaan : 8 Maret 2011

Nama sampel : F50

Nilai IC₅₀ : 60 µg/ml

Analisis : Suzany, d.s.

 Pengelola,

Dr. Lia D. Juliawaty

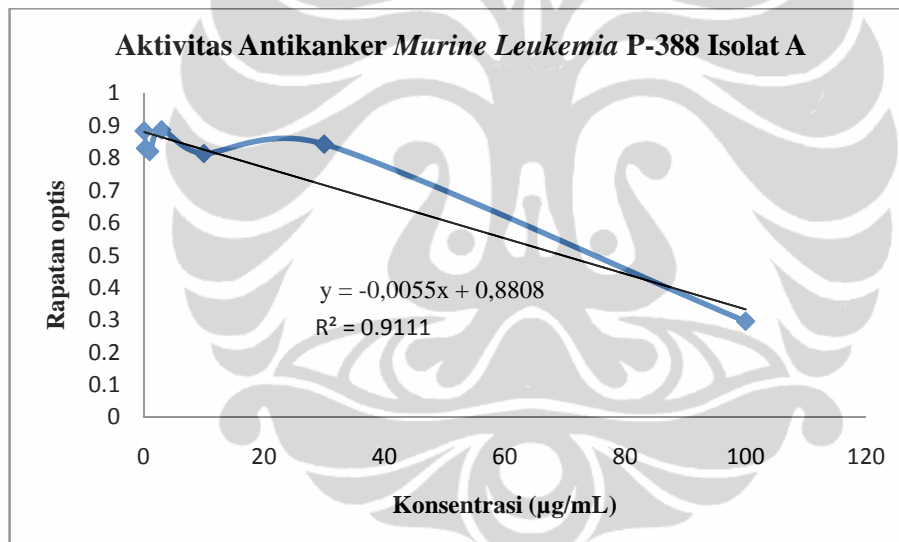
Universitas Indonesia

Lampiran 18. Perhitungan IC_{50} uji antikanker *Murine leukemia* P-388 dari isolat A

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rapatan optis
100	0,296
30	0,843
10	0,814
3	0,887
1	0,820
0,3	0,830
0,1	0,884

Kontrol positif : larutan PBS (*phosphoric buffer solution*) dan DMSO, rapatan optis 1,054

Kontrol negatif : larutan PBS (*phosphoric buffer solution*), rapatan optis 1,043



Perhitungan IC_{50} isolat A:




$$y = bx + a,$$

$$\text{dimana } y = \frac{1}{2} \text{ rapatan optis kontrol positif} = \frac{1}{2} \times 1,054 = 0,527$$

$$y = -0,0055x + 0,8808$$

$$x = \frac{0,527 - 0,8808}{-0,0055} = 64,3 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 19. Hasil Uji Antikanker P-388 Isolat B

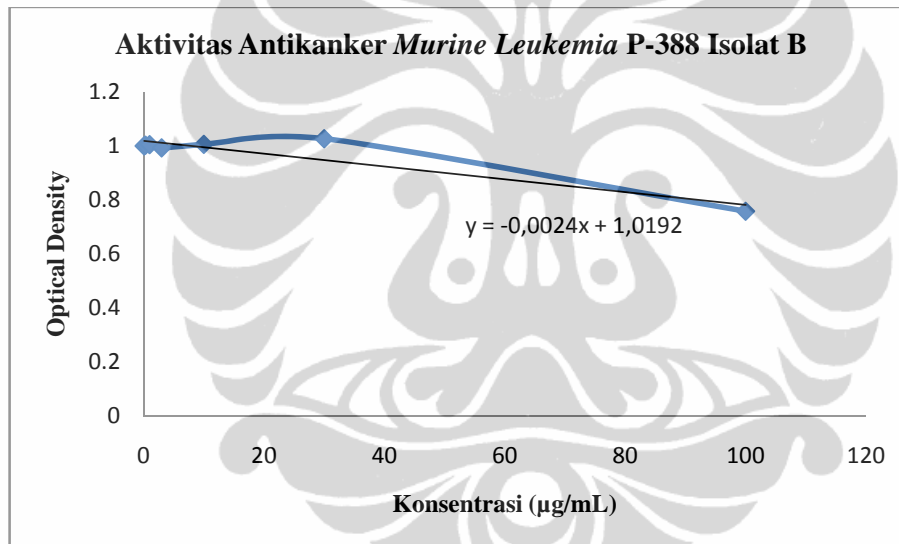
	Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung Jalan Ganesha 10, Bandung 40132
Hasil Bioassay Sitotoksik terhadap Sel Murine Leukemia P388 [ex HSRRB Lot Number : 113098 seed (JCRB0017)]	
Tanggal penerimaan	: <u>4 Maret 2011</u>
Tanggal pengerjaan	: <u>8 Maret 2011</u>
Nama sampel	: <u>F9 K2a</u>
Nilai IC ₅₀	: <u>> 100</u> µg/ml
Analisis	: <u>Suzany . de .</u>
 Pengelola,  Dr. Lia D. Juliaty	

Lampiran 20. Perhitungan IC_{50} uji antikanker *Murine leukemia* P-388 dari isolat B

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rapatan optis
100	0,758
30	1,027
10	1,006
3	0,993
1	1,005
0,3	1,003
0,1	1,000

Kontrol positif : larutan PBS (*phosphoric buffer solution*) dan DMSO, rapatan optis 1,054

Kontrol negatif : larutan PBS (*phosphoric buffer solution*), rapatan optis 1,043



Perhitungan IC_{50} isolat B:

$$y = bx + a,$$

$$\text{dimana } y = \frac{1}{2} \text{ rapatan optis kontrol positif} = \frac{1}{2} \times 1,054 = 0,527$$

$$y = -0,0024x + 1,0192$$

$$x = \frac{0,527 - 1,0192}{-0,024} = 205,1 \mu\text{g/mL}$$

Universitas Indonesia