



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS
MENGUNAKAN *Artemia salina* Leach DARI FRAKSI AKTIF
EKSTRAK METANOL DAUN ASA TUNGGGA
[*Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder]**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**DEWI MURNI
0806453541**

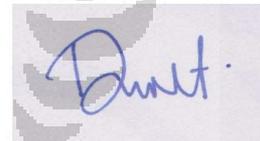
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan dibawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012



Dewi Murni

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Dewi Murni

NPM : 0806453541

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

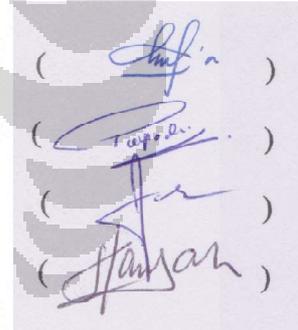
Skripsi ini diajukan oleh :

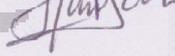
Nama : Dewi Murni
NPM : 0806453541
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Asa Tunga [*Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder]

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt
Pembimbing II : Dra. Puspa Dewi N.L., M.Eng
Penguji I : Dr. Katrin, M.S., Apt
Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt



()
()
()
()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah *rabbil'alamin*, puji syukur atas kehadiran Allah *Subhana wa Ta'ala*, yang atas izin-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulisan skripsi ini tidaklah mudah. Banyak sekali pihak yang telah membantu, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini diselesaikan. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Berna Elya, M.Si., Apt dan Ibu Dra. Puspa Dewi N. L, M.Eng selaku dosen pembimbing skripsi yang telah menyediakan waktu, bantuan, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi;
2. Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si.,Apt selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama masa perkuliahan.
3. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
4. Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen;
5. Pusat Penelitian Kimia LIPI yang telah memberikan kesempatan, fasilitas dan dana untuk penelitian ini.
6. Bapak M Hanafi selaku kepala bidang Bahan Alam dan Farmasi Pusat Penelitian Kimia LIPI
7. Pihak Lab Kimia LIPI yang banyak membantu dalam penelitian : Ibu Lia, Ibu Mega, Pak Ahmad, Pak Udin, Bu Lala, Bu Teni, Bu Tati dan para pegawai lainnya;
8. Kedua orang tua, Mama Sutono dan Mimi Danisa yang selalu memberikan doa dan dukungan yang tak pernah henti demi kelancaran dan kesuksesan skripsi yang telah dijalani;

9. Adik-adikku tersayang Anipa dan Fajar yang selalu membuatku tersenyum dengan dukungan dan semangat dari mereka serta Mang Ju yang telah membantu dari awal perkuliahan;
10. Sahabat seperjuangan di Lab Kimia LIPI Lisa, Mbak Dila, Bu Dwi, Ziah, Toto, Putri, Tita, Nurul yang telah menemani dan berbagi suka, duka, canda, tawa, dan air mata selama penelitian ini;
11. Sahabat seperjuangan yang bersama-sama melewati indahny masa perkuliahan di Farmasi “SUJA huhahaha”- Elsa, Mamik, Lia, Rahmi, Suci
12. Sahabat yang tak lekang waktu “D’chongerz” yang selalu membagi canda, tawa, beban, dan air mata dalam hidup – Nana, Nurul, Aum, Njul, Dyan, Ayu, Fa;
13. Sahabat dikosan “Congmal” Imah (sister), Iri, Septi, Dani
14. Sahabat yang selalu mengerti dan memahami, Meiyani Nurhayati
15. Sahabat dikosan Pondok Dara Lisa, Devi, dan Mayang
16. Keluarga Farmasi (kak umi, sister Imah, cucu Marissa, keponakan Jade dan Ella)
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan skripsi ini

Penulis sadar tak mampu memberikan sesuatu yang lebih berharga selain ucapan terima kasih dan berdoa semoga Allah membalas segala kebaikan mereka dengan sesuatu yang lebih baik lagi. Semoga penulisan skripsi ini dapat berguna bagi ilmu pengetahuan khususnya pengembangan ilmu kefarmasian sehingga dapat dirasakan manfaatnya oleh seluruh lapisan masyarakat.

Penulis

2012

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

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

Nama : Dewi Murni
NPM : 0806453541
Program Studi : Sarjana
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

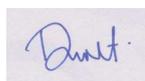
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak untuk melanjutkan penelitian untuk kepentingan akademis dan kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Asa Tungga [*Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder]

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, LIPI berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta, dan Universitas Indonesia berhak untuk menyimpan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dengan tidak mempublikasikan tanpa izin dari pihak LIPI seperti pada perjanjian kerjasama penelitian antara pihak mahasiswa dan pihak LIPI.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 9 Juli 2012
Yang menyatakan



(Dewi Murni)

viii

ABSTRAK

Nama : Dewi Murni
Program Studi : S1 Farmasi
Judul : Isolasi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Asa Tunga [*Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder]

Lithocarpus celebicus (Miq.) Rehder merupakan tanaman yang masih sedikit dieksplorasi aktivitas biologisnya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serta uji toksisitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dan mendapatkan isolat murni yang memiliki aktivitas antioksidan dan toksisitas. Daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder diekstraksi menggunakan pelarut metanol kemudian dipartisi berturut-turut dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol dan metanol. Hasil uji menunjukkan bahwa daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ berturut-turut menunjukkan nilai 57,47; 159,23; 48,25; 23,81 dan 27,08 µg/mL serta toksisitas dengan nilai LC₅₀ 669,42; 125,73; 79,55; 223,31 dan 523,58 µg/mL. Hasil identifikasi golongan senyawa diketahui ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder mengandung golongan senyawa flavonoid, tanin, glikosida, saponin, dan terpenoid. Isolasi dilakukan pada fraksi etil asetat dengan teknik kromatografi kolom dipercepat dan konvensional (fase diam silika gel). Isolat yang diperoleh di karakterisasi menggunakan metode spektrofotometri uv-vis dan resonansi magnetik inti (¹HRMI dan ¹³CRMI). Isolat tersebut selanjutnya disebut senyawa LC, memiliki nilai IC₅₀ 431,90 µg/mL dan LC₅₀ 24,80 µg/mL. Senyawa LC berhasil diisolasi dari fraksi *n*-heksan:etil asetat (95:5) kolom konvensional yang diduga metilsinamat dengan rumus molekul C₁₀H₁₀O₂.

Kata Kunci : antioksidan, *Artemia salina* Leach, asa tungga, DPPH, *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder, toksisitas.
xvii + 103 halaman ; 23 gambar; 12 tabel; 10 lampiran
Daftar Acuan : 55 (1958-2012)

ABSTRACT

Name : Dewi Murni
Program study : S1 Pharmacy
Title : Isolation, Antioxidant Assay and Toxicity using *Artemia salina* Leach from Active Fraction of Methanolic Extract of Asa Tunga [*Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder] Leaves

Biological activity of *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder is unexplored. Therefore, this study performed its antioxidant activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method as well as toxicity using *Artemia salina* Leach and get pure compound that have antioxidant and toxicity activities. Leaves of *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder extracted with methanol and then partitioned successively with *n*-hexane, ethyl acetate, butanol and methanol. The results showed that leaves of *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder have antioxidant activity with IC₅₀ values 57,47; 159,23; 48,25; 23,81 and 27,08 µg/ml, respectively. However, toxicity activity showed LC₅₀ values 669,42; 125,73; 79,55; 223,31 and 523,58 µg/mL, respectively. Identification groups compound known methanol extract, ethyl acetate and *n*-butanol fraction of *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder leaves containing flavonoid, tannin, glycoside, terpenoid and saponin. Isolation was done to ethyl acetate fraction by column chromatography (silica gel). Pure compound obtained from fraction of *n*-hexane: ethyl acetate (95:5), called LC compound. The compound was characterization by spectrophotometry uv-vis and nuclear magnetic resonance (¹HNMR and ¹³CNMR). The result of antioxidant, LC compound showed IC₅₀ value 431,90 µg/mL and the result of toxicity, LC compound showed LC₅₀ value 24,79 µg/ml. Based on NMR data, LC compound have been found which has molecular formula C₁₀H₁₀O₂, known as methyl cinamate.

Key Words : antioxidant, *Artemia salina* Leach, asa tungga, DPPH, *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder, toxicity.

xvii + 103 pages ; 23 pictures; 12 tables; 10 appendices

Bibliography : 55 (1958-2012)

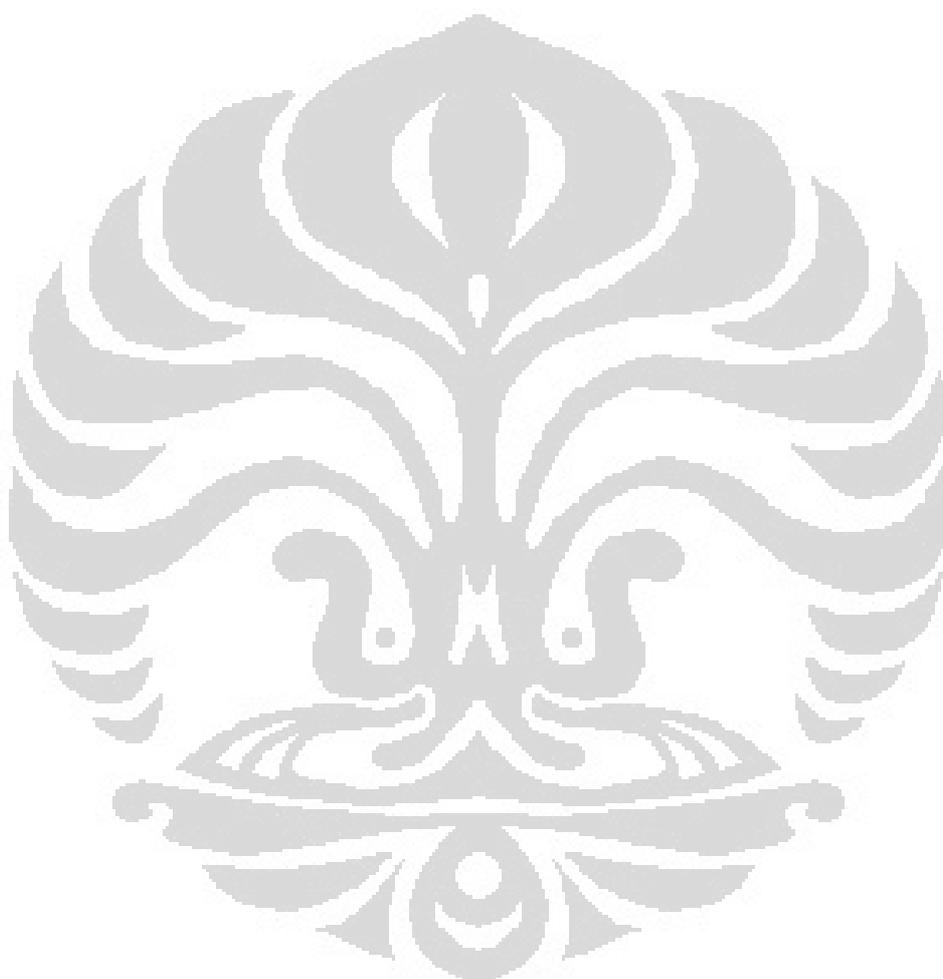
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Marga <i>Lithocarpus</i>	4
2.2 <i>Lithocarpus celebicus</i>	5
2.2.1 Taksonomi	5
2.2.2 Morfologi Tumbuhan	5
2.2.3 Distribusi Geografis, Habitat dan Ekologi	6
2.2.4 Manfaat	7
2.2.5 Kandungan Kimia	7
2.3 Kandungan Kimia Marga <i>Lithocarpus</i>	7
2.3.1 Terpen	7
2.3.2 Dihidrokalikon	10
2.4 Ekstraksi.....	11
2.4.1 Cara Dingin	12
2.4.1.1 Maserasi	12
2.4.1.2 Perkolasi	12
2.4.2 Cara Panas	13
2.4.2.1 Refluks	13
2.4.2.2 Soxhlet	13
2.4.2.3 Digesti	14
2.4.2.4 Infus	14
2.4.2.5 Dekok	14
2.5 Penapisan Fitokimia.....	14
2.5.1 Alkaloid	15
2.5.2 Glikosida	15

2.5.3 Saponin	15
2.5.4 Flavonoid	16
2.5.5 Terpen	16
2.5.6 Tanin	17
2.5.7 Kuinon	17
2.6 Kromatografi Lapis Tipis.....	18
2.6.1 Fase Diam	18
2.6.2 Fase Gerak	19
2.6.3 Aplikasi (Penotolan) Sampel	19
2.6.4 Pengembangan	20
2.6.5 Deteksi Bercak	20
2.7 Kromatografi Kolom.....	21
2.7.1 Kromatografi Penyerapan	21
2.7.2 Kromatografi Pembagian	22
2.8 Radikal Bebas dan Antioksidan.....	23
2.8.1 Radikal Bebas	23
2.8.2 Antioksidan	26
2.9 Uji Aktivitas Antioksidan	28
2.9.1 Metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)	28
2.9.2 Metode ABTS	29
2.9.3. Metode <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (ORAC)	31
2.9.4. Metode <i>Ferric Reducing/Antioxidant Power</i> (FRAP)	32
2.10 Uji Toksisitas	32
2.10.1 <i>Artemia salina</i> Leach	33
2.10.1.1 Klasifikasi	33
2.10.1.2 Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach	34
2.10.1.3 Penetasan Telur	34
2.11 Spektrofotometri Ultraviolet dan Cahaya Tampak.....	34
2.12 Resonansi Magnetik Inti	37
BAB III METODE PENELITIAN	39
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	39
3.2 Alat	39
3.3 Bahan.....	39
3.3.1 Simplisia	39
3.3.2 Hewan Uji	39
3.3.3 Bahan Kimia	39
3.3.4 Bahan Pembanding	40
3.4 Prosedur Pelaksanaan	40
3.4.1 Diagram Alir Penelitian	40
3.4.2 Persiapan Bahan Uji	40
3.4.2.1 Persiapan Simplisia Uji	40
3.4.2.2 Ekstraksi	41
3.4.2.3 Fraksinasi	41
3.4.3 Penapisan Fitokimia	42

3.4.3.1 Identifikasi Alkaloid	42
3.4.3.2 Identifikasi Gula	43
3.4.3.3 Identifikasi Saponin	43
3.4.3.4 Identifikasi Flavonoid	43
3.4.3.5 Identifikasi Terpen	44
3.4.3.6 Identifikasi Tanin	44
3.4.3.7 Identifikasi Antrakuinon	44
3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan	45
3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH	45
3.4.4.2 Optimasi Panjang Gelombang DPPH	45
3.4.4.3 Pengukuran Absorbansi Larutan Blanko	45
3.4.4.5 Pengujian Larutan Pembanding	45
3.4.4.6 Pengujian Ekstrak	46
3.4.4.7 Perhitungan	46
3.4.5 Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>	47
3.4.5.1 Penetasan Telur <i>Artemia salina</i> L.	47
3.4.5.2 Pembuatan Larutan Uji	47
3.4.5.3 Pengujian	47
3.4.6 Isolasi dan Pemurnian Senyawa	48
3.4.7 Penentuan Struktur Senyawa Murni	49
3.4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis 2 Arah	49
3.4.7.2 Pemeriksaan Spektrum UV-VIS	49
3.4.7.3 Pemeriksaan Spektrum Resonansi Magnet Inti	49
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	50
4.1 Penyiapan Simplisia	50
4.2 Ekstraksi Simplisia	50
4.3 Fraksinasi	51
4.4 Penapisan Fitokimia	52
4.4.1 Alkaloid	52
4.4.2 Gula	53
4.4.3 Saponin	55
4.4.4 Flavonoid	55
4.4.5 Terpen	56
4.4.6 Tanin	56
4.4.7 Antrakuinon	57
4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	57
4.6 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT	59
4.7 Isolasi dan Pemurnian Senyawa	60
4.8 Penentuan Struktur Senyawa Murni	62
4.9 Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Murni	64

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	65
5.1 Kesimpulan	65
5.2 Saran.....	65
DAFTAR ACUAN.....	66

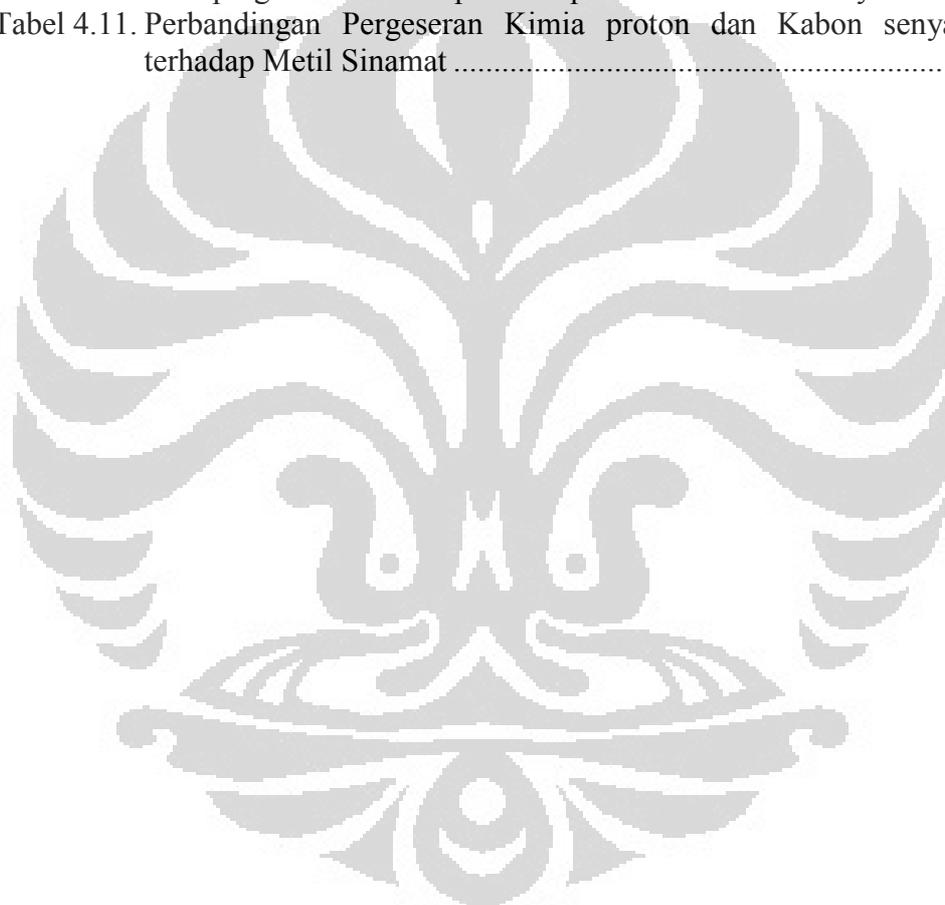


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tanaman dan buah <i>Lithocarpus celebicus</i> (Miq.) Rehder	6
Gambar 2.2.	Rumus struktur a. 3-metoksioleana-2,12-diene-1-one, b. olean-12-en-1,3-dione.....	8
Gambar 2.3.	Rumus Struktur 2,3-secofriedelano-3,2-lakton.....	10
Gambar 2.4	Rumus Struktur 6''-O-asetiltrilobatin dan 3''-O-asetilflorizin.....	10
Gambar 2.5.	Rumus Struktur (1) trilobatin 2''-asetat, (2) florizin dan (3) trilobatin	11
Gambar 2.6.	Perkolator	13
Gambar 2.7.	Pembentukan spesies oksigen reaktif (SOR) di mitokondria	24
Gambar 2.8	Pembentukan SOR di retikulum endoplasma dan fagosit	25
Gambar 2.9.	Keseimbangan pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (SOR) dan pertahanan antioksidan	26
Gambar 2.10.	Reaksi antara radikal bebas DPPH· dan antioksidan (RH)	29
Gambar 2.11.	Pembentukan radikal ABTS stabil dari ABTS dengan kalium persulfat	30
Gambar 2.12.	Pembentukan kompleks (Fe^{2+} -TPTZ) dari kompleks (Fe^{3+} -TPTZ) oleh antioksidan	32
Gambar 4.1.	Reaksi Mollisch	54
Gambar 4.2.	Identifikasi gugus gula dengan pereaksi Mollisch	71
Gambar 4.3.	Identifikasi saponin dengan pengocokan menggunakan air panas serta penambahan HCl 2N.....	71
Gambar 4.4.	Identifikasi terpen dengan pereaksi Liebermann-Bouchard	72
Gambar 4.5.	Identifikasi tanin dengan pereaksi $FeCl_3$	73
Gambar 4.6.	Reaksi antara radikal bebas DPPH· dan antioksidan (RH)	57
Gambar 4.7.	Spektrum optimasi panjang gelombang DPPH	73
Gambar 4.8.	Uji kualitatif aktivitas antioksidan fraksi gabungan dengan pereaksi semprot DPPH.....	74
Gambar 4.9.	Spektrum uv-vis senyawa LC.....	74
Gambar 4.10.	Dugaan struktur kimia senyawa LC yaitu metil sinamat.....	63
Gambar 4.11.	Rumus struktur 2''-O-(4-Hidroxy-E-cinnamoyl).....	64

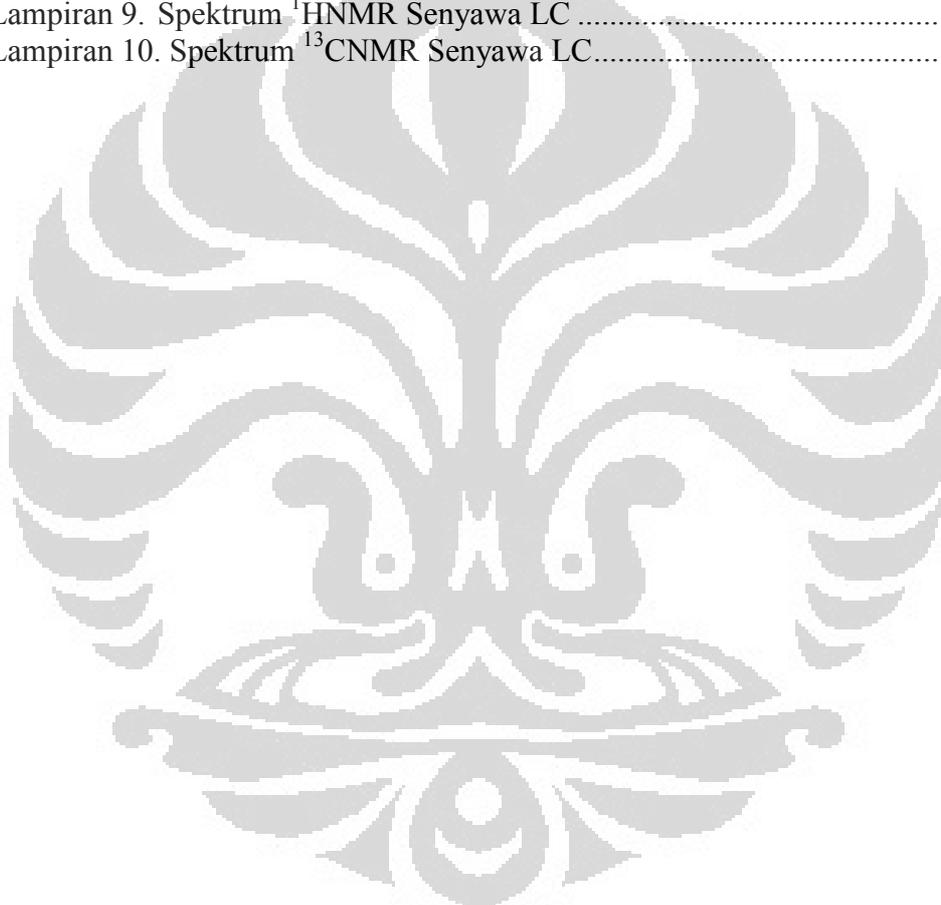
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Triterpenoid Asam dari 10 Jenis <i>Lithocarpus</i>	9
Tabel 4.1. Berat Fraksi dan Rendemen Hasil Partisi.....	75
Tabel 4.2. Berat Fraksi dan Rendemen Hasil Partisi.....	75
Tabel 4.3. Hasil Identifikasi Golongan Senyawa.....	75
Tabel 4.4. Data Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Hasil Fraksinasi	76
Tabel 4.5. Data Uji Aktivitas Toksisitas Ekstrak dan Hasil Fraksinasi	78
Tabel 4.6. Hasil Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Vakum.....	79
Tabel 4.7. Data Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Fraksi Gabungan.....	80
Tabel 4.8. Data Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Murni.....	80
Tabel 4.9. Data Uji Aktivitas Toksisitas Senyawa LC.....	81
Tabel 4.10. Data pergeseran kimia spektrum proton dan karbon senyawa LC.....	81
Tabel 4.11. Perbandingan Pergeseran Kimia proton dan Karbon senyawa LC terhadap Metil Sinamat	82



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian.....	83
Lampiran 2. Skema Ekstraksi	84
Lampiran 3. Skema Fraksinasi.....	85
Lampiran 4. Skema Isolasi Senyawa	86
Lampiran 5. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC ₅₀ Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi	87
Lampiran 6. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC ₅₀ Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi	91
Lampiran 7. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC ₅₀ & LC ₅₀ Senyawa LC.....	94
Lampiran 8. Hasil Determinasi.....	95
Lampiran 9. Spektrum ¹ HNMR Senyawa LC	96
Lampiran 10. Spektrum ¹³ CNMR Senyawa LC.....	101



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan merupakan substansi yang dapat memperlambat atau menghambat kerusakan oksidatif suatu molekul target. Tubuh secara alami memproduksi antioksidan (antioksidan endogen) untuk menetralkan radikal bebas dan melindungi tubuh dari kerusakan jaringan namun proses ini tidak 100% efektif jika produksi radikal bebas terlalu berlebihan dan efektifitasnya juga menurun karena usia. Radikal bebas sebenarnya memiliki dua peranan didalam tubuh. Pada konsentrasi rendah atau sedang, radikal bebas terlibat dalam fungsi normal fisiologis, namun dalam jumlah yang berlebihan atau terjadi penurunan kadar antioksidan dapat menyebabkan stress oksidatif. Proses ini menjadi jalan terjadinya kerusakan struktur sel, termasuk lipid, protein, RNA dan DNA yang mengakibatkan timbulnya beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskuler, ginjal, tumor dan kanker (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy dan De, 2010). Berdasarkan data yang dirilis WHO pada akhir 2005, penyakit degeneratif telah menyebabkan kematian hampir 17 juta orang di seluruh belahan dunia (Pusat Promosi Kesehatan DepKes RI, 2009).

Salah satu solusi untuk mengatasi masalah diatas adalah dengan mengkonsumsi antioksidan dari luar tubuh. Tanaman merupakan sumber yang potensial karena telah banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional diseluruh dunia selama ribuan tahun. Kandungan senyawa tanaman yang diketahui berperan sebagai antioksidan antara lain flavonoid, alkaloid dan tanin (Meng et al., 2012; Rao et al., 2005; Zhou et al., 2011). Antioksidan alami ini memainkan peran sebagai pencegahan. Resiko efek samping dari penggunaan antioksidan sintetik seperti Butil Hidroksi Toluen (BHT) dan Butil Hidroksi Anisol (BHA) yang dapat menyebabkan kerusakan hati dan karsinogenesis menjadikan ketertarikan akan antioksidan alami meningkat (Krishnaiah, Sarbatly dan Nithyanandam, 2011).

Salah satu tanaman yang masih sedikit dieksplorasi aktivitas biologisnya adalah *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder yang dapat ditemui di hutan Gunung Mekongga, Sulawesi. Pada skrining awal terhadap ekstrak kasar yang dilakukan

oleh Laboratorium Bahan Alam Puslit Kimia LIPI didapatkan hasil bahwa tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan melalui metode peredaman radikal bebas DPPH dan toksisitas melalui metode *Brine Shrimp Lethality Test*. Selama ini penggunaan tanaman *L.celebicus* (Miq.) Rehder hanya sebatas pengambilan kayu oleh masyarakat sekitar untuk dijadikan perahu atau sampan yang menyebabkan sering dijumpainya penebangan liar. Meskipun belum ada data informasi tentang besarnya kerusakan hutan yang terjadi, penebangan liar ini dikhawatirkan berkembang menjadi kelangkaan atau kepunahan spesies tersebut (Rahayu dan Rugayah, 2007). Oleh karena itu dilakukan usaha untuk mendokumentasi aktivitas biologi dari tanaman ini.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode peredaman radikal DPPH karena metode ini sederhana, sangat sensitif dan DPPH merupakan radikal yang stabil serta tersedia secara komersial. Metode ini dianggap sebagai metode yang mudah dan sangat berguna untuk skrining atau pengukuran aktivitas antioksidan baik senyawa murni maupun kompleks (Magalhaes, Segundo, Reis, dan Lima, 2008). *Brine Shrimp Lethality Test* merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini dapat digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam karena mudah, cepat, murah, peka, dan dapat diulang tanpa terjadi penyimpangan (Harmita dan Radji, 2008).

Berdasarkan potensi daun *L. celebicus* (Miq.) Rehder sebagai antioksidan dan bersifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach maka dilakukan langkah lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif yang terkandung didalamnya dengan harapan dapat menjadi senyawa prekursor obat anti kanker. Daun *L. celebicus* (Miq.) Rehder diekstraksi menggunakan metanol kemudian dipartisi dengan gradien kepolaran pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol, metanol dan air. Aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi yang didapat diuji menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dan uji toksisitas menggunakan metode BSLT kemudian dilakukan isolasi dari fraksi yang aktif. Senyawa yang diperoleh diidentifikasi dengan spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak serta resonansi magnetik inti kemudian diuji kembali aktivitas antioksidan dan toksisitasnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- a. Memperoleh fraksi teraktif yang memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan toksisitas menggunakan metode BSLT dari hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.
- b. Mengetahui golongan senyawa dari fraksi teraktif hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.
- c. Memperoleh isolat dari fraksi teraktif hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.
- d. Mengidentifikasi isolat dari fraksi teraktif hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.
- e. Mengetahui aktivitas antioksidan dan toksisitas isolat dari fraksi teraktif hasil fraksinasi ekstrak metanol daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat Penelitian ini diharapkan dapat menambah data bioaktivitas *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder yakni aktivitas antioksidan dan toksisitas serta menjadi bahan rujukan pada penelitian selanjutnya.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Marga *Lithocarpus*

Lithocarpus terdiri lebih dari 300 spesies yang tersebar dari bagian timur laut India dan Nepal sampai Cina, Taiwan dan bagian selatan Jepang, selatan sampai Indo-Cina dan Thailand, dan wilayah Malesia kecuali bagian timur Jawa dan pulau Lesser Sunda, timur terhadap Archipelago Louisiade; spesies tunggal terdapat di bagian barat Amerika Serikat. Di wilayah Malesia terdapat 104 spesies yang tersebar terutama di bagian barat : 38 spesies di Peninsular Malaysia, 29 spesies di Sumatra, 13 spesies di Jawa, 50 spesies di Kalimantan, 4 spesies di Sulawesi, 1 spesies di Maluku, 19 spesies di Filipina dan 9 spesies di Papua Nugini.

Lithocarpus merupakan pohon kecil hingga besar dengan tinggi sampai 45 (-52) m. Diameter batang memiliki ukuran 30-100(-150) cm. Permukaan kulit batang lembut hingga bercelah, terkadang bersisik, lentisel biasanya abu-abu coklat. Daun tersusun secara spiral, sederhana, tepi daun biasanya kasar. Bunga jantan terdapat sendiri atau berkelompok sebanyak 3-7(-30). Bunga betina sendiri atau dikasial sebanyak 3-7(-15). Kupula terdapat sendiri atau berkelompok secara dikasial, satu dibawah masing-masing bunga betina, berbentuk seperti mangkok sampai hampir bulat dan menutupi seluruh buah. Pada tiap kupula terdapat 1 buah.

Kayu dari *Lithocarpus* (*Mempening*) setelah diawetkan cocok digunakan untuk konstruksi berat seperti konstruksi rumah dan jembatan, bantalan rel kereta api, tonggak pagar, alat-alat tangan, furnitur, lantai, penyelesaian dekorasi interior seperti panel, langit-langit, dan pinggirannya serta untuk produksi pernis. Kayu dari *Lithocarpus spp.* cocok untuk pembuatan pulp dan kertas. Kayunya bagus untuk kayu bakar dan cocok untuk membuat arang. Buah dari beberapa spesies dimakan. Kulit kayu mengandung tanin dan digunakan untuk menyamak kulit serta pewarna coklat rotan dan kapas (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995).

Aktivitas biologi dari marga *Lithocarpus* antara lain fraksi kaya flavonoid dari daun *Lithocarpus polystachyus* Rehd. memiliki aktivitas perlindungan yang

signifikan terhadap diabetes tipe 1 dan tipe 2 (Hou et al., 2011). Senyawa trilobatin dari *Lithocarpus polystachyus* Rehd. diketahui dapat menghambat enzim α -glukosidase dan α -amilase serta menunjukkan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (Dong, Li, Zhu, Liu dan Huang, 2012). Akar dan kulit batang dari *Lithocarpus sp.1* memiliki aktivitas toksisitas secara in vitro terhadap kultur *Plasmodium falciparum* pada dosis 10 μ g/mL (Horgen et al., 2001).

2.2 *Lithocarpus celebicus*

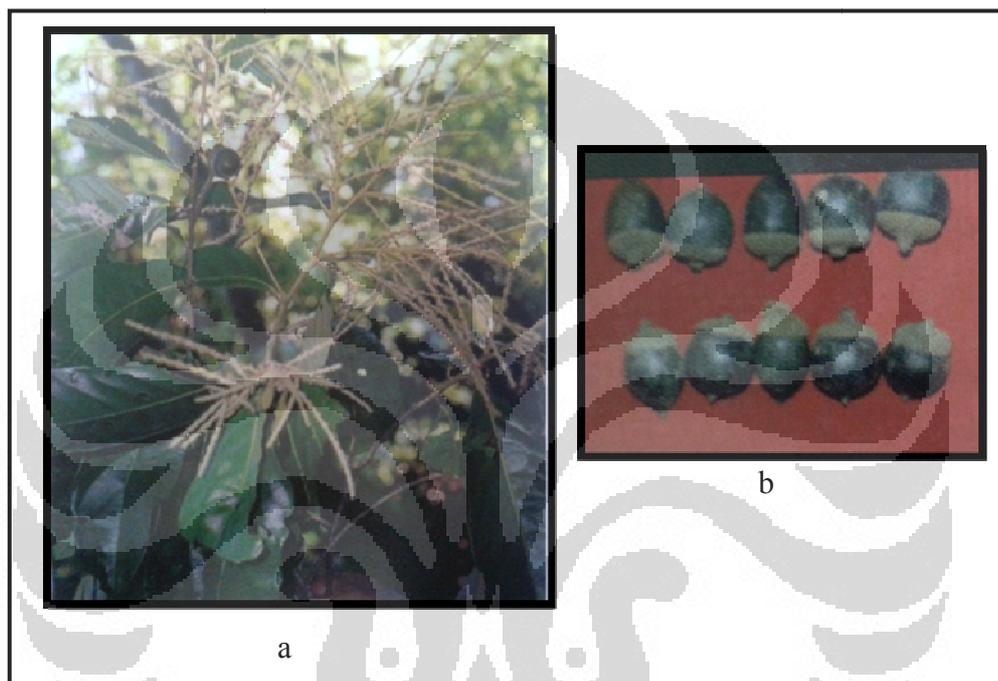
2.2.1 Taksonomi (Jones dan Luchsinger, 1987)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Subkelas	: Hamamelidae
Bangsa	: Fagales
Suku	: Fagaceae
Marga	: Lithocarpus
Jenis	: <i>Lithocarpus celebicus</i> (Miq.) Rehder
Sinonim	: <i>Lithocarpus ilanosi</i> (A.DC.) Rehder, <i>Lithocarpus papuana</i> (Warb.) Rehder, <i>Lithocarpus mabesae</i> (Merr.) A. Camus (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995)
Nama Daerah	: Sulawesi. palili pahu (Mansur, 2003), pololi (Rahayu dan Rugayah, 2007).
Nama Asing	: Filipina. celebic oak, mabesa oak, ulaian (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995)

2.2.2 Morfologi Tumbuhan

Pohon berukuran 10-33 m dengan diameter batang 30-100 cm. Permukaan kulit batang bercelah hingga bersisik dan berwarna abu-abu coklat sedangkan kulit bagian dalam coklat kekuningan. Bentuk daun bagian pangkal sampai tengah lebar kemudian menyempit elips sampai elips-bulat telur berukuran panjang 12-16 cm dan lebar 4-6 cm. Permukaan daunnya coklat keabu-abuan di bagian

atas, gelap sampai mengkilat. Panjang tangkai 0,5-1,0 cm. Perbungaan tersusun menjadi dua, yaitu perbungaan jantan dan betina. Bunga jantan tersusun dalam bentuk lingkaran berkelompok sebanyak 3 buah sedangkan bunga betina sendiri atau secara jarang berada dalam kelompok 2-3 buah. Buah berbentuk bulat telur-kerucut, licin dan ditutupi kupula di bagian bawah (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995; Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 2002).



[Sumber: Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 2002]

Gambar 2.1. a. Tanaman *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder; b. Buah *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder

2.2.3 Distribusi Geografis, Habitat dan Ekologi

L. celebicus (Miq.) Rehder tersebar di Filipina, Sulawesi, Maluku, dan Papua Nugini. *L.* (Miq.) Rehder biasanya terdapat di dataran rendah dan hutan bagian bawah gunung pada tanah liat dengan ketinggian sampai 1200 m di atas permukaan laut. Umumnya lebih banyak dibawah ketinggian 800 m di atas permukaan laut. Densitas dari kayunya adalah 810-940 kg/m³ pada kandungan kelembaban 15% (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995; Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 2002).

2.2.4 Manfaat

Dalam kehidupan sehari-hari, buah dari *L. celebicus* (Miq.) Rehder dapat dimakan sedangkan kayunya dimanfaatkan menjadi bahan bangunan rumah, papan, dan balok-balok (Lemmens, Soerianegara, dan Wong (Ed.), 1995; Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 2002). Masyarakat Wawooni di Sulawesi Tenggara menjadikan kayu dari *L. celebicus* sebagai bahan dasar untuk membuat perahu atau sampan (Rahayu dan Rugayah, 2007). *L. celebicus* (Miq.) Rehder digunakan secara tradisional untuk penyakit kulit, penyakit kelamin, disentri, demam malaria dan sebagai tonik (informasi pribadi dari Aubeta Kairo, herbalis dan taksonomis, Bulolo, daerah wau). Ekstrak metanol daun, kulit batang dan kulit kayu akar menunjukkan aktivitas antimikroba spektrum luas yang meningkat dengan adanya fraksinasi (petrol, diklorometan, etil asetat), terutama fraksi etil asetat untuk kulit batang dan fraksi petrol untuk kulit kayu akar (Khan, Kihara dan Omoloso, 2001).

2.2.5 Kandungan Kimia

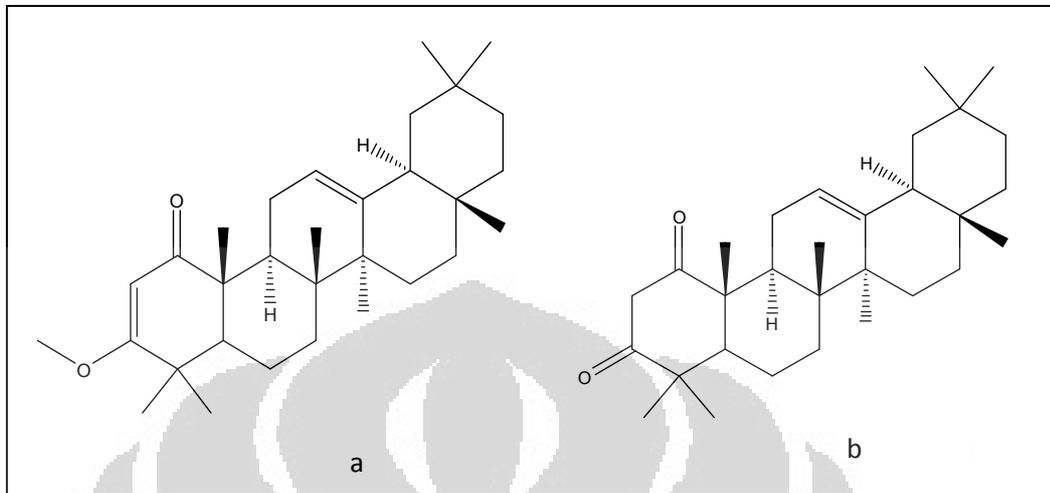
Pada daun, fraksi petroleum eter dan diklorometan mengandung flavonoid, saponin, sterol, tanin dan triterpenoid. Fraksi etil asetat mengandung flavonoid, sterol, tanin dan triterpenoid. Pada kulit batang, fraksi petroleum eter mengandung flavonoid, saponin, sterol, tanin dan triterpenoid. Fraksi diklorometan dan etil asetat mengandung flavonoid, sterol, tanin dan triterpenoid. Pada kulit akar, fraksi petroleum eter mengandung hidrokarbon dan ester. Fraksi diklorometan mengandung flavonoid, saponin dan tanin. Fraksi etil asetat mengandung flavonoid dan tanin (Khan, Kihara dan Omoloso, 2001).

2.3 Kandungan Kimia Marga *Lithocarpus*

2.3.1 Terpen

Daun dari *L. attenuata* (Skan) Schky ditemukan mengandung friedelin, friedelan-3 β -ol, lupeol, taraxasterol, sitosterol, 22-hidroksihopan-3-one, 3 β ,22-dihidroksihopane dan pakisandiol-A sedangkan batang mengandung friedelin, friedelan-3 β -ol, sitosterol, asam betulinat, asam oleanolat serta senyawa

triterpenoid asam yakni 3-metoksioleana-2,12-dien-1-one dan olean-12-en-1,3-dione.



[Sumber: Hui & Li, 1975]

Gambar 2.2. Rumus struktur a. 3-metoksioleana-2,12-diene-1-one, b. olean-12-en-1,3-dione, telah diolah kembali

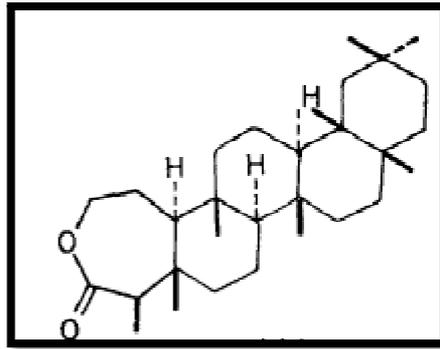
Telah dilakukan isolasi terhadap 10 jenis *Lithocarpus* yaitu *L. cornea* (Lour) Rehd., *L. elizabethae* (Tutch.) Rehd., *L. glabra* (Thunb.) Nakai, *L. attenuata*, *L. haipinii* Chun., *L. harlandi* (Hance) Rehd., *L. hancei* (Benth.) Rehd., *L. irwinii* (Hance) Rehd., *L. litchoides* Chun., dan *L. polystachya* (Wall.) Rehd. dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 2.1. Triterpenoid asam dari 10 jenis *Lithocarpus*

Golongan	Senyawa yang diisolasi	Jenis
Oleanane	olean-12-en-1,3-dione	<i>L. attenuata</i>
		<i>L. cornea</i>
	Asam asetil oleanolat	<i>L. hancei</i>
	Asam oleanolat	<i>L. attenuata</i>
		<i>L. cornea</i>
		<i>L. hancei</i>
		<i>L. harlandi</i>
		<i>L. litchoides</i>
		<i>L. cornea</i>
	Asam kinkolat	<i>L. cornea</i>
Asam morolat	<i>L. cornea</i>	
Asam asetil morolat	<i>L. cornea</i>	
Ursane	Asam asetil ursolat	<i>L. elizabethae</i>
	Asam ursolat	<i>L. elizabethae</i>
		<i>L. irwinii</i>
	Asam quinovat	<i>L. elizabethae</i>
Lupane	Asam betulinat	Semua jenis kecuali <i>L. cornea</i>

[Sumber: Hui & Li, 1976]

Pada daun *Lithocarpus litchioides* Chun dan *Lithocarpus irwinii* (Hance) Rehd. ditemukan terdapat senyawa triterpenoid, Lakton Litocarpic, yaitu 2,3-secofriedelano-3,2-lakton.

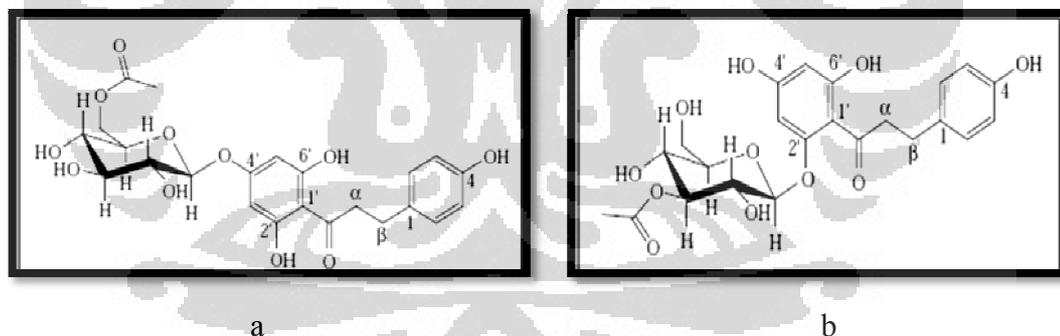


[sumber: Hui, Li & Lee, 1975]

Gambar 2.3. Rumus struktur 2,3-secofriedelano-3,2-lakton.

2.3.2 Dihidrokalikon

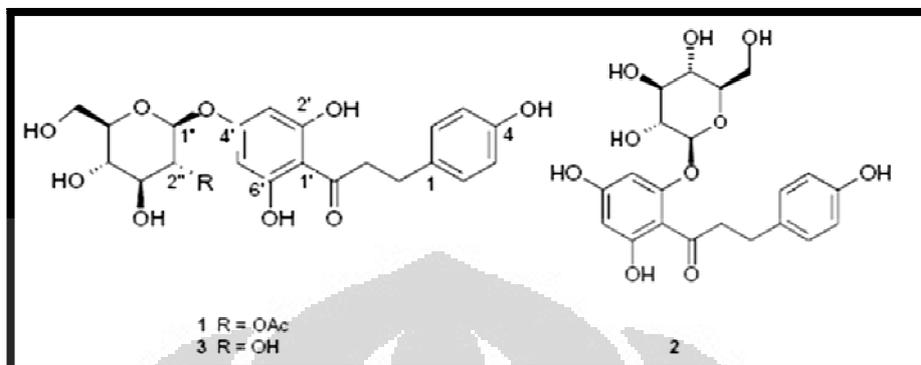
Penelitian terhadap *Lithocarpus litseifolius* (Hance) Chun menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung senyawa florizin, trilobatin, 2''-*O*-asetilflorizin dan fletin serta dua senyawa glikosida dihidrokalikon yakni 6''-*O*-asetiltrilobatin dan 3''-*O*-asetilflorizin (Chen, Zhang, Wu dan Zhao, 2009).



[Sumber: Chen, Zhang, Wu dan Zhao, 2009]

Gambar 2.4. Rumus struktur a. 6''-*O*-asetiltrilobatin, b. 3''-*O*-asetilflorizin

Sebuah senyawa glukosida dihidrokalkon, trilobatin 2-asetat, diisolasi dari daun *Lithocarpus pachyphyllus*, bersama dengan florizin dan trilobatin.



[sumber: Qin & Liu, 2003]

Gambar 2.5. Rumus Struktur (1) trilobatin 2''-asetat, (2) florizin dan (3) trilobatin

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000). Pelarut yang digunakan harus berdifusi kedalam sel untuk melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya dan larutan harus melewati dinding sel serta bercampur dengan cairan disekitarnya sehingga terbentuk kesetimbangan. Kecepatan tercapainya kesetimbangan ini bergantung pada temperatur, pH, ukuran partikel dan pergerakan pelarut (Samuelsson, 1999).

Pelarut yang ideal untuk mendapatkan senyawa aktif dengan efek farmakologi tertentu harus memiliki selektivitas yang tinggi terhadap senyawa yang diekstraksi, tidak bereaksi dengan senyawa yang diekstraksi atau senyawa dalam tanaman, murah, tidak berbahaya untuk manusia dan lingkungan, serta menguap secara sempurna. Alkohol alifatis dengan jumlah atom karbon sampai tiga atau campuran alkohol dan air merupakan pelarut yang memiliki kekuatan ekstraksi terbaik untuk senyawa alam dengan bobot molekul rendah seperti

alkaloid, saponin dan flavonoid (Samuelsson, 1999). Berikut ini adalah beberapa cara ekstraksi:

2.4.1 Cara Dingin

2.4.1.1 Maserasi

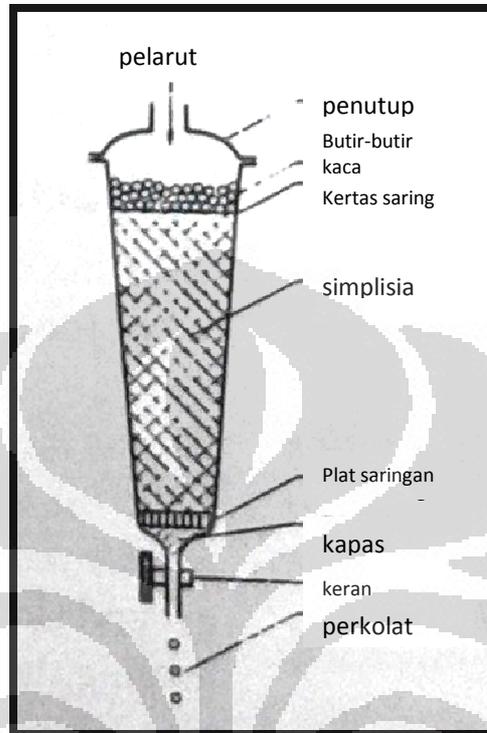
Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia pada temperatur ruangan menggunakan pelarut selama beberapa hari dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan. Perbandingan tanaman yang digiling dan pelarut adalah 1:5 atau 1:10. Ekstrak dipisahkan dari partikel tanaman melalui penyaringan. Residu dikeluarkan dari partikel tanaman dengan penekan mekanik atau sentrifuge. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan secara terus-menerus, biasanya semalaman. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Prosedur diulangi satu atau dua kali dengan pelarut segar. Maserasi tidak menghasilkan ekstraksi yang sempurna dari senyawa yang diinginkan meskipun dilakukan penekanan pada residu secara hati-hati (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000; Samuelsson, 1999).

2.4.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Material tanaman dimasukkan ke dalam perkolator seperti tabung yang dilengkapi dengan penyaring dibagian bawah. Pelarut segar dialirkan dari atas sampai ekstrak yang ditampung di bawah tidak lagi mengandung zat terlarut. Metode ini lambat dan membutuhkan banyak pelarut. Masalah teknis yang dihadapi adalah memastikan laju alir yang tetap dari pelarut untuk melewati serbuk kasar tanaman. Serbuk yang digunakan jangan terlalu halus agar pelarut mudah melewatinya. Ukuran partikel biasanya 1-3 mm. Sebelum material dimasukkan kedalam perkolator perlu dibasahi dengan pelarut dan dibiarkan membengkak. Kemudian dimasukkan secara hati-hati kedalam perkolator sehingga lapisan yang terbentuk seragam. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan atau penampungan ekstrak), terus-menerus

Universitas Indonesia

sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000; Samuelsson, 1999).



[Sumber: Samuelsson, 1999]

Gambar 2.6. Perkolator, telah diolah kembali

2.4.2 Cara Panas

2.4.2.1 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga proses ekstraksi sempurna.

2.4.2.2 Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru dimana umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi

berkesinambungan dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.4.2.3 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (ruangan). Secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

2.4.2.4 Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98⁰C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.4.2.5 Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

2.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan seperti alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon (Harborne, 1987). Metode yang digunakan untuk penapisan fitokimia harus sederhana, cepat, membutuhkan peralatan yang minimum, selektif untuk senyawa yang diuji, kuantitatif sejauh diketahui jumlah terendah deteksi, dan jika memungkinkan memberikan informasi tambahan mengenai ada atau tidaknya kelompok khusus dari golongan yang di uji (Farnsworth, 1966).

2.5.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai gabungan dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tanpa warna, pahit, seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar (Harborne, 1987).

Salah satu cara untuk identifikasi alkaloid adalah reaksi pengendapan. Terdapat empat golongan larutan percobaan untuk pengendapan alkaloid, yaitu golongan I, dengan alkaloid membentuk garam yang tidak larut (asam silikowolframat LP, asam fosfomolibdat LP, dan asam fosfowolframat LP); golongan II, dengan alkaloid membentuk senyawa kompleks bebas kemudian membentuk endapan (Bouchardat LP dan Wagner LP); golongan III, dengan alkaloid membentuk senyawa adisi yang tidak larut (Mayer LP, Dragendorff LP dan Marme LP); dan golongan IV, dengan alkaloid membentuk ikatan asam organik (Hager LP) (Departemen Kesehatan RI, 1995b).

2.5.2 Glikosida

Glikosida merupakan senyawa organik dimana ikatan hemiasetal menghubungkan karbon anomerik dari gula (glikon) dengan hidroksil alkohol atau fenol dari molekul kedua yang non gula (aglikon). Tipe ikatan ini disebut O-glikosida, tipe glikosida yang banyak terdapat dalam tanaman. Jika karbon anomerik glikon terikat kepada aglikon melalui sulfur maka disebut S-glikosida. N-glikosida terbentuk melalui ikatan glikon kepada gugus amin aglikon dan pada C-glikosida ikatan terbentuk antara karbon dari glikon dengan karbon dari aglikon. Glikosida mudah dihidrolisis dengan asam encer atau enzim yang tepat. Khusus untuk C-glikosida dibutuhkan besi (III) klorida karena resisten terhadap hidrolisis oleh asam (Farnsworth, 1966).

2.5.3 Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa jika dikocok dalam air dan menghemolisis sel darah merah pada konsentrasi

rendah. Saponin terdiri dari dua jenis yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol tetapi tidak larut dalam eter (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

2.5.4 Flavonoid

Semua flavonoid berdasarkan strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang dapat membentuk glikosida yang berbeda-beda dalam tumbuhan. Oleh karena itu dalam menganalisis flavonoid biasanya dalam bentuk aglikon dengan cara dihidrolisis terlebih dahulu. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum uv dan cahaya tampak. Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Flavonoid termasuk senyawa fenol dimana warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan.

Pendeteksian keberadaan senyawa ini dapat dilakukan dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air atau etanol yang menimbulkan warna hijau atau hitam kuat. Penyemprot kromatografi umum yakni AlCl_3 5% dalam etanol dengan hasil fluoresensi hijau kuning dengan sinar UV, $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1) dengan hasil biru pada latar belakang kuning serta pereaksi Folin dengan hasil (+ NH_3) biru pada latar belakang putih (Harborne, 1987).

2.5.5 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa yang tersusun dari isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$ dan memiliki kerangka karbon yang dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit isopren ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (komponen minyak atsiri), diterpen yang lebih sukar untuk menguap, triterpen dan sterol yang tidak menguap serta pigmen karotenoid. Secara umum terpen larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya terpen diekstraksi dengan menggunakan eter minyak bumi, eter atau kloroform

dan dapat dipisahkan secara kromatografi pada silika gel atau alumina memakai pelarut tersebut. Pada KLT silika gel merupakan penjerap yang paling banyak digunakan dengan pengembang seperti benzen-kloroform (1:1) dan benzen-etil asetat (19:1) (Harborne, 1987).

Cara umum deteksi ialah menyemprot dengan larutan KMnO_4 0,2% dalam air, antimon klorida dalam kloroform, H_2O_4 pekat, atau vanilin- H_2SO_4 . Ada pereaksi yang lebih selektif untuk mendeteksi terpena yang mempunyai ikatan rangkap yaitu menggunakan uap brom dan yang mempunyai gugus keton menggunakan 2,4-dinitro-fenilhidrazin (Harborne, 1987). Selain itu biasanya diidentifikasi dengan reaksi Liebermann-Bouchardat (anhidrat asetat- H_2SO_4) yang memberikan warna hijau kehitaman sampai biru (Farnsworth, 1966).

2.5.6 Tanin

Tanin merupakan senyawa yang umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu, memiliki gugus fenol, rasa sepat dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air (Harborne, 1987).

Secara kimia, tanin dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987). Tanin diidentifikasi dengan cara pengendapan menggunakan larutan gelatin 10%, campuran natrium klorida-gelatin dan besi (III) klorida 1% (Farnsworth, 1966; Trease dan Evans, 1978).

2.5.7 Kuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon dan

isoprenoid. Pada kelompok benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. Sedangkan kuinon isoprenoid yang terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis diperlukan cara khusus untuk memisahkannya dari bahan lipid lain (Harborne, 1987). Antrakuinon merupakan kelompok terbesar dari kuinon yang terdapat dalam tanaman (Farnsworth, 1966).

2.6 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode kromatografi yang paling sering digunakan untuk analisis fitokimia. Metode pemisahan yang terjadi didasarkan atas penyerapan, partisi atau gabungannya. Dalam penelitian dan pengembangan kimia tumbuhan, KLT dapat digunakan dalam menentukan pelarut yang optimum untuk ekstraksi, memisahkan ekstrak kasar tumbuhan tanpa pemurnian terlebih dahulu, mengidentifikasi senyawa yang diketahui dan tidak diketahui serta memilih senyawa yang aktif secara biologi. Keuntungan penggunaan KLT antara lain penggunaan tunggal fase diam (tidak ada efek memori), kemungkinan optimasi yang luas, model pengembangan dan metode deteksi yang khusus, fungsi penyimpanan dari plat kromatografi (semua daerah dapat dideteksi dalam setiap kromatogram dengan berbagai metode), biaya yang murah untuk pemakaian rutin serta ketersediaan prosedur untuk pemurnian dan isolasi (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008).

2.6.1 Fase diam

Plat KLT dibuat dengan melapiskan sorben yang mempunyai pori-pori dan distribusi ukuran partikel yang sempit yaitu 8-10 μm pada plat berukuran 20x20 cm. Ketebalan lapisan biasanya 250 μm . Plat KLT dapat memiliki pengikat untuk membantu adhesi partikel kepada plat kaca, plastik atau lembaran aluminium yang menjadi dasar penyiapan lapisan. Plat dengan kode "G" berarti menggunakan gipsum (kalsium sulfat) sebagai pengikat. Kebanyakan plat komersial mengandung pengikat polimer organik dengan konsentrasi 1%-2% dimana plat ini lebih keras, lembut, awet dan pemisahannya lebih baik daripada lapisan G. Plat tanpa pengikat diberi kode "H" dan silika dengan kemurnian tinggi "HR".

Lapisan yang mengandung indikator yang berfluoresensi pada 254 atau 366 nm cahaya ultraviolet diberi kode lapisan “F” atau “UV”. Lapisan ini memfasilitasi deteksi senyawa yang mengabsorpsi pada panjang gelombang tersebut dan memberikan daerah hitam pada latar belakang terang. Terdapat plat yang dapat mengabsorpsi pada kedua gelombang tersebut ($F_{254+366}$). Fase diam yang paling sering digunakan adalah silika gel. Strukturnya terdiri atas ikatan silikon dan oksigen dan pemisahan terjadi karena perbedaan migrasi molekul sampel karena selektifitas ikatan hidrogen, interaksi dipol-dipol dan interaksi elektrostatik dengan permukaan gugus silanol (Si-OH). Selain itu terdapat fase diam alumina, selulosa, poliamida, selulosa dimodifikasi dan kieselguhr (tanah diatomae) (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008).

2.6.2 Fase gerak

Fase gerak yang digunakan tidak boleh mempengaruhi secara kimia atau melarutkan fase diam karena dapat menyebabkan perubahan pada sistem kromatografi, mudah dihilangkan dari lapisan adsorben dan harus kompatibel dengan metode deteksi, tidak boleh menghasilkan perubahan kimia dari senyawa yang dipisahkan, mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif, daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan. Fase gerak multikomponen hanya boleh digunakan sekali, tidak diulang, karena penguapan pelarut menghasilkan perubahan terus menerus dari komposisi jumlah fase gerak, yang memberikan efek negatif pada keterulangan kromatografi. Reprodusibilitas sangat dipengaruhi oleh kondisi dan waktu penyiapan fase gerak. Campuran fase gerak dapat terdiri dari satu, dua, atau lebih pelarut (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008).

2.6.3 Aplikasi (Penotolan) Sampel

Pemisahan pada KLT yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan menurunkan resolusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih daripada

penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15 μl . Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar. Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10 μl maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan (Gandjar dan Rohman, 2007). Penotolan sampel secara manual dapat menggunakan mikropipet sekali pakai atau pipa kapiler dan *mikrosyringe* yang terkalibrasi. Penotolan harus dilakukan secara hati-hati karena lapisan adsorben dapat rusak oleh ujung pipa kapiler atau jarum *syringe* (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008).

2.6.4 Pengembangan

Pengembangan sampel dilakukan dalam suatu bejana kromatografi tertutup rapat yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Volume fase gerak sesedikit mungkin namun harus mampu mengelusi sampai ketinggian lempeng yang ditentukan. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.6.5 Deteksi bercak

Cara pengamatan/deteksi bercak secara umum dapat menggunakan antara lain dengan uap iodium (untuk beberapa senyawa organik) yang menghasilkan warna biru gelap, asam fosfomolibdat disertai pemanasan (untuk beberapa senyawa organik) yang menghasilkan warna coklat dan asam sulfat pekat disertai pemanasan (untuk semua senyawa organik) yang menghasilkan warna hitam kecoklatan. Pengamatan juga dapat dilakukan dibawah lampu UV pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gandjar dan Rohman, 2007).

$$R_f = \frac{Z_s}{Z_F - Z_0} \quad (2.1)$$

Keterangan:

R_f = faktor retardasi

Z_s = jarak pusat bercak dari garis awal penotolan (mm)

Z_F = jarak pergerakan pelarut (mm)

Z_0 = jarak antara garis awal penotolan dan garis awal pelarut (mm)

Harga R_f yang diperoleh pada kromatografi lapisan tipis tidak tetap jika dibandingkan dengan yang diperoleh pada kromatografi kertas. Oleh karena itu pada lempeng yang sama disamping kromatogram dari zat yang diperiksa perlu dibuat kromatogram dari zat pembanding kimia, lebih baik dengan kadar yang berbeda-beda. Perkiraan identifikasi diperoleh dengan pengamatan 2 bercak dengan harga R_f dan ukuran yang lebih kurang sama (Departemen Kesehatan RI, 1995b).

2.7 Kromatografi Kolom

2.7.1 Kromatografi Penyerapan

Zat penyerap (aluminiumoksida yang telah diaktifkan, silika gel, kiselgur terkalsinasi, kiselgur kromatografi murni) dalam keadaan kering atau setelah dicampur dengan sejumlah cairan, dimampatkan kedalam tabung kaca atau tabung kwarsa dengan ukuran tertentu dan mempunyai lubang pengalir keluar dengan ukuran tertentu. Sejumlah sediaan yang diperiksa dilarutkan dalam sedikit pelarut ditambahkan pada puncak kolom dan dibiarkan mengalir kedalam zat penyerap. Zat berkhasiat diserap dari larutan oleh bahan penyerap secara sempurna berupa pita sempit pada puncak kolom. Dengan melarutkan pelarut lebih lanjut, dengan atau tanpa tekanan udara, masing-masing zat bergerak turun dengan kecepatan khas sehingga terjadi pemisahan dalam kolom yang disebut kromatogram. Kecepatan bergerak zat dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya daya serap zat penyerap, sifat pelarut dan suhu dari sistem kromatografi. Jika zat yang terpisah berwarna, atau berfluoresensi dengan sinar ultraviolet, kolom penyerap dapat

dikeluarkan dan dengan cara memotong melintang, lapisan yang diperlukan dapat dipisahkan, zat disari dengan pelarut yang cocok. Jika zat yang terpisah tidak berwarna, letak lapisan zat dapat ditetapkan dengan cara memberi warna atau menyemprot kolom yang telah dikeluarkan dengan pereaksi yang dapat membentuk warna.

Pemisahan yang lebih banyak dilakukan adalah pemisahan dengan mengalirkan pelarut melalui kolom sehingga zat berkhasiat yang dikehendaki keluar dalam eluat. Cara ini disebut kromatogram mengalir. Kadar zat didalam eluat dapat ditentukan kadarnya secara titrasi, spektrofotometri atau kolorimetri atau pelarut dapat diuapkan hingga diperoleh zat dalam keadaan hampir murni. Jika dikehendaki pemisahan beberapa zat berkhasiat dapat dilakukan dengan mengalirkan selanjutnya pelarut yang sama atau pelarut lain yang mempunyai daya elusi lebih kuat (Departemen Kesehatan RI, 1995b).

2.7.2 Kromatografi Pembagian

Pada kromatografi pembagian, zat yang harus dipisahkan terbagi antara 2 cairan yang tidak dapat bercampur. Salah satu cairan, yaitu fase tidak bergerak, atau fase yang lebih polar biasanya diserap oleh zat penyerap padat, karena itu memberikan daerah permukaan yang sangat luas kepada pelarut yang mengalir atau fase bergerak atau fase yang kurang polar dan menghasilkan pemisahan yang baik, yang tidak dapat dicapai pada penyarian dengan cara pengocokan. Kromatografi pembagian dilakukan dengan cara mirip dengan kromatografi penyerapan, yaitu campuran yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut, ditambahkan pada puncak kolom dan eluasi dilakukan dengan pelarut yang mengalir. Umumnya sebelum digunakan, fase bergerak dijenuhkan dulu dengan fase tidak bergerak. Dalam hal tertentu, lebih baik zat yang diperiksa yang telah dilarutkan dalam fase tidak bergerak ditambahkan pada sedikit zat penyerap, kemudian campuran ini dipisahkan pada puncak kolom (Departemen Kesehatan RI, 1995b).

2.8 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.8.1 Radikal bebas

Radikal bebas adalah molekul atau fragmen molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tak berpasangan di orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, dan De, 2010). Akibatnya, radikal bebas menjadi sangat reaktif (tidak stabil) karena berusaha untuk berpasangan dengan atom, molekul, atau bahkan elektron individual lain untuk membentuk senyawa yang stabil (Wu dan Cederbaum, 2003).

Serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang akan terus menerus menghasilkan senyawa radikal baru. Secara umum, tahapan reaksi pembentukan radikal bebas ialah (Winarsi, 2007) :

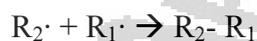
- a. Tahap inisiasi, yaitu awal pembentukan radikal bebas



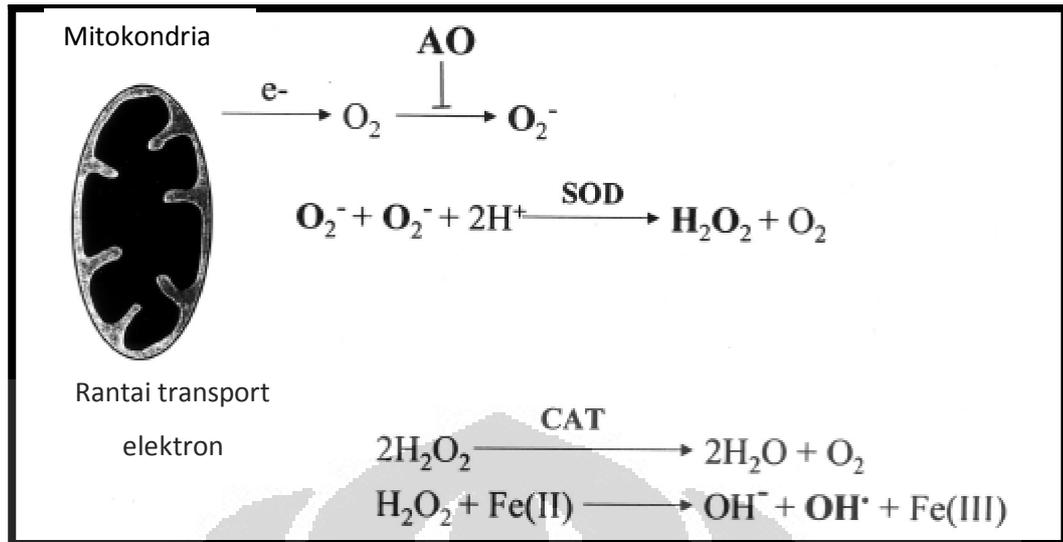
- b. Tahap propagasi, yaitu pemanjangan rantai radikal



- c. Tahap terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah



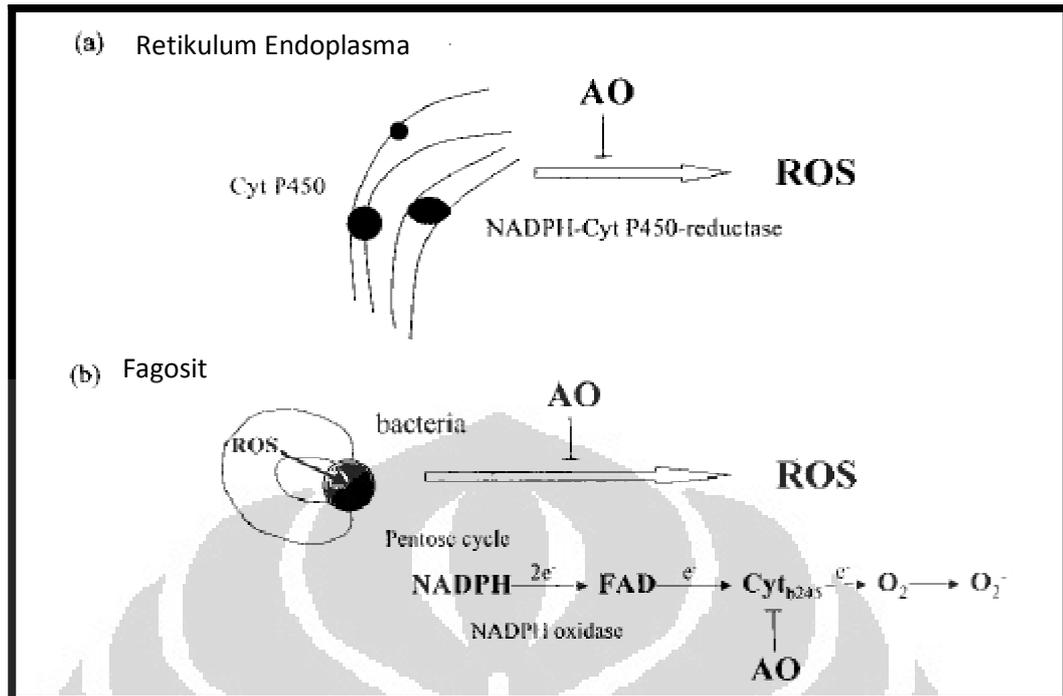
Radikal bebas menjadi dasar banyak reaksi biokimia dan memegang peranan penting pada sistem aerobik dan metabolisme. Radikal bebas diproduksi terus menerus oleh tubuh melalui reaksi enzimatik dan non enzimatik seperti reaksi berantai sistem respirasi, fagositosis, sintesis prostaglandin, sistem sitokrom P450 dan fosforilasi oksidatif (respirasi aerob) di mitokondria. Selain itu, radikal bebas juga terdapat di lingkungan seperti polutan, asap rokok, pestisida dan lain-lain (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, dan De, 2010).



[Sumber: Salganik, 2001]

Keterangan : elektron yang dilepaskan dari mitokondria akan mereduksi molekul oksigen sehingga terbentuk radikal superoksida (O_2^-). Superoksida dismutase (SOD) mengkatalisis pembentukan H_2O_2 dari superoksida. H_2O_2 dapat dideaktivasi oleh katalase (CAT) namun jika bereaksi dengan besi atau tembaga maka akan terbentuk radikal hidroksil yang merupakan bentuk paling reaktif dari spesies oksigen reaktif (SOR).

Gambar 2.7. Pembentukan spesies oksigen reaktif (SOR) di mitokondria, telah diolah kembali

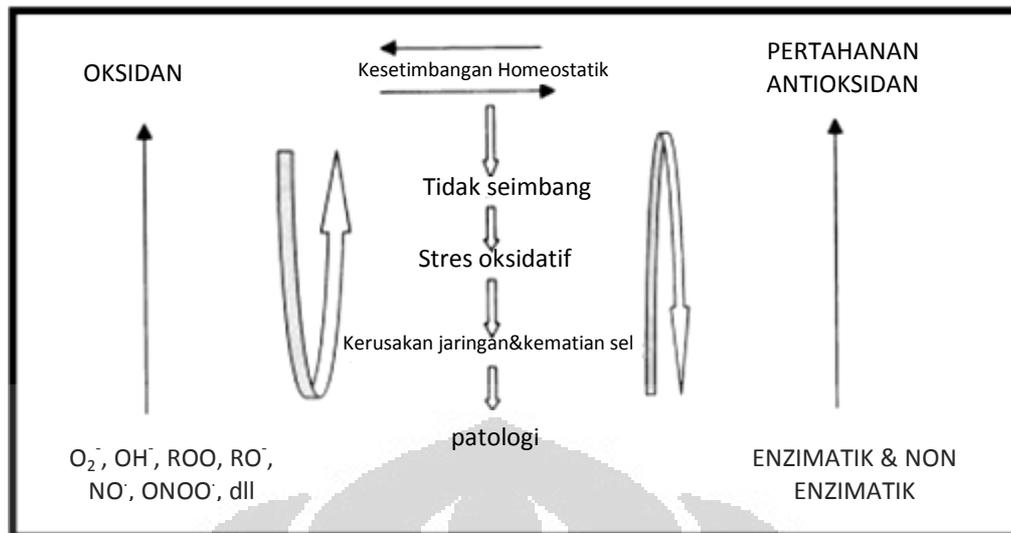


[Sumber: Salganik, 2001]

Keterangan : a. Pembentukan SOR oleh monoooksigenase mikrosomal dengan sitokrom P450 sebagai pusat, b. pembentukan SOR saat proses fagositosis untuk membunuh mikroorganisme infeksius dan sel kanker, telah diolah kembali

Gambar 2.8. Pembentukan SOR di retikulum endoplasma dan fagosit

Radikal bebas memiliki dua peranan didalam tubuh. Pada konsentrasi rendah/sedang, radikal bebas terlibat dalam fungsi normal fisiologis. namun dalam jumlah yang berlebihan atau terjadi penurunan kadar antioksidan dapat menyebabkan stress oksidatif. Proses ini menjadi jalan terjadinya kerusakan struktur sel, termasuk lipid, protein, RNA dan DNA yang mengakibatkan timbulnya beberapa penyakit seperti penyakit neurodegeneratif (alzheimer, parkinson, multiple sklerosis), kardiovaskular (aterosklerosis, hipertensi, iskemia), paru-paru (asma, penyakit paru obstruktif), penyakit autoimun (reumatoid arthritis), ginjal (glomerulonefritis, proteinuria), saluran pencernaan (kolitis, ulkus lambung), tumor dan kanker (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, dan De, 2010).



[Sumber: Tiwari, 2001]

Keterangan : Dibawah kondisi fisiologis normal, tubuh dapat menanggulangi SOR. Stress oksidatif adalah kondisi dimana pertahanan antioksidan tidak cukup untuk menjaga kadar SOR dibawah konsentrasi toksik. Hal ini dapat mengakibatkan kelebihan pembentukan ROS atau kehilangan pertahanan antioksidan atau keduanya

Gambar 2.9. Keseimbangan pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (SOR) dan pertahanan antioksidan, telah diolah kembali

2.8.2 Antioksidan

Antioksidan merupakan substansi yang dalam konsentrasi rendah jika dibandingkan dengan substrat yang akan teroksidasi, secara signifikan memperlambat atau menghambat oksidasi substrat (Halliwell dan Gutteridge, 1995). Dalam satu waktu, satu molekul antioksidan dapat bereaksi dengan radikal bebas tunggal dan dapat menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan satu elektronnya. Tubuh secara alami memproduksi antioksidan (antioksidan endogen) untuk menetralkan radikal bebas dan melindungi tubuh dari kerusakan jaringan namun proses ini tidak 100% efektif jika produksi radikal bebas terlalu berlebihan dan efektifitasnya juga menurun karena usia. Antioksidan eksogen yang didapat dari makanan juga memegang peranan penting untuk melindungi tubuh.

Antioksidan endogen yang dihasilkan tubuh diklasifikasikan menjadi kelompok enzimatis dan non enzimatis. Kelompok enzimatis meliputi superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), glutathion reduktase (GR) sedangkan kelompok non enzimatis meliputi vitamin E, vitamin C dan *reduced glutathione* (GSH).

Antioksidan non enzimatik juga dapat diklasifikasikan menjadi antioksidan metabolik dan antioksidan nutrien. Antioksidan metabolik merupakan antioksidan endogen yang diproduksi melalui metabolisme dalam tubuh seperti asam lipoat, glutathion, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, asam urat, bilirubin, protein pengkelat logam, dan transferrin. Sedangkan antioksidan nutrien adalah antioksidan eksogen yang tidak dapat diproduksi oleh tubuh tetapi tersedia dalam makanan atau suplemen yaitu logam (selenium, mangan, zink), flavonoid, asam lemak omega-3 dan omega-6. Vitamin E dan C merupakan antioksidan non enzimatik yang terdapat pada sel normal namun juga dapat diperoleh dari makanan (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, dan De, 2010).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu (Winarsi, 2001):

a. Antioksidan Primer

Menurut Belleville-Nabet (1996), antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif. Antioksidan primer meliputi superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), glutathion reduktase (GR). Sebagai antioksidan, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi) kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil (*chain-breaking-antioxidant*)

b. Antioksidan Sekunder

Menurut Lampe (1999), antioksidan sekunder (non enzimatis) bekerja dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya (*free-radical scavenger*) sehingga tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin.

c. Antioksidan Tersier

Menurut Demple dan Harrison (1994) serta Friedberg, et al., (1995), kelompok antioksidan primer meliputi sistem enzim *DNA-repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas.

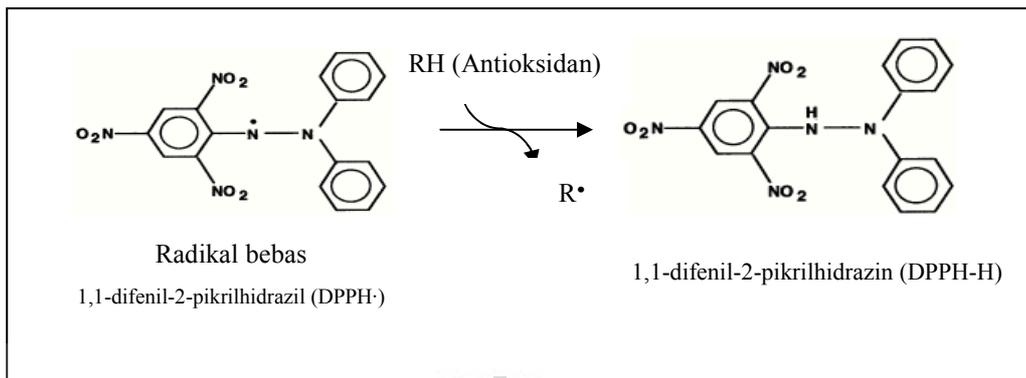
2.9 Uji Aktivitas Antioksidan

Metode-metode yang paling sering digunakan untuk menentukan kapasitas antioksidan secara *in vitro* adalah metode peredaman radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), metode 2,2'-Azinobis (asam 3-etilbenzotiazolin-6 sulfonat) (ABTS), metode *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) dan metode *ferric reducing/antioxidant power* (FRAP) (Pe' rez-Jime'nez et al., 2008).

2.9.1 Metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)

Metode peredaman radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (α,α -difenil- β -pikrilhidrazil; DPPH) pertama kali dijelaskan oleh Blois di tahun 1958 dan sudah banyak dimodifikasi oleh para peneliti. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil karena delokalisasi elektron diseluruh molekul sehingga tidak terjadi dimerisasi yang menjadi masalah untuk radikal bebas lainnya. Delokalisasi elektron juga menyebabkan timbulnya warna ungu yang ditunjukkan oleh pita serapan larutan dalam etanol pada panjang gelombang sekitar 520 nm. Ketika DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, terjadi peningkatan bentuk tereduksi dari DPPH yang mengakibatkan hilangnya warna ungu (tersisa warna kucing pucat dari gugus pikril yang masih ada) (Molyneux, 2004).

Monitoring radikal DPPH dengan spektrometer UV menjadi metode yang digunakan secara luas dan sering dilakukan karena sederhana dan akurat. Untuk menstandardisasi hasil dari berbagai studi, digunakan satuan Trolox Equivalent (TE). Trolox merupakan vitamin E komersial yang larut dalam air. Aktivitas antioksidan sampel ditunjukkan dalam mikromol sebagai ekuivalen Trolox per 100 g sampel (TE/100 g). Hasil uji juga dapat dilaporkan sebagai EC₅₀ yaitu jumlah antioksidan yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% konsentrasi radikal DPPH awal. Untuk menunjukkan efisiensi, digunakan istilah *antiradical power* (ARP) yaitu $1/EC_{50}$, semakin besar ARP maka semakin efisien suatu antioksidan (Brand-Williams, Cuvelier, dan Berset, 1995).



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009]

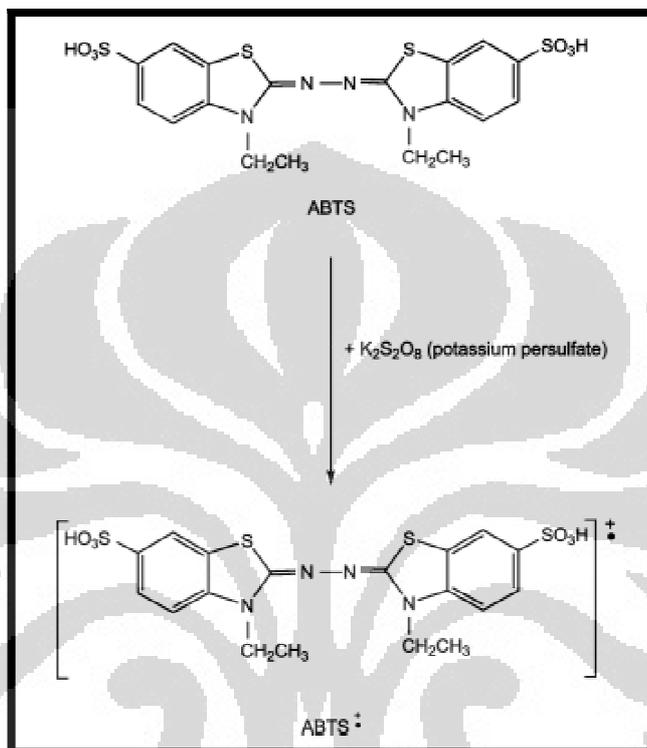
Gambar 2.10. Reaksi antara radikal bebas DPPH• dan antioksidan (RH), telah diolah kembali

Metode DPPH cukup populer dalam pengujian antioksidan bahan alam. Hal ini dikarenakan metode ini sederhana dan sangat sensitif, DPPH merupakan radikal yang stabil dan tersedia secara komersial, serta tidak perlu dibentuk terlebih dahulu sebelum pengujian seperti metode ABTS sehingga metode ini dianggap sebagai metode yang mudah dan sangat berguna untuk skrining atau pengukuran aktivitas antioksidan baik senyawa murni maupun kompleks (Magalhaes, Segundo, Reis, dan Lima, 2008). Adapun kekurangan dari metode ini adalah senyawa lain mungkin terabsorpsi pada panjang gelombang 515 nm, mungkin terdapat halangan sterik untuk molekul dengan bobot molekul yang lebih tinggi dan radikal bebas DPPH tidak terdapat secara *in vivo* serta cukup stabil, tidak seperti radikal yang terdapat dalam makhluk hidup (Pe´rez-Jime´nez et al., 2008).

2.9.2 Metode ABTS

Metode penangkapan radikal 2,2'-Azinobis (asam 3-etilbenzotiazolin-6 sulfonat) (ABTS) dikembangkan oleh Rice-Evans dan Miller pada tahun 1994 kemudian dimodifikasi oleh Re et al. pada tahun 1999. Dasar pengujian metode ABTS adalah aktivasi metmioglobin oleh hidrogen peroksida dengan adanya ABTS untuk memproduksi kation radikal stabil. Pengembangan metode ini

menghasilkan kromofor ABTS^{•+} biru/hijau melalui reaksi ABTS dengan kalium persulfat seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.11 dan ini sudah digunakan secara luas. Selain DPPH, metode ini merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan dari tanaman.



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009]

Gambar 2.11. Pembentukan radikal ABTS stabil dari ABTS dengan kalium persulfat, telah diolah kembali

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan penghilangan warna ABTS, melalui pengukuran reduksi kation radikal karena kehadiran antioksidan sebagai donor hidrogen secara spektrofotometri pada panjang gelombang 734 nm. Uji penghilangan warna ini mengukur kapasitas antioksidan total baik pada substansi lipofilik maupun hidrofilik. Efek dari konsentrasi antioksidan dan durasi inhibisi absorpsi kation radikal diperhitungkan saat penentuan aktivitas antioksidan. Trolox, analog Vitamin E yang larut dalam air, digunakan sebagai kontrol positif. Aktivitas antioksidan dari ekstrak ditunjukkan sebagai *Trolox-equivalent*

antioxidant capacity (TEAC/mg) (Krishnaiah, Sarbatly, dan Nithyanandam, 2011).

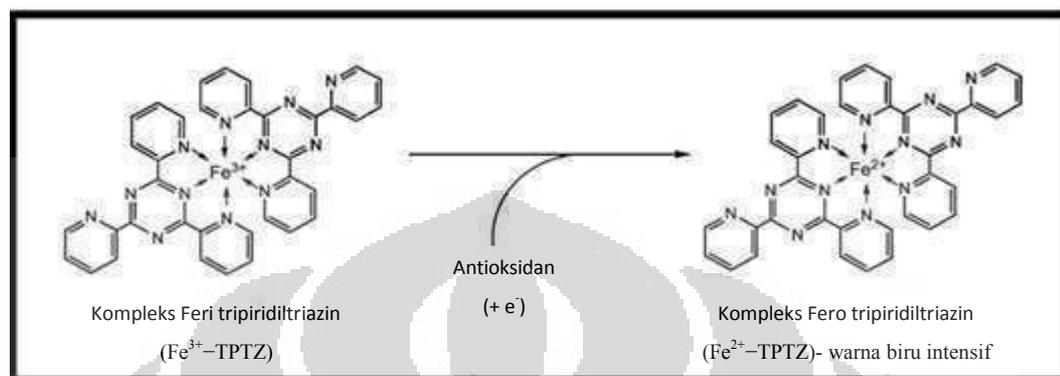
2.9.3 Metode *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)

Metode *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) menggunakan beta-pikoeitritin (PE) sebagai protein substrat oksidasi dan 2,2'-azobis (2 amidinopropana dihidroklorida) (AAPH) sebagai penghasil radikal peroksil atau sistem Cu^{2+} - H_2O_2 sebagai penghasil radikal hidroksil. Sampai saat ini, metode ini merupakan satu-satunya metode yang menggunakan reaksi radikal bebas untuk penyelesaian dan menggunakan teknik area dibawah kurva untuk kuantifikasi sehingga menggabungkan persen inhibisi dan panjang waktu inhibisi aksi radikal bebas ke dalam kuantitas tunggal. Metode ini telah digunakan secara luas dalam banyak penelitian tentang tanaman (Krishnaiah, Sarbatly, dan Nithyanandam, 2011).

Adapun kekurangan metode ini adalah kinetika reaksi bervariasi tergantung konsentrasi antioksidan. Meskipun pengukuran yang dilakukan adalah peredaman radikal peroksil (terdapat secara *in vivo*), namun prosedur pembuatan radikal ini tidak secara fisiologis dan dapat dipengaruhi oleh protein (Pe' rez-Jime' nez et al., 2008).

2.9.4 Metode *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP)

Mekanisme metode *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP) ditunjukkan oleh gambar dibawah ini.



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009]

Gambar 2.12. Pembentukan kompleks (Fe²⁺-TPTZ) dari kompleks (Fe³⁺-TPTZ) oleh antioksidan, telah diolah kembali

Ketika kompleks Fe³⁺-TPTZ tereduksi menjadi bentuk Fe²⁺ oleh antioksidan dibawah kondisi asam, warna biru yang intens memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 593 nm. Metode FRAP cepat dan memberikan hasil yang reproduksibel. Sistem pengujian harus aqueous sehingga antioksidan standar yang digunakan harus larut dalam air, seperti asam askorbat, asam urat atau Trolox (Krishnaiah, Sarbatly, dan Nithyanandam, 2011).

Adapun kekurangan metode ini adalah senyawa lain dapat terabsorpsi pada panjang gelombang 595 nm, banyak senyawa dengan potensial redoks lebih rendah dari 0.77 V, meskipun tidak menunjukkan aktivitas antioksidan secara in vivo, dapat mereduksi besi, dan reaksinya terjadi tidak pada pH fisiologis (Pe´rez-Jime´nez et al., 2008).

2.10 Uji Toksisitas

Saat ini, terdapat kebutuhan untuk mengganti penggunaan hewan coba pada uji toksikologi karena tingginya biaya dan penderitaan yang dialami oleh hewan coba. Metode alternatif diharapkan dapat melakukan uji tanpa menggunakan

hewan coba, mengurangi jumlah hewan coba, atau mengurangi rasa sakit dan stress yang ditimbulkan oleh metode sebelumnya (Kanwar, 2007). Sebuah metode dengan menggunakan udang air garam (*Artemia salina* Leach) diusulkan sebagai pengujian bioaktivitas sederhana untuk penelitian bahan alam. Aktivitas berbagai senyawa aktif di tunjukkan sebagai toksisitas terhadap udang. Metode ini cepat, dapat dipercaya, murah, dan mudah dilakukan sebagai alat pengujian bioaktivitas secara umum (Meyer, Ferrigni, Putnam, Jacobsen, Nichols dan McLaughlin, 1982).

Artemia salina L. (Artemiidae), merupakan invertebrata di ekosistem air laut. Spesies invertebrata digunakan sebagai organisme penanda berdasarkan kelimpahannya, fasilitas sampling dan spektrum luas dari karakteristik ekologi serta sensitivitas terhadap senyawa kimia (Kanwar, 2007). Pengujian dilakukan selama 24 jam pada siklus kehidupan *A. salina* L. yang disebut *nauplii*. Mortalitas dari *nauplii* dinyatakan sebagai LC_{50} dalam $\mu\text{g/mL}$ (Persoone dan Wells, 1987). Menurut Meyer et al., (1982) tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat ditentukan dengan melihat harga LC_{50} -nya. Suatu ekstrak dianggap sangat toksik bila memiliki nilai LC_{50} di bawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC_{50} 30-1000 ppm dan dianggap tidak toksik bila nilai LC_{50} di atas 1000 ppm. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor. Semakin kecil harga LC_{50} semakin toksik suatu senyawa.

2.10.1 *Artemia salina* Leach

2.10.1.1 Klasifikasi (Martin dan Davis, 2001)

Subfilum	: Crustacea
Kelas	: Branchiopoda
Subkelas	: Sarsostraca
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Artemiidae
Marga	: Artemia
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach

2.10.1.2 Siklus Hidup *Artemia salina* Leach

Artemia salina merupakan salah satu organisme yang hidup pada lingkungan dengan kadar garam yang tinggi. Bayi *A. salina* yang dorman disebut *cyst* setelah itu jika sudah menetas disebut *nauplii*. *A. salina* dapat beradaptasi pada lingkungan dengan kadar garam tinggi dan memainkan peranan penting pada ekosistemnya. Makanan *A. salina* adalah mikroorganisme seperti alga dan bakteri serta fosfor dan nitrogen. Dibawah kondisi yang optimal, *A. salina* dapat hidup hingga tiga bulan atau lebih. Namun perubahan seperti pada temperatur dan asupan makanan menyebabkan penurunan rata-rata kehidupan menjadi sekitar 1,5 bulan. Faktor lain yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan pertahanan *A. salina* L. adalah cahaya, pH, oksigen, dan salinitas air (Kanwar, 2007).

2.10.1.3 Penetasan Telur

Penetasan telur dilakukan pada wadah bening seperti gelas kimia atau stoples yang diberi bahan plastik, negatif film, atau kaca dengan menggunakan media air laut (*brine = saline*). Wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian terang dan gelap oleh suatu sekat berlubang. Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan. Sekat berlubang menjadi jalan bagi larva yang telah lahir untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Selama penetasan diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar/neon 40-60 watt agar suhu penetasan 25-30⁰C tetap terjaga.

Media penetasan telur adalah air laut buatan dengan kadar garam (NaCl) 15 g/L. Kadar oksigen yang dibutuhkan selama penetasan harus lebih dari 3 mg/l sehingga air laut harus diberi udara, baik dengan aerator, kompresor, maupun blower. Dalam waktu 24-36 jam biasanya telur-telur sudah menetas menjadi larva (*nauplii*). *Nauplii* yang digunakan untuk pengujian adalah *nauplii* aktif yang telah berusia 48 jam (Harmita dan Radji, 2008).

2.11 Spektrofotometri Ultraviolet dan Cahaya Tampak

Spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak adalah pengukuran serapan radiasi elektromagnet yang diserap oleh zat, mendekati monokromatik, yang dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) dan

pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm). Meskipun spektrum pada daerah ultraviolet dan cahaya tampak tidak khas, tetapi sangat cocok untuk penelitian kuantitatif, dan untuk beberapa zat berguna untuk membantu identifikasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

Alat spektrofotometer pada dasarnya terdiri dari sumber sinar monokromator, tempat sel (kuvet) untuk zat yang diperiksa, detektor, penguat arus, dan alat ukur atau pencatat. Spektrofotometer dapat bekerja secara otomatis ataupun tidak, dapat mempunyai sistem sinar tunggal atau ganda. Kuvet yang digunakan untuk pengukuran pada daerah ultraviolet dibuat dari silika, sedangkan untuk pengukuran pada daerah cahaya tampak dibuat dari kaca. Yang banyak digunakan adalah kuvet dengan tebal 1 cm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

Semua molekul memiliki energi yang dapat digambarkan menjadi beberapa fenomena yaitu energi translasional (molekul secara keseluruhan dapat bergerak, energi vibrasional (bagian molekul dapat bergerak karena berkean satu sama lain), energi rotasional (molekul dapat berotasi pada sumbunya), dan energi elektronik (tergantung pada konfigurasi elektronik molekul). Jika suatu molekul bergerak dari suatu tingkat energi ke tingkat yang lebih rendah maka beberapa energi akan dilepaskan. Energi ini dapat hilang sebagai radiasi dan dapat dikatakan telah terjadi emisi radiasi. Jika suatu molekul dikenai suatu radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai sehingga energi molekul tersebut ditingkatkan ke level yang lebih tinggi, maka terjadi peristiwa absorpsi energi oleh molekul. Supaya terjadi absorpsi, perbedaan energi antara dua tingkat energi harus setara dengan energi foton yang diserap (Gandjar dan Rohman, 2007).

Spektrum ultraviolet dan cahaya tampak terbentuk karena terjadinya eksitasi elektronik lebih dari satu macam gugus molekul yang sangat kompleks. Apabila pada molekul yang sederhana hanya terjadi transisi elektronik pada satu macam gugus, maka hanya akan terjadi satu absorpsi. Penyerapan sinar ultraviolet dan cahaya tampak umumnya dihasilkan oleh eksitasi elektron-elektron ikatan, akibatnya panjang gelombang pita yang mengabsorpsi dapat dihubungkan dengan ikatan yang mungkin ada dalam suatu molekul (Gandjar dan Rohman, 2007).

Intensitas serapan diturunkan dari aturan Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi, ketebalan sampel, dan konsentrasi larutan. Hubungan ini dinyatakan dengan (Kosela, 2010) :

$$\text{Log}_{10} I_0/I = \epsilon l C \quad (2.2)$$

Keterangan :

I_0 = intensitas energi radiasi yang ditembakkan pada sampel

I = intensitas radiasi yang dipancarkan dari sampel

C = konsentrasi dalam mol/liter

l = panjang sel

$\text{Log}_{10} I_0/I$ = absorbansi

ϵ = koefisien ekstinsi molar ($1000\text{cm}^2/\text{mol}$)

Spektrum ultraviolet dan cahaya tampak dapat digunakan untuk informasi kualitatif dan analisis kuantitatif :

a. Aspek kualitatif

Data yang diperoleh dari spektrum ultraviolet dan cahaya tampak adalah panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH dan pelarut yang kesemuanya dapat dibandingkan dengan data yang sudah dipublikasikan.

b. Aspek kuantitatif

Suatu berkas radiasi dikenakan pada larutan sampel dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya. Radiasi yang diserap oleh cuplikan ditentukan dengan membandingkan intensitas sinar yang diteruskan dengan intensitas sinar yang diserap jika tidak ada spesies penyerap lainnya. Intensitas atau kekuatan radiasi cahaya sebanding dengan jumlah foton yang melalui satu satuan luas penampang perdetik. Serapan dapat terjadi jika foton/radiasi yang mengenai cuplikan memiliki energi yang sama dengan energi yang dibutuhkan untuk menyebabkan terjadinya perubahan tenaga. Kekuatan radiasi juga mengalami penurunan dengan adanya penghamburan dan pemantulan cahaya, akan tetapi penurunan karena hal ini sangat kecil dibandingkan dengan proses penyerapan (Gandjar dan Rohman, 2007).

2.12 Resonansi Magnetik Inti

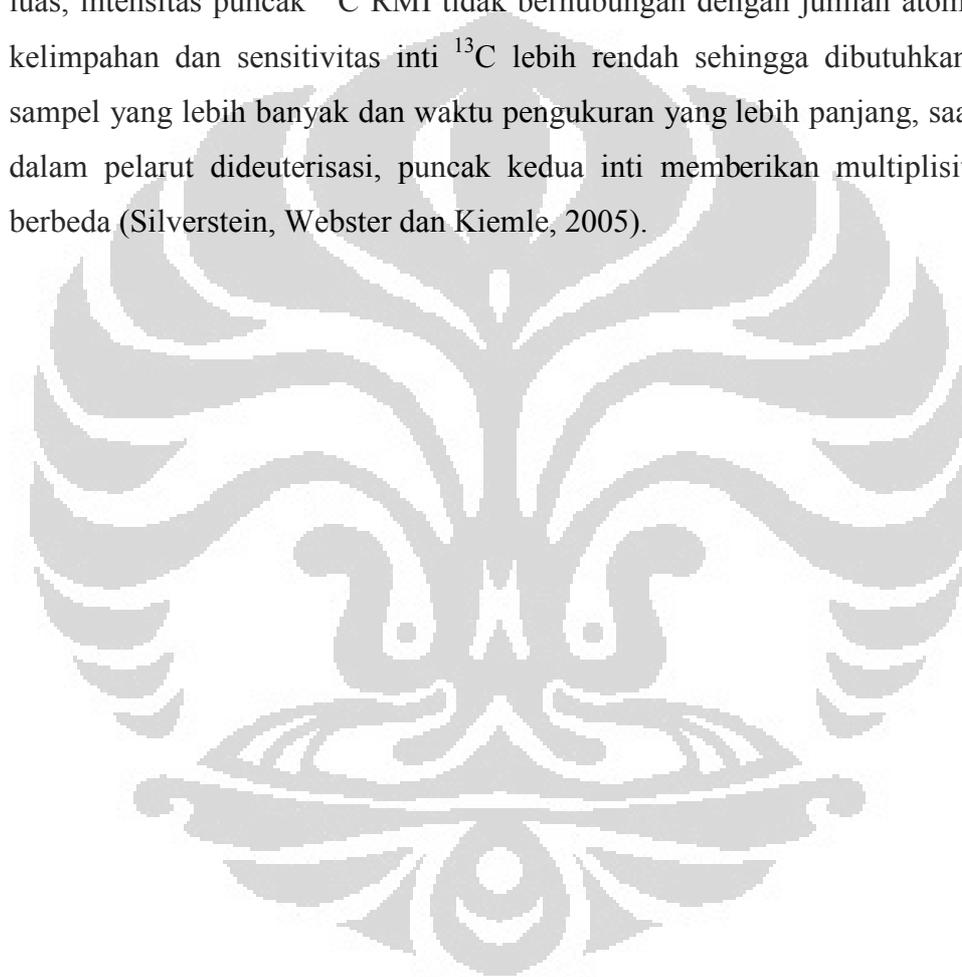
Resonansi Magnetik Inti (RMI) merupakan salah satu jenis spektrometri serapan, seperti halnya spektrometri inframerah dan ultraviolet. Dibawah kondisi yang sesuai dalam medan magnet, sampel dapat mengabsorpsi radiasi elektromagnetik daerah frekuensi radio pada frekuensi yang ditentukan oleh karakteristik sampel. Absorpsi merupakan fungsi dari inti dalam molekul. Spektrum RMI merupakan plot dari frekuensi puncak absorpsi terhadap intensitas puncak. Semua inti membawa muatan (Silverstein, Webster dan Kiemle, 2005). Inti-inti atom tertentu seperti ^1H , ^{13}C , ^{19}F , dan ^{31}P dapat berperilaku sebagai magnet batang kecil. Sifat tersebut mendasari prinsip resonansi magnetik inti sebagai alat analisis dengan tujuan elusidasi struktur. Atom hidrogen memiliki beberapa isotop yaitu ^2H (Deuterium) dan ^3H (Tritium) namun kelimpahan terbesar di alam adalah ^1H sebesar 99,985% (Kosela, 2010).

Pada beberapa inti, muatan ini berputar "spin" pada poros inti, dan sirkulasi muatan ini memproduksi dipol magnetik sepanjang sumbu. Momentum sudut dari perputaran muatan dideskripsikan sebagai nomor quantum spin (I) yang memiliki nilai 0, $\frac{1}{2}$, 1, $\frac{3}{2}$, dan seterusnya ($I=0$ tidak ada spin). Magnitud intrinsik dari dipol yang terbentuk dinyatakan sebagai momen magnetik inti, μ . Spektra dari beberapa inti dapat diukur karena mempunyai nomor spin $\frac{1}{2}$ dan distribusi muatan sferis yang merata. Sejauh ini, yang paling sering digunakan dalam spektrometri RMI adalah ^1H dan ^{13}C (Silverstein, Webster dan Kiemle, 2005).

Interpretasi spektrum ^1H RMI berdasarkan pada tiga informasi yang saling terkait, yakni integrasi sinyal puncak, pergeseran kimia dan *spin-spin coupling*. Integrasi sinyal puncak memberikan informasi rasio atom hidrogen dalam senyawa. Konsep pergeseran kimia menghubungkan posisi sinyal pada spektrum dengan lingkungan kimia. Terbentuknya sinyal terjadi karena perbedaan lingkungan kimia dari atom hidrogen. Perbedaan kedudukan tersebut akan memberikan frekuensi resonansi yang berbeda. Semakin kecil frekuensi resonansinya, makin besar kerapatan elektronnya, makin kecil pula pergeseran kimia proton tersebut. Sebaliknya semakin besar frekuensi resonansinya, makin kecil kerapatan elektronnya, makin besar pergeseran kimia proton tersebut. Adapun faktor yang mempengaruhi pergeseran kimia ialah faktor induktif,

faktor anisotropik, faktor sterik, ikatan hidrogen, dan pelarut yang dipakai. *Spin-spin coupling* menjelaskan interaksi inti magnetik dalam sebuah inti. Selain itu juga memberikan informasi mengenai inti tetangga. ^1H RMI merupakan dasar untuk memahami resonansi magnetik inti lain, terutama ^{13}C RMI. Interpretasi spektrum ^1H dan ^{13}C RMI akan saling melengkapi.

Terdapat perbedaan yang cukup signifikan antara ^1H RMI dan ^{13}C RMI, antara lain puncak ^{13}C RMI terdistribusi pada daerah pergeseran kimia yang lebih luas, intensitas puncak ^{13}C RMI tidak berhubungan dengan jumlah atom karbon, kelimpahan dan sensitivitas inti ^{13}C lebih rendah sehingga dibutuhkan jumlah sampel yang lebih banyak dan waktu pengukuran yang lebih panjang, saat berada dalam pelarut dideuterisasi, puncak kedua inti memberikan multiplisitas yang berbeda (Silverstein, Webster dan Kiemle, 2005).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam PUSLIT Kimia LIPI Serpong dan Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, selama kurang lebih 4 bulan.

3.2 Alat

Alat-alat gelas, timbangan analitik, mortar, kertas saring, corong pemisah, alat penyemprot, oven, penguap vakum putar (Buchii), shaker, lampu uv, silika gel 60 (E. Merck), kolom kromatografi, lempeng silika gel F₂₅₄ (E. Merck 05554), pipet, mikroplat, lampu meja, pipa kapiler, eppendorf, peralatan uji BSLT, peralatan uji antioksidan, aluminium foil, spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2000), Resonansi Magnetik Inti (500 ¹MHz ¹H¹RMN dan 125,76 MHz ¹³C¹RMN, Jeol).

3.3 Bahan

3.3.1 Simplisia

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder yang diperoleh dari hutan gunung Mekongga, Sulawesi dan telah dideterminasi Herbarium Bogoriense (LIPI) Cibinong.

3.3.2 Hewan Uji

Artemia salina Leach

3.3.3 Bahan Kimia

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), dimetil sulfoksida (DMSO), asam klorida, kalium iodida, iodium, asam sulfat, raksa (II) klorida, serbuk magnesium, serbuk zink, serbuk asam borat, serbuk asam oksalat, gelatin, bismut (III) nitrat, asam nitrat, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman); *n*-heksan, etil asetat,

n-butanol, etanol, metanol, kloroform, air suling, silika gel 60 (35-70 dan 70-230 mesh, E. Merck 1.07734), natrium bikarbonat, asam asetat anhidrat (Univar, USA), α -naftol, vanilin-H₂SO₄, aseton, eter, besi (III) klorida, natrium klorida (Mallinckrodt Chemicals, USA), kalium hidroksida, aluminium (III) klorida, ammonium hidroksida, benzen.

3.3.4 Bahan Perbandingan

Quersetin (Sigma-Aldrich) dan Asam askorbat.

3.4 Prosedur Pelaksanaan

3.4.1 Diagram Alir Penelitian

Tahap penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada diagram alir penelitian (Lampiran 1), yaitu ekstraksi simplisia, identifikasi golongan senyawa ekstrak, partisi ekstrak dengan cara cair-cair, pengujian aktivitas antioksidan dan toksisitas hasil partisi, identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi teraktif yang akan diisolasi lebih lanjut, kromatografi kolom vakum fraksi teraktif, penggabungan fraksi yang diperoleh berdasarkan kesamaan pola kromatogram pada KLT, uji aktivitas fraksi gabungan, kromatografi kolom konvensional fraksi gabungan teraktif, identifikasi dan uji aktivitas isolat.

3.4.2 Persiapan Bahan Uji

3.4.2.1 Persiapan Simplisia Uji

Simplisia diambil dari hutan Gunung Mekongga, Sulawesi. Daun diambil sekitar 5 kg berat basah yang menghasilkan 1 kg daun kering. Dilapangan, daun dikeringkan dibawah cahaya dengan bantuan kipas angin menggunakan tenaga generator. Pengeringan kemudian diselesaikan di LIPI Cibinong setelah tim kembali dan diserbukkan. Serbuk kemudian dikirim ke Laboratorium Kimia Bahan Alam PUSLIT Kimia LIPI dan disimpan dalam plastik kedap udara serta terlindung dari cahaya.

3.4.2.2 Ekstraksi

Serbuk simplisia sebanyak 1,5 kg diekstraksi menggunakan metode maserasi yang dikombinasi dengan perkolasi selama 1x24 jam menggunakan pelarut metanol sebanyak 4L yang telah didestilasi hingga semua simplisia terendam pelarut. Setelah 24 jam, keran perkulator dibuka dan ekstrak cair ditampung pada wadah kemudian dilakukan pengulangan ekstraksi sebanyak 7 kali. Seluruh ekstrak cair yang didapatkan diuapkan menggunakan penguap putar pada temperatur 40°C dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 37°C. Selanjutnya ekstrak yang telah kering ditimbang untuk menentukan rendemennya terhadap berat simplisia awal (Lampiran 2). Perhitungan rendemen dilakukan dengan membandingkan jumlah ekstrak kering yang didapat terhadap jumlah serbuk simplisia yang diekstraksi kemudian dikalikan 100%.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Berat serbuk simplisia}} \times 100\% \quad (3.1)$$

3.4.2.3 Fraksinasi

Ekstrak metanol yang telah dikeringkan kemudian difraksinasi menggunakan pelarut secara gradien dimulai dari non polar sampai polar yakni *n*-heksan, etil asetat, butanol, dan metanol yang telah didestilasi. Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Ekstrak metanol didispersikan dengan air terlebih dahulu kemudian dipartisi dengan menambahkan *n*-heksan dengan perbandingan 1:1, campuran dikocok kuat dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan lapisan *n*-heksan berada dibagian atas dan lapisan air berada di bagian bawah kemudian keduanya dipisahkan. Proses ini dilakukan berulang hingga didapat lapisan *n*-heksan yang tidak pekat lagi.

Fraksi *n*-heksan diuapkan dengan menggunakan penguap putar hingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksan sedangkan lapisan air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat dan butanol hingga diperoleh fraksi kental etil asetat dan butanol. Lapisan air dikeringkan di oven kemudian dilarutkan dengan metanol sedikit demi sedikit dan disaring.

Universitas Indonesia

Fraksi metanol diuapkan dengan menggunakan penguap putar hingga mengental. Fraksi *n*-butanol dan metanol yang diperoleh dikeringkan di oven pada temperatur 37°C kemudian ditimbang (Lampiran 3).

3.4.3 Penapisan Fitokimia

3.4.3.1 Identifikasi Alkaloid

Larutan Uji: 500 mg ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring sehingga diperoleh filtrat.

a. Pereaksi Bouchardat

Pereaksi : 2 g iodium P dan 4 g kalium iodida P dilarutkan dalam 100,0 mL akuades

Prosedur : 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Bouchardat. Jika terbentuk endapan coklat sampai hitam maka positif mengandung alkaloid.

b. Pereaksi Mayer

Pereaksi : campuran larutan raksa (II) klorida P (1,358 g HgCl₂ dalam 60 mL akuades) dengan larutan kalium iodida P (5 g kalium iodida P dalam 10 mL akuades) dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 mL.

Prosedur: 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol maka positif mengandung alkaloid.

c. Pereaksi Dragendorf

Pereaksi : campuran larutan bismuth nitrat P (8 g bismuth nitrat P dalam 20 mL asam nitrat) dan larutan kalium iodida P (27,2 g kalium iodida P dalam 50,0 mL akuades) yang didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 mL.

Prosedur : 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorf. Jika terbentuk endapan jingga coklat maka positif mengandung alkaloid.

Serbuk mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan dua golongan larutan percobaan yang digunakan (Departemen Kesehatan RI, 1995b). Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Chinae cortex*.

3.4.3.2 Identifikasi Gula

Pereaksi Mollisch = 1,5 g α -naftol P dalam 50 mL metanol.

1 mL larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikeringkan di atas penangas air. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (Departemen Kesehatan RI, 1995b). Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Nerii folium*.

3.4.3.3 Identifikasi Saponin

500 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Departemen Kesehatan RI, 1995b). Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Liquiritae radix*.

3.4.3.4 Identifikasi Flavonoid

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol P hingga ekstrak larut. Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Ortosiphonis folium*.

- a. 2 mL larutan ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 2 mL HCl 2N, dibiarkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Jika terbentuk warna merah intensif dalam waktu 2-5 menit menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).

- b. 2 mL larutan ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 10 tetes HCl pekat P. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron)
- c. Ekstrak dilarutkan dalam aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk asam oksalat P, dipanaskan hati-hati dan dihindari pemnasan berlebihan. Sisa dicampur dengan 10 ml eter P. Diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavanoid (Departemen Kesehatan RI, 1995b).

3.4.3.5 Identifikasi Terpen

10 mg ekstrak ditambahkan 5 mL eter dan diuapkan di dalam cawan penguap. Residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Ekstrak mengandung sterol/ terpen apabila terbentuk warna merah-hijau/violet-biru (Farnsworth, 1966). Hasil uji dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Caryophili flos*.

3.4.3.6 Identifikasi Tanin

10 mg ekstrak ditambah 15 mL air panas. Larutan dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit kemudian disaring. Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair *Camellia folium*.

- a. Filtrat ditambah beberapa tetes FeCl_3 1 %, menghasilkan warna hijau violet.
- b. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan Gelatin 10% membentuk endapan putih.
- c. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan NaCl-Gelatin (larutan Gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) membentuk endapan putih (Farnsworth, 1966; Trease dan Evans, 1978).

3.4.3.7 Identifikasi Antrakuinon

10 mg ekstrak dilarutkan dengan asam sulfat 2 N. Larutan dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Larutan ditambahkan 10 mL benzen P, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzen dipisahkan, lalu disaring. Filtrat berwarna kuning

menunjukkan adanya Antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1 – 2 mL natrium hidroksida 2 N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna (Departemen Kesehatan RI, 1995b). Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu ekstrak metanol cair Rhei radix.

3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan (Blois, 1958)

3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH (BM=394,32)

10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100,0 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 100 µg/mL.

3.4.4.2 Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/mL yang telah dibuat diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak pada panjang gelombang 400-800 nm kemudian ditetapkan panjang gelombang optimumnya.

3.4.4.3 Pengukuran Absorbansi Larutan Blanko

Dipipet 1 mL larutan DPPH 100 µg/mL kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambah 3 mL metanol p.a. Setelah homogen, tabung yang berisi larutan tersebut diinkubasi dalam penangas air 37°C selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak pada panjang gelombang optimum.

3.4.4.5 Pengujian Larutan Pembanding

5 mg asam askorbat ditimbang kemudian dilarutkan dalam 5,0 mL metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan konsentrasi 5; 7,5; 10; 12,5 dan 15 µg/mL. 5 mg quersetin ditimbang kemudian dilarutkan dalam 5,0 mL metanol p.a sehingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan konsentrasi 2; 4; 5; 6; 7 µg/mL. Setelah itu 1 mL larutan masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan

Universitas Indonesia

DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan metanol sampai 4 mL. Setelah homogen, tabung yang berisi larutan tersebut diinkubasi dalam penangas air suhu 37°C selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak pada panjang gelombang optimum.

3.4.4.6 Pengujian Ekstrak

Ditimbang 5 mg sampel yang dilarutkan dalam 5,0 mL metanol sehingga diperoleh larutan induk konsentrasi 1000 µg/mL. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan konsentrasi 50, 60, 70, 80, dan 90 µg/mL untuk ekstrak metanol dan fraksi *n*-heksan. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 µg/mL untuk fraksi etil asetat. Dilakukan pengenceran untuk membuat larutan konsentrasi 25; 27,5; 30; 32,5 dan 50 µg/mL untuk fraksi butanol dan metanol. Sedangkan untuk senyawa murni dibuat konsentrasi 50, 60, 70, 90, 100 µg/mL. Setelah itu masing-masing konsentrasi sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan metanol sampai 4 mL. Setelah homogen, tabung yang berisi larutan tersebut diinkubasi dalam penangas air 37°C selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak pada panjang gelombang optimum.

3.4.4.7 Perhitungan

Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (3.2)$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y = a + bx$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi (µg/mL) dan y adalah persentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu

konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50% konsentrasi awal. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti nilai y dengan 50.

3.4.5 Uji *Brine Shrimp Lethality Test*

3.4.5.1 Penetasan Telur *Artemia salina* L.

Penetasan telur dilakukan pada wadah bening menggunakan media air laut dari Pantai Anyer. Wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian terang dan gelap oleh suatu sekat berlubang. Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan. Selama penetasan diberi penerangan dengan cahaya pijar/neon.

3.4.5.2 Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak, hasil fraksinasi dan senyawa isolat ditimbang sebanyak 4 mg kemudian dilarutkan dalam 10 μ l DMSO serta air laut sebanyak 2 mL sehingga didapatkan konsentrasi 2000 μ g/mL yang merupakan larutan induk. Pengenceran dilakukan dengan mengambil larutan induk sebanyak 500 μ l kemudian ditambahkan 500 μ l air laut sehingga diperoleh konsentrasi 1000 μ g/mL. Larutan tersebut dipipet 200 μ l lalu ditambahkan 800 μ l air laut sehingga diperoleh konsentrasi 200 μ g/mL. Larutan tersebut dipipet 100 μ l lalu ditambahkan 900 μ l air laut sehingga diperoleh konsentrasi 20 μ g/mL.

3.4.5.3 Pengujian (Meyer, et.al, 1982)

100 μ l air laut yang mengandung 10 larva dipipet kemudian dimasukkan ke dalam wadah uji. Selanjutnya ditambahkan larutan sampel yang akan diuji sebanyak 100 μ l sehingga konsentrasi akhir sampel menjadi 10, 100, 500 dan 1000 μ g/mL. Percobaan dilakukan secara triplo. Sebagai kontrol adalah larva dalam air laut tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang mati.

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{akumulasi kematian}}{\text{akumulasi kematian} + \text{akumulasi hidup}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Setelah didapatkan persentase mortalitas dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y = a + bx$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y adalah persentase mortalitas (%). Toksisitas dinyatakan dengan *Lethal Concentration 50%* atau LC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat membunuh *nauplii* sebanyak 50% dari jumlah awal. Nilai LC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila memiliki nilai $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$.

3.4.6 Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Isolasi dan pemurnian senyawa dilakukan terhadap ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Sebanyak 15 g ekstrak etil asetat daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder difraksinasi dengan kromatografi kolom dipercepat menggunakan fase diam 70 g silika gel 60 dan sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut mulai dari *n*-heksan dengan etil asetat dengan kenaikan polaritas mulai dari *n*-heksan 100% hingga etil asetat 100% dilanjutkan dengan menggunakan campuran etil asetat 100% hingga metanol 100% dengan gradien kepolaran pelarut sebesar 5%. Setiap eluat ditampung dalam botol 100 mL dan diuapkan dengan penguap putar, lalu setiap fraksi dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT), yang selanjutnya digabung berdasarkan kesamaan pola pada kromatogram KLT sehingga diperoleh 34 fraksi gabungan. Fraksi gabungan di uji aktivitas antioksidan dan toksisitasnya untuk menentukan fraksi yang akan diisolasi lebih lanjut. Pemilihan sampel yang diuji berdasarkan kemungkinan untuk diisolasi dari pola kromatogram KLT dan bobot ekstrak terbanyak. Sebagai pendahuluan aktivitas antioksidan diuji secara kualitatif menggunakan KLT. Masing-masing fraksi dibuat dalam konsentrasi 50 dan 200 $\mu\text{g/mL}$ kemudian ditotolkan pada lempeng KLT. Selanjutnya bercak disemprot dengan pereaksi DPPH. Bercak yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning dengan latar belakang ungu di uji secara kuantitatif. Isolasi selanjutnya dilakukan terhadap fraksi gabungan 29 (FG 29) sebanyak 1 g dengan kromatografi kolom konvensional dengan fase diam silika gel 60 (0,063 – 0,200 mm) sebanyak 94,7 g dan sebagai fase gerak kembali digunakan gradien

Universitas Indonesia

kombinasi pelarut mulai dari nonpolar sampai ke polar (*n*-heksan:etilasetat-etilasetat:metanol). Didapatkan isolat pada fraksi *n*-heksan:etil asetat = 95:5. Selanjutnya terhadap isolat yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antioksidan dan toksisitas kembali serta karakterisasi senyawa.

3.4.7 Penentuan Struktur Senyawa Murni

3.4.7.1 Kromatografi Lapis Tipis 2 Arah

Cairan pengelusi dijenuhkan dalam bejana \pm 5 menit. Pada plat KLT ditotolkan sampel uji menggunakan pipa kapiler kemudian dimasukkan ke dalam bejana dengan posisi cairan pengelusi di bawah bercak penotolan. Untuk senyawa murni dilakukan elusi dua arah, eluen yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat (9,5:0,5) dilanjutkan dengan perbandingan eluen *n*-heksan : kloroform (9:1). Eluen dibiarkan merambat sampai mencapai batas plat yang telah ditandai. Noda diidentifikasi pada sinar UV dengan λ_{max} 254 dan 366, penyemprotan dengan H₂SO₄ 10% dalam metanol dengan pemanasan selama 10 menit kemudian ditentukan Rf-nya.

3.4.7.2 Pemeriksaan Spektrum UV-VIS

Pengukuran dilakukan menggunakan pelarut metanol pada panjang gelombang 200-800 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum dan spektrum serapannya.

3.4.7.3 Pemeriksaan Spektrum Resonansi Magnet Inti

Sejumlah 4 mg senyawa murni dilarutkan dalam kloroform deuterium (CDCl₃). Selanjutnya diukur dengan alat ¹H RMI 500 MHz dan ¹³C RMI 125,76 MHz dengan standar Tetra Metil Silan (TMS).

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Simplisia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder (Fagaceae) yang diperoleh dari hutan Gunung Mekongga, Sulawesi. Daun dikeringkan dan diserbukkan kemudian disimpan dalam plastik kedap udara oleh tim biologi LIPI Cibinong yang selanjutnya dikirim kepada tim kimia LIPI Serpong dan disimpan terlindung dari cahaya untuk mencegah kerusakan dan mutu simplisia tetap terjaga. Simplisia telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI) Cibinong dengan hasil seperti yang terlihat pada Lampiran 8.

4.2 Ekstraksi Simplisia

Serbuk simplisia kering sebanyak 1,5 kg diekstraksi dengan metode maserasi dikombinasi dengan perkolasi. Metode ini dipilih karena ekstraksi cara dingin dapat mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan pemanasan. Pelarut yang digunakan adalah metanol karena alkohol alifatik dengan jumlah atom karbon sampai tiga atau campuran alkohol dan air merupakan pelarut yang memiliki kekuatan ekstraksi terbaik untuk senyawa alam dengan bobot molekul rendah seperti alkaloid, saponin dan flavonoid (Samuelsson, 1999). Serbuk direndam dengan 4 L metanol hingga terendam sempurna selama 24 jam. Hal ini dilakukan agar pelarut yang digunakan berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan senyawa yang terkandung di dalamnya dan larutan melewati dinding sel serta bercampur dengan cairan disekitarnya sehingga terbentuk kesetimbangan (Samuelsson, 1999). Ekstraksi dilakukan sebanyak tujuh kali. Setelah itu filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan penguap putar pada suhu 40°C hingga metanol menguap seluruhnya. Penggunaan vakum memungkinkan pelarut dapat menguap pada suhu rendah sehingga senyawa yang terkandung dalam ekstrak tidak rusak. Selain itu, pelarut yang menguap dapat ditampung dan digunakan kembali untuk maserasi berikutnya.

Ekstrak metanol dikeringkan didalam oven pada suhu 37⁰C kemudian ditimbang untuk menghitung rendemen ekstrak. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000). Diperoleh ekstrak metanol sebanyak 108,2525 g dengan rendemen 7,2168 % dan kemudian disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.1.

4.3 Fraksinasi

Ekstrak kering metanol kemudian difraksinasi menggunakan gradien pelarut mulai dari pelarut nonpolar hingga pelarut polar yaitu *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol dan metanol. Pelarut yang pertama kali digunakan adalah *n*-heksan yang bersifat non-polar dengan tujuan untuk menghilangkan lemak dan mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non-polar seperti asam lemak, sterol, kumarin, dan beberapa terpenoid. Etil asetat dengan tingkat kepolaran menengah digunakan untuk mengekstraksi senyawa dengan polaritas menengah seperti flavonoid, tanin dan beberapa alkaloid sedangkan butanol dan metanol yang lebih polar digunakan untuk mengekstraksi senyawa polar seperti flavonoid, glikosida, tanin dan beberapa alkaloid (Sarker *et al*, 2006).

Fraksinasi dilakukan dengan metode partisi menggunakan corong pisah. Ekstrak kering metanol didispersikan dengan air terlebih dahulu kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-heksan dengan perbandingan 1:1. Air digunakan karena kepolaranya sangat berbeda jauh dengan pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sehingga diharapkan pemisahan dapat terjadi secara sempurna. Campuran ini dikocok kuat lalu didiamkan hingga terbentuk dua lapisan dengan lapisan air yang berada di bagian bawah dan lapisan *n*-heksan di bagian atas. Lapisan *n*-heksan dipisahkan kemudian diuapkan menggunakan penguap putar sehingga diperoleh fraksi *n*-heksan kental. Lapisan air selanjutnya difraksinasi kembali dengan cara yang sama berturut-turut menggunakan pelarut etil asetat dan *n*-butanol hingga diperoleh fraksi etil asetat kental, fraksi *n*-butanol kental dan lapisan air. Lapisan air yang terakhir diperoleh diuapkan dengan menggunakan penguap putar hingga sedikit mengental, kemudian ditambahkan metanol sedikit demi sedikit dan disaring kemudian diuapkan menggunakan penguap putar sehingga diperoleh

Universitas Indonesia

fraksi metanol. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian ditimbang dengan hasil *n*-heksan (20,4932 g), etil asetat (20,4932 g), butanol (4,6379 g) dan metanol (6,0407 g). Hasil partisi dan rendemennya dapat dilihat pada Tabel 4.2.

4.4 Penapisan Fitokimia

Ekstrak metanol dan fraksi teraktif hasil fraksinasi diidentifikasi secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang tertarik dengan pelarut masing-masing fraksi sehingga dapat diduga golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan toksisitas. Golongan senyawa kimia yang diidentifikasi adalah alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida dan antrakuinon. Pengujian dilakukan dengan menggunakan tanaman pembanding untuk masing-masing golongan senyawa kimia. Hasil identifikasi golongan senyawa selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.4.1 Alkaloid

Pada umumnya, senyawa alkaloid ditemukan dalam bentuk garam yang bersifat larut air di dalam tanaman sehingga golongan senyawa ini seharusnya dapat tertarik dengan cukup baik saat diekstraksi menggunakan pelarut metanol (Harbone, 1987). Untuk menghindari hasil uji yang sifatnya positif atau negatif palsu, perlu dilakukan penarikan senyawa alkaloid terlebih dahulu. Tahap penarikan ini dilakukan dengan menggunakan pelarut air dan HCl 2N dengan perbandingan 1:9. Setelah diperoleh filtrat, larutan diuji dengan pereaksi pengendap (Mayer, Dragendorf, dan Bouchardart). Namun, senyawa alkaloid dengan struktur nitrogen heterosiklik, amin oksida, dan alkaloid kuartener tidak dapat terdeteksi dengan pereaksi pengendap. Hal ini akan menghasilkan negatif palsu pada pengujian alkaloid dengan pereaksi pengendap (Farnsworth, 1966). Larutan uji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf akan membentuk senyawa adisi yang tidak larut, sedangkan dengan pereaksi Bouchardart akan membentuk senyawa kompleks bebas (Depkes, 1995b).

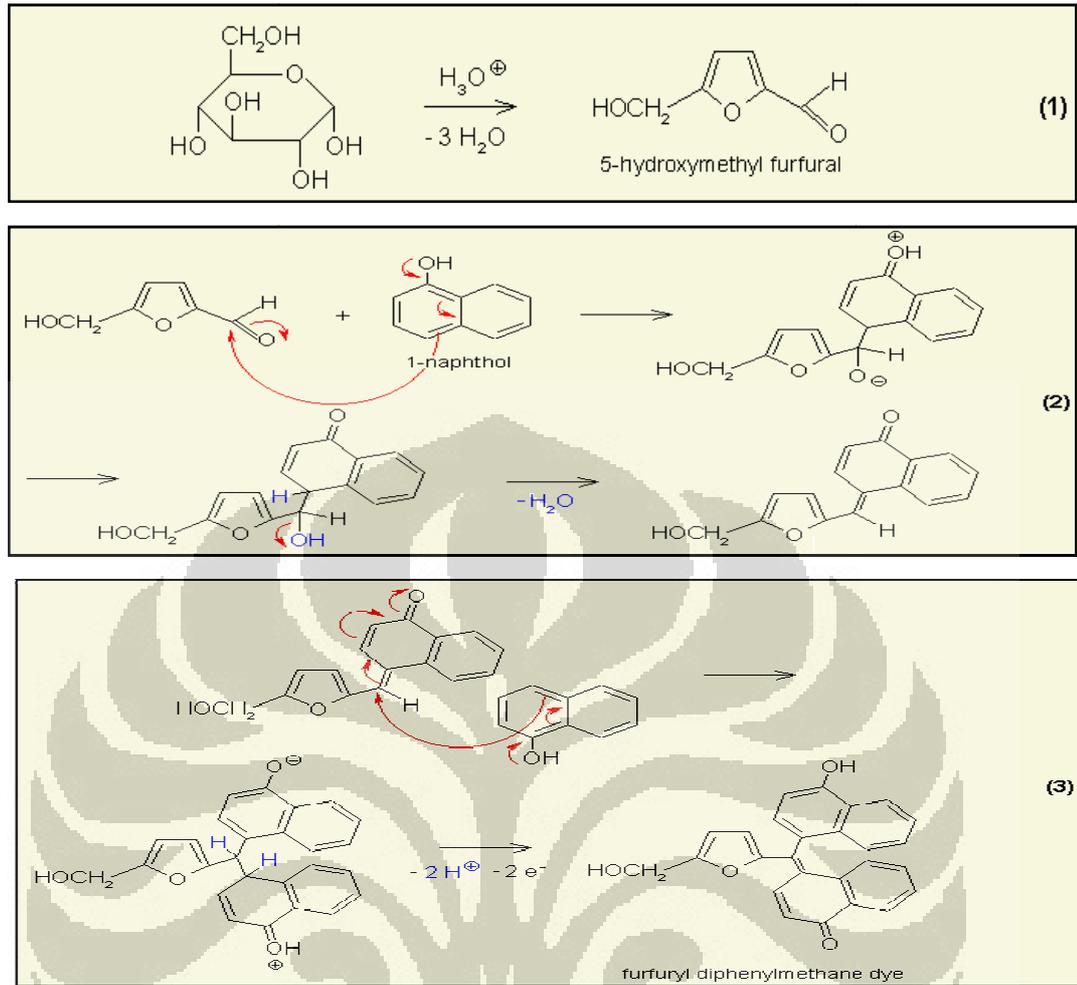
Berdasarkan hasil identifikasi (Tabel 4.3), ekstrak metanol, fraksi etilasetat dan fraksi butanol tidak mengandung alkaloid karena hasil reaksi dengan pereaksi Mayer, Dragendorf dan Bouchardart tidak terbentuk endapan.

Universitas Indonesia

4.4.2 Gula

Ikatan gula diidentifikasi menggunakan pereaksi Mollisch. Sebelumnya, perlu dilakukan hidrolisis terlebih dahulu untuk membebaskan gula. Hidrolisis dilakukan dengan memanaskan ekstrak dengan HCl 2N. Uji ini didasari oleh reaksi dehidrasi karbohidrat oleh asam sulfat membentuk cincin furfural yang berwarna ungu. Reaksi positif ditandai dengan munculnya cincin ungu di permukaan antara lapisan asam dan lapisan sampel. Sampel yang diuji dicampur dengan reagent Molisch, yaitu α -naphthol yang terlarut dalam metanol. Setelah pencampuran atau homogenisasi, H_2SO_4 pekat perlahan-lahan dituangkan melalui dinding tabung reaksi agar tidak sampai bercampur dengan larutan atau hanya membentuk lapisan.

Asam sulfat pekat akan mendehidrasi gula membentuk senyawa turunan furfural. Jika gulanya adalah pentosa dan pentosan, maka akan terbentuk furfural sedangkan jika gulanya adalah heksosa dan heksosan maka akan terbentuk 5-hidroksimetil furfural. Selanjutnya hidroksimetilfurfural akan diserang oleh α -naftol dimana gugus hidoksilnya memiliki efek resonansi pendonor elektron kuat yang meningkatkan densitas elektron pada cincin benzen. α -naftol berperan sebagai nukleofil dan akan ditambahkan pada karbon terpolarisasi positif dari gugus 5-hidroksimetil furfural. Setelah migrasi proton intramolekular air akan dieliminasi dan terbentuk ikatan rangkap dua C-C. Setelah itu terjadi adisi nukleofilik kembali oleh molekul α -naftol. Setelah migrasi proton intramolekular, dua proton akan dieliminasi sehingga terbentuk senyawa ungu furfural difenilmetana. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut (Keusch, 2003) :



[Sumber : Keusch, 2003]

Gambar 4.1. Reaksi Mollisch

Berdasarkan hasil identifikasi, ikatan gula terkandung pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol (Tabel 4.3). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.2.

4.4.3 Saponin

Golongan senyawa saponin mempunyai sifat khas yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisan yang sederhana. Dalam cairan, saponin dapat membentuk busa setelah pengocokan dan busa bertahan. Metode identifikasi ini digunakan karena mudah dilakukan, cepat, dan hanya membutuhkan sedikit peralatan. Bila busa yang terbentuk hanya sedikit, dan hanya bertahan selama beberapa menit, hal ini mungkin disebabkan adanya senyawa asam, atau rendahnya konsentrasi saponin (Farnsworth, 1966).

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol mengandung saponin yang ditunjukkan oleh terbentuknya busa pada saat dikocok dengan air panas dan tetap stabil dengan penambahan HCl 2N. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.

4.4.4 Flavonoid

Pada pengujian, ekstrak metanol dan fraksi etil asetat diuji dengan reduksi menggunakan serbuk Zn dimana jika terbentuk warna merah intensif dalam waktu 2-5 menit menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol). Warna merah yang terbentuk hanya sedikit. Hal ini mungkin dikarenakan pada ekstrak metanol dan fraksi etil asetat, flavonoid yang terambil untuk pengujian jumlahnya sedikit karena masih tercampur dengan banyak senyawa lainya. Sedangkan pada fraksi *n*-butanol karena lebih polar dapat menarik flavonoid dalam jumlah yang lebih banyak. Kemudian dilakukan pengujian dengan reduksi menggunakan serbuk Mg (reaksi Shinoda) dimana jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon, auron). Reaksi pada ekstrak metanol dan fraksi etil setat memberikan hasil negatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh flavonoid yang diambil untuk pengujian jumlahnya sedikit karena masih tercampur dengan banyak senyawa lainya sehingga tidak dapat terdeteksi. Sedangkan pada fraksi *n*-butanol positif karena bersifat lebih polar dapat menarik flavonoid yang juga bersifat polar karena sebagian besar berada dalam bentuk garam pada tanaman dalam jumlah yang lebih banyak. Terakhir dilakukan reaksi Wilson-Taubock (pembentukan kompleks dengan

asam oksalat-asam borat) yang diamati pada sinar uv dengan panjang gelombang 366 nm dimana fluoresensi kuning menunjukkan adanya flavonoid (Departemen Kesehatan RI, 1995b). Ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi butanol memberikan hasil positif. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.4.5 Terpen

Senyawa terpen umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lemak (Harborne, 1987). Oleh karena itu dalam pengujian golongan senyawa, terpen ditarik dengan eter yang juga bersifat non polar. Terpen dapat diidentifikasi dengan tes Liebermann-Bouchard. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah-hijau, merah muda, atau violet (Farnsworth, 1966). Berdasarkan hasil penapisan fitokimia (Tabel 4.3), terpen terkandung pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol negatif. Terpen tertarik oleh *n*-heksan karena bersifat non polar sedangkan pada fraksi *n*-butanol kemungkinan terpen berada dalam bentuk glikosida karena hasil reaksi fraksi *n*-butanol dengan pereaksi Mollisch memberikan hasil positif yang menunjukkan adanya ikatan gula (Depkes RI, 1995b). Hasil identifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.4.

4.4.6 Tanin

Tanin memiliki kemampuan menyambung-silang protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Oleh karena itu identifikasi tanin dapat dilakukan dengan larutan gelatin, dan natrium klorida-gelatin. Hasil positif pada kedua pereaksi ini dikonformasi dengan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna biru, biru-hitam, hijau, atau biru hijau (Farnsworth, 1966).

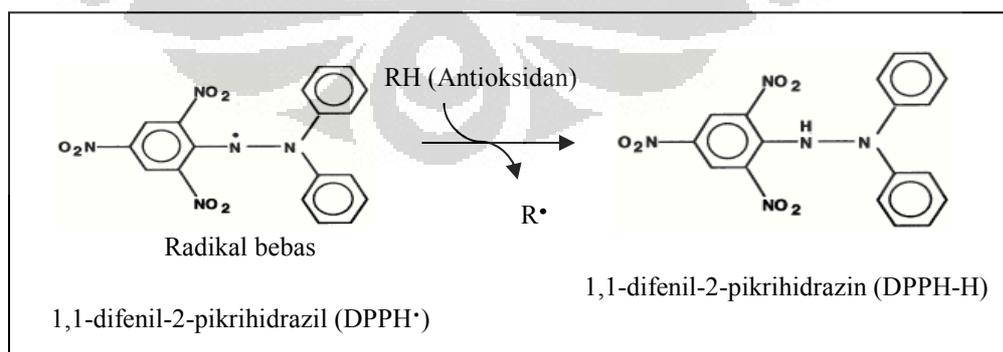
Berdasarkan hasil penapisan fitokimia (Tabel 4.3) menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol mengandung tanin yang ditunjukkan oleh terbentuknya warna kehitaman ketika ditetesi FeCl_3 . Reaksi dengan menggunakan larutan gelatin, dan natrium klorida-gelatin juga memberikan hasil positif karena terbentuk endapan putih. Hasil identifikasi dengan pereaksi FeCl_3 dapat dilihat pada Gambar 4.5.

4.4.7 Antrakuinon

Antrakuinon di alam kemungkinan terdapat dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron (bentuk tereduksi). Untuk mengidentifikasi antrakuinon, perlu ditambahkan asam sulfat 2N dan dipanaskan terlebih dahulu untuk menghidrolisis antrakuinon yang berada dalam bentuk glikosidanya. Kemudian, dilakukan pengujian terhadap senyawa antrakuinon. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol tidak mengandung antrakuinon (Tabel 4.3).

4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder adalah metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil karena delokalisasi elektron diseluruh molekul sehingga tidak terjadi dimerisasi yang menjadi masalah untuk radikal bebas lainnya. Delokalisasi elektron juga menyebabkan timbulnya warna ungu yang ditunjukkan oleh pita serapan larutan dalam etanol pada panjang gelombang sekitar 520 nm. Ketika DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, terjadi peningkatan bentuk tereduksi dari DPPH yaitu 1,1-difenil-2-pikrihidrazin yang mengakibatkan hilangnya warna ungu (terbentuk warna kucing pucat) (Molyneux, 2004).



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009]

Gambar 4.6. Reaksi antara radikal bebas DPPH• dan antioksidan (RH)

Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer *uv-vis*. Monitoring radikal DPPH dengan spektrofotometer *uv-vis* menjadi metode yang digunakan secara luas dan sering dilakukan karena sederhana dan akurat. Hasil uji dilaporkan sebagai EC_{50} yaitu jumlah antioksidan yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% konsentrasi radikal DPPH awal (Brand-Williams, Cuvelier, dan Berset, 1995).

Langkah pertama yang dilakukan adalah optimasi panjang gelombang DPPH. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang optimum karena kepekaanya maksimal, bentuk kurva absorbansi datar sehingga hukum Lambert-Beer akan terpenuhi dan jika dilakukan pengukuran ulang kesalahannya kecil sekali (Gandjar dan Rohman, 2007). Berdasarkan penelusuran literatur panjang gelombang optimum dari DPPH berkisar antara 515-520 nm. Karena peralatan yang digunakan berbeda dengan literatur yang dapat menyebabkan perbedaan serapan maksimum maka dilakukan optimasi panjang gelombang dimana untuk panjang gelombang diatas 320 nm perbedaanya tidak lebih dari ± 2 nm dari panjang gelombang yang ditentukan (Depkes RI, 1979). Didapatkan panjang gelombang optimum DPPH sebesar 515 nm. Spektrum serapan dapat dilihat pada Gambar 4.7. Oleh sebab itu pengukuran serapan ekstrak diukur pada panjang gelombang 515 nm.

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak metanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, butanol dan metanol memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} berturut-turut menunjukkan nilai 57,4684; 159,2281; 48,2503; 23,8062 dan 27,0773 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol dan fraksi metanol memiliki aktivitas antioksidan kuat sedangkan fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas antioksidan sedang. Sebagai pembanding, digunakan quersetin dan asam askorbat yang memiliki nilai IC_{50} berturut-turut 3,7496 dan 9,6065 $\mu\text{g/mL}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.4. Fraksi teraktif ditunjukkan oleh fraksi butanol dan metanol. Hal ini dikarenakan butanol dan metanol akan menarik senyawa polar seperti flavonoid, glikosida, tanin, dan beberapa alkaloid (Sarker *et al*, 2006) yang banyak mengandung gugus OH, dimana pada uji aktivitas antioksidan dengan metode

DPPH memang dibutuhkan atom H sebagai donor proton untuk menetralkan radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004).

4.6 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Uji toksisitas ini dilakukan sebagai skrining senyawa yang memiliki aktivitas toksisitas atau sitotoksitas (Harmita dan Radji, 2008). Pengujian menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah yang berumur 48 – 72 jam karena pada rentang umur tersebut, udang belum dewasa di mana cangkangnya belum terbentuk sehingga hewan uji masih bersifat sensitif terhadap sampel yang digunakan (Mesiana, 2010). Air laut yang digunakan pada pengujian adalah air laut yang diperoleh dari Pantai Anyer.

Setelah 24 jam, terlihat telur telah menetas menjadi larva dan larva yang akan digunakan sebagai hewan uji adalah larva yang berumur 48 jam. Larva yang telah menetas akan berpindah dari bagian bejana yang gelap ke bagian yang terang. Larva kemudian dipindahkan ke wadah lain. Pada umumnya larva yang telah berumur 48 jam berukuran lebih besar, dan bagian kepalanya terlihat lebih besar dari bagian ekornya (Mesiana, 2010).

Uji dengan organisme ini sesuai untuk aktifitas farmakologi dalam ekstrak tanaman yang bersifat toksik. Penelitian menggunakan *Artemia salina* memiliki beberapa keuntungan antara lain cepat, mudah, murah dan sederhana. Penelitian dengan larva *Artemia salina* Leach telah digunakan untuk senyawa aktif tanaman secara umum dan tidak spesifik untuk zat anti kanker. Namun demikian hubungan yang signifikan dari sampel yang bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach ternyata juga mempunyai aktifitas sitotoksik. Berdasarkan hal tersebut maka larva *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk uji toksisitas (Meyer *et al.*, 1982).

Ekstrak yang bersifat toksik adalah ekstrak dengan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (Harmita dan Radji, 2008). Meyer *et al.*, (1982) mengklasifikasikan lebih rinci tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman yaitu suatu ekstrak dianggap sangat toksik bila memiliki nilai LC_{50} di bawah 30 ppm, dianggap toksik bila memiliki nilai LC_{50} 30-1000 ppm dan dianggap tidak toksik bila nilai LC_{50} di atas 1000 ppm.

Universitas Indonesia

Hasil uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach menunjukkan ekstrak metanol, fraksi n-heksan, etil asetat, butanol dan metanol memiliki toksisitas dengan nilai LC_{50} berturut-turut menunjukkan nilai 669,4189; 125,7332; 79,5480; 223,3089 dan 523,5763 $\mu\text{g/ml}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.5. Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling aktif.

4.7 Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Isolasi dan pemurnian senyawa dilakukan terhadap ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan dan toksisitas tertinggi. Berdasarkan uji aktivitas, fraksi teraktif antioksidan adalah fraksi *n*-butanol dengan nilai IC_{50} 23,8062 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan fraksi teraktif toksisitas adalah fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} 79,5480 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan jumlah ekstrak yang diperoleh dimana fraksi etil asetat (18,6622 g) lebih banyak jumlahnya dari fraksi *n*-butanol (4,6379 g) serta pola kromatogram fraksi etil asetat yang lebih memungkinkan untuk diisolasi menggunakan fase diam silika gel maka yang dipilih untuk isolasi lebih lanjut adalah fraksi etil asetat. Meskipun nilai IC_{50} fraksi etil asetat lebih kecil dari fraksi *n*-butanol, namun masih masuk dalam kategori antioksidan kuat.

Sebanyak 15 g ekstrak etil asetat daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder difraksinasi dengan kromatografi kolom dipercepat. Cara ini dipilih karena dianggap efisien untuk menghasilkan pemisahan yang baik secara cepat. Tidak seperti kolom konvensional yang hanya menggunakan gaya gravitasi sebagai tenaga penggerak eluen, kromatografi kolom dipercepat menggunakan bantuan vakum untuk menggerakkan eluen. Preparasi sampel dilakukan dengan cara kering karena sampel tidak larut dalam *n*-heksan (eluen yang digunakan pertama kali pada kolom). Sampel digerus terlebih dahulu dengan silika gel 60 (0,063 – 0,200 mm) sampai homogen. Perbandingan maksimal sampel dan silika adalah 1:1. Hal ini agar tinggi campuran sampel dan silika gel pada kolom tidak terlalu tinggi karena dapat menyebabkan pemisahan yang tidak baik. Pengemasan kolom dilakukan dengan cara basah. Kolom harus dipastikan benar-benar mampat dan tidak ada udara yang terperangkap di dalamnya karena dapat menyebabkan kolom tidak homogen sehingga menghasilkan pemisahan yang tidak baik.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 sebanyak 70 g dan sebagai fase gerak digunakan gradien kombinasi pelarut mulai dari nonpolar sampai ke polar yaitu *n*-heksan 100% hingga etil asetat 100 % serta etil asetat 100 % hingga metanol 100% dengan gradien pelarut 5%. Setiap eluat ditampung dalam botol 100 ml dan diuapkan dengan penguap putar. Setiap fraksi dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan digabung berdasarkan kesamaan pola kromatogram pada KLT sehingga diperoleh 34 fraksi gabungan. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Aktivitas antioksidan dan toksisitas fraksi gabungan diuji. Pengujian tidak dilakukan terhadap seluruh fraksi gabungan melainkan berdasarkan bobot ekstrak terbanyak. Sebagai pendahuluan aktivitas antioksidan diuji secara kualitatif menggunakan KLT. Masing-masing fraksi dibuat dalam konsentrasi 50 dan 200 µg/mL kemudian ditotolkan pada lempeng KLT (Gambar 4.8). Selanjutnya bercak disemprot dengan pereaksi DPPH. Bercak yang menunjukkan aktivitas antioksidan yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning dengan latar belakang ungu di uji secara kuantitatif. Hasil uji selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Berdasarkan hasil pengujian maka dilakukan isolasi terhadap fraksi teraktif yakni FG 29 (1 g) dengan nilai IC_{50} 35,1910 µg/mL dan LC_{50} 70,9741 µg/mL. Pemurnian dilakukan kembali dengan kromatografi kolom konvensional. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 (0,063 – 0,200 mm) sebanyak 94,7 g dan sebagai fase gerak kembali digunakan kombinasi pelarut mulai dari nonpolar sampai ke polar (*n*-heksan : etil asetat - etil asetat : metanol) dengan gradien 5%. Dari fraksi *n*-heksan : etil asetat = 95 : 5 didapatkan isolat murni sebanyak 4,4 mg. Untuk menguji kemurnian dilakukan KLT 2 dimensi menggunakan eluen *n*-heksan : etilasetat = 9,5:0,5 dan *n*-heksan : kloroform 9:1 dengan nilai $R_f = 0,575$. Bercak dapat dilihat dibawah sinar uv pada panjang gelombang 254 nm sedangkan pada panjang gelombang 366 nm tidak tampak. Setelah disemprot menggunakan pereaksi H₂SO₄ 10% dalam metanol dengan pemanasan pada suhu 100⁰C selama 10 menit tidak terbentuk warna apapun.

4.8 Penentuan Struktur Senyawa Murni

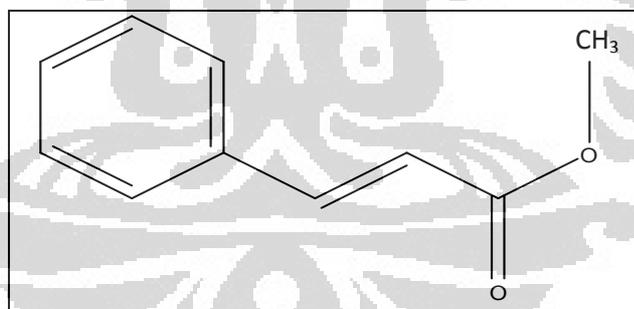
Isolat murni selanjutnya disebut sebagai senyawa LC didapatkan pada fraksi *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan 95 : 5 pada kolom kromatografi konvensional dari FG 29. Secara organoleptis senyawa terlihat sebagai cairan putih. Pertama dilakukan penentuan spektrum ultraviolet dan sinar tampak yang dilakukan pada panjang gelombang 200-800 nm. Pita absorbansi menunjukkan puncak pada panjang gelombang 215 nm dengan absorbansi 0,458 serta pada panjang gelombang 274 nm dengan absorbansi 0,672. Spektrum serapan dapat dilihat pada Gambar 4.9. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa LC memiliki gugus kromofor (gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan sinar tampak jika diikat oleh senyawa yang bukan pengabsorpsi/auksokrom) karena memberikan serapan pada daerah ultraviolet. Hampir semua kromofor mempunyai ikatan rangkap berkonjugasi seperti benzena, diena dan dienon (Harmita, 2006).

Setelah itu dilakukan pengukuran Resonansi Magnetik Inti senyawa LC dengan menggunakan pelarut CDCl_3 . Spektrum proton ($^1\text{HRMI}$) senyawa LC dapat dilihat pada Lampiran 9. Berdasarkan spektrum tersebut diketahui senyawa LC memiliki jumlah atom H sebanyak 10 buah. Pergeseran kimia pada daerah 0,0062-1,5588 ppm diabaikan karena dianggap sebagai pengotor yaitu asam lemak. Analisis spektrum proton menunjukkan bahwa senyawa LC memiliki gugus metoksi ($\text{CH}_3\text{-O-}$) yang ditunjukkan oleh pergeseran kimia pada 3,8119 ppm (s, 3H) dimana untuk gugus metoksi memiliki rentang pergeseran kimia 3-4 ppm. Selain itu senyawa LC juga memiliki gugus aromatik yang ditunjukkan oleh pergeseran kimia pada 7,3841 (s, 1H); 7,3893 (s, 1H) dan 7,3944 ppm (s, 1H) serta 7,5203; 7,5242; 7,5293 dan 7,5319 ppm (dd, 2H) yang menunjukkan total atom H adalah 5 buah dimana untuk gugus aromatik memiliki rentang pergeseran kimia 6,5-8,5 ppm. Pergeseran kimia pada 6,4307 dan 6,4631 ppm menunjukkan adanya gugus alkena (-C=C-) dimana untuk gugus alkena memiliki rentang pergeseran kimia 4,5-6,5 ppm. Selain itu terdapat pergeseran kimia pada 7,6850 dan 7,7161 ppm (d, 1H). Pergeseran kimia pelarut muncul dengan intensitas yang tinggi diduga karena terjadi transfer antara proton dengan deuterium pada CDCl_3 dan terbentuk CHCl_3 pada spektrum $^1\text{HRMI}$ yang seharusnya tidak nampak

Universitas Indonesia

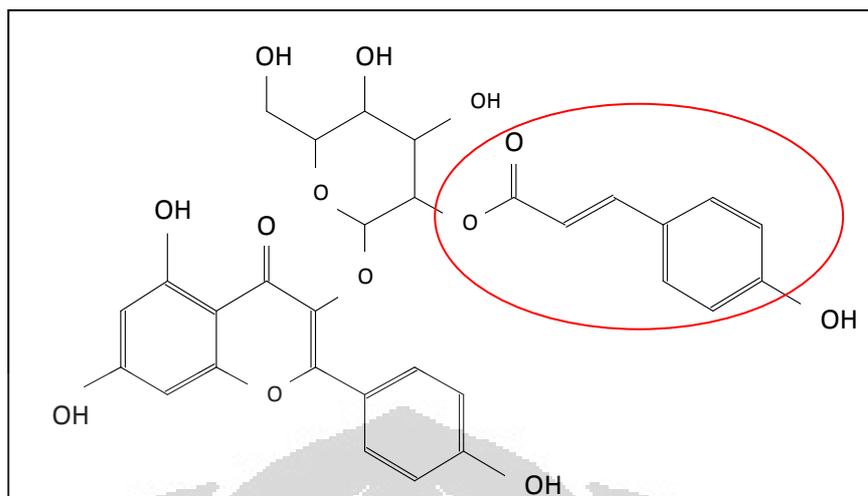
karena telah dilakukan penetapan *baseline* pelarut (Silverstein, Webster & Kiemle, 2005).

Spektrum karbon ($^{13}\text{CRMI}$) senyawa LC dapat dilihat pada Lampiran 10. Berdasarkan spektrum tersebut diketahui senyawa LC memiliki jumlah atom C sebanyak 10 buah yang ditunjukkan oleh pergeseran kimia pada 51,9078 ppm untuk gugus metoksi (50-60 ppm); 117,9989 dan 145,0782 ppm untuk gugus alkena (105-145 ppm); 128,2621, 129,0920 dan 130,4941 ppm untuk gugus aromatik (120-130 ppm); serta 167,6459 ppm untuk gugus ester (160-175 ppm). Pergeseran kimia pada 134,5861 ppm dan 167,6459 ppm menunjukkan C kuartener pada gugus aromatik yang tersubstitusi dan pada gugus ester (Silverstein, Webster & Kiemle, 2005). Data pergeseran kimia spektrum proton dan karbon selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.10. Selanjutnya pergeseran kimia proton dan karbon senyawa LC dibandingkan dengan pergeseran kimia senyawa Metil Sinamat yang dapat dilihat selengkapnya pada Tabel 4.11. (Data LIPI). Berdasarkan data RMI dicoba untuk melakukan dugaan struktur kimia dari senyawa LC dengan menggunakan program komputer *Chem. Office* didapatkan senyawa dengan rumus bangun sebagai berikut:



Gambar 4.10. Dugaan struktur kimia senyawa LC yaitu metil sinamat

Dari rumus senyawa di atas dapat disimpulkan rumus senyawa LC adalah $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$. Berdasarkan penelusuran literatur, ternyata memang terdapat senyawa yang memiliki gugus sinamoil pada senyawa 2''-O-(4-hidroksi-E-sinamoil) yang diisolasi dari daun *Quercus suber* yang masih satu suku dengan *Lithocarpus* yakni Fagaceae dan juga dari *Lithocarpus polystachya* yang masih satu marga.



[Sumber : Dembinska-Migas, et al., 1973)

Keterangan : gugus sinamoil dilingkari dengan warna merah

Gambar 4.11. Rumus Struktur 2''-O-(4-hidroxy-E-sinamoil)

4.9 Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Murni

Senyawa LC pada uji aktivitas antioksidan menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 431,9008 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.6) dan pada uji toksisitas menunjukkan nilai LC_{50} 27,3587 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.7). Senyawa LC tidak aktif sebagai antioksidan dimana suatu senyawa dinyatakan aktif apabila memiliki nilai $IC_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$. Hal ini dikarenakan untuk dapat meredam radikal bebas DPPH, dibutuhkan gugus pendonor proton dimana berdasarkan dugaan rumus strukturnya, senyawa LC tidak memiliki gugus tersebut (Molyneux, 2004). Untuk uji aktivitas toksisitas, senyawa LC bersifat sangat toksik karena memiliki nilai $LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (Meyer et al., 1982).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan data penelitian yang telah diperoleh, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- a. Fraksi teraktif hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dari daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder adalah fraksi *n*-butanol dengan nilai IC_{50} 23,8062 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan fraksi teraktif hasil uji toksisitas dengan metode BSLT adalah fraksi etil asetat dengan nilai LC_{50} 79,5480 $\mu\text{g/mL}$.
- b. Hasil identifikasi golongan senyawa diketahui fraksi etil asetat dari daun *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder mengandung golongan senyawa terpenoid, flavonoid, tanin, gula dan saponin sedangkan fraksi *n*-butanol mengandung terpenoid sebagai glikosida, flavonoid dan saponin.
- c. Hasil pemisahan 15 g fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom vakum yang dilanjutkan dengan pemisahan 1 g fraksi gabungan 29 hasil kromatografi kolom vakum menggunakan kromatografi kolom konvensional diperoleh 4 mg senyawa murni LC dari fraksi *n*-heksan : etil asetat (95 : 5).
- d. Senyawa LC memiliki puncak absorpsi pada panjang gelombang 215 dan 274 nm pada spektrum ultraviolet dan cahaya tampak. Berdasarkan spektrum resonansi magnetik inti (^1H RMN dan ^{13}C RMN), senyawa LC diduga metil sinamat dengan rumus molekul $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$.
- e. Senyawa LC sangat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 24,7928 $\mu\text{g/mL}$ dan tidak aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 431,9008 $\mu\text{g/mL}$.

5.2. Saran

Perlu dilakukan isolasi terhadap fraksi butanol sebagai fraksi teraktif antioksidan agar diperoleh senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, isolasi terhadap fraksi gabungan lain dari fraksi etil asetat agar diperoleh senyawa baru yang memiliki aktivitas toksisitas dan melakukan uji aktivitas biologi yang lain mengingat masih sedikit data tentang tanaman *Lithocarpus celebicus* (Miq.) Rehder.

DAFTAR ACUAN

- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–100.
- Belleville-Nabet. (1996). Zat gizi antioksidan penangkap senyawa radikal pangan dalam sistem biologis. dalam H. Winarsi. *Antioksidan alami dan radikal bebas: potensi dan aplikasinya dalam kesehatan* (79). Yogyakarta: Kanisius.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. -Wiss. Technol* 28, 25–30.
- Chen Zhen-Hua, Zhang Ru-Jun, Wu Jian & Zhao Wei-Min. (2009). New dihydrochalcone glycosides from *Lithocarpus litseifolius* and the phenomenon of C–H→C–D exchange observed in NMR spectra of phenolic components. *Journal of Asian Natural Products Research* 11 (6), 508–513.
- Dembinska-Migas, W. et al. (1973). *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 25, 599-606.
- Demple, B., & L. Harrison. (1994). Annual Review Biochemistry. dalam H. Winarsi. *Antioksidan alami dan radikal bebas: potensi dan aplikasinya dalam kesehatan* (81). Yogyakarta: Kanisius.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1979). *Farmakope Indonesia Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 772-773.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 333-337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 3-11.
- Dong Hua-Qiang, Li Mei, Zhu Feng, Liu Fu-Lai, Huang Jian-Bo. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd. against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes. *Food Chemistry* 130, 261–266.
- Gandjar, I.G., & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 221-369.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.C. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* 18, 125–6.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokimia. Ed II.*, Diterjemahkan Oleh Kosasi Patmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung : ITB, 70-71, 102, 109, 123, 135, 155, 234-235.

- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 17-18.
- Harmita & Radji, M. (2008). *Buku Ajar Analisis Hayati*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, 88-90.
- Horgen, F.D., et al. (2001). Biological screening of rain forest plot trees from Palawan Island (Philippines). *Phytomedicine* 8 (1), 71–81.
- Hou Shao-zhen et al. (2011). The hypoglycemic activity of *Lithocarpus polystachyus* Rehd. leaves in the experimental hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 138, 142–149.
- Hui Wai-Haan & Li Man-Moon. (1975). Acidic Triterpenoids from *Lithocarpus Attenuata*. *Phytochemistry* 14, 785-787.
- Hui Wai-Haan & Li Man-Moon. (1976). Acidic Triterpenoids from Nine *Lithocarpus* Species Of Hong Kong. *Phytochemistry* 15, 336-337.
- Hui Wai-Haan, Li Man-Moon & Lee Yuk-Chun. (1975). Structure of Lithocarpic Lactone, a New Triterpenoid from Two *Lithocarpus* Species of Hong Kong. *J.C.S. Perkin I*, 617-619.
- Jones, S. B., & Luchsinger, A. E. (1987). *Plant systematic* (2nd ed.). Singapore: McGraw-Hill, 321-322.
- Joon-Kwan Moon dan Takayuki Shibamoto. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655–1666.
- Kanwar, A.S. (2007). Brine shrimp (*Artemia salina*) - A marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2 (4), 236-240.
- Khan, M.R., Kihara, M., & Omoloso A.D. (2001). Antimicrobial activity of *Lithocarpus celebicus*. *Fitoterapia* 6, 703-705.
- Keusch, P. (2003). “Test for Sugars with Molisch Test”. Diakses 29 Juni 2012. Pukul 22.57 WIB.
http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/p30_Z_mol-e.htm
- Kosela, S. (2010). *Cara mudah dan sederhana penentuan struktur molekul berdasarkan spektra data (NMR, Mass, IR, UV)*. Jakarta: Lembaga Penerbit FE UI, 1, 202.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food And Bioproducts Processing* 89, 217–233.

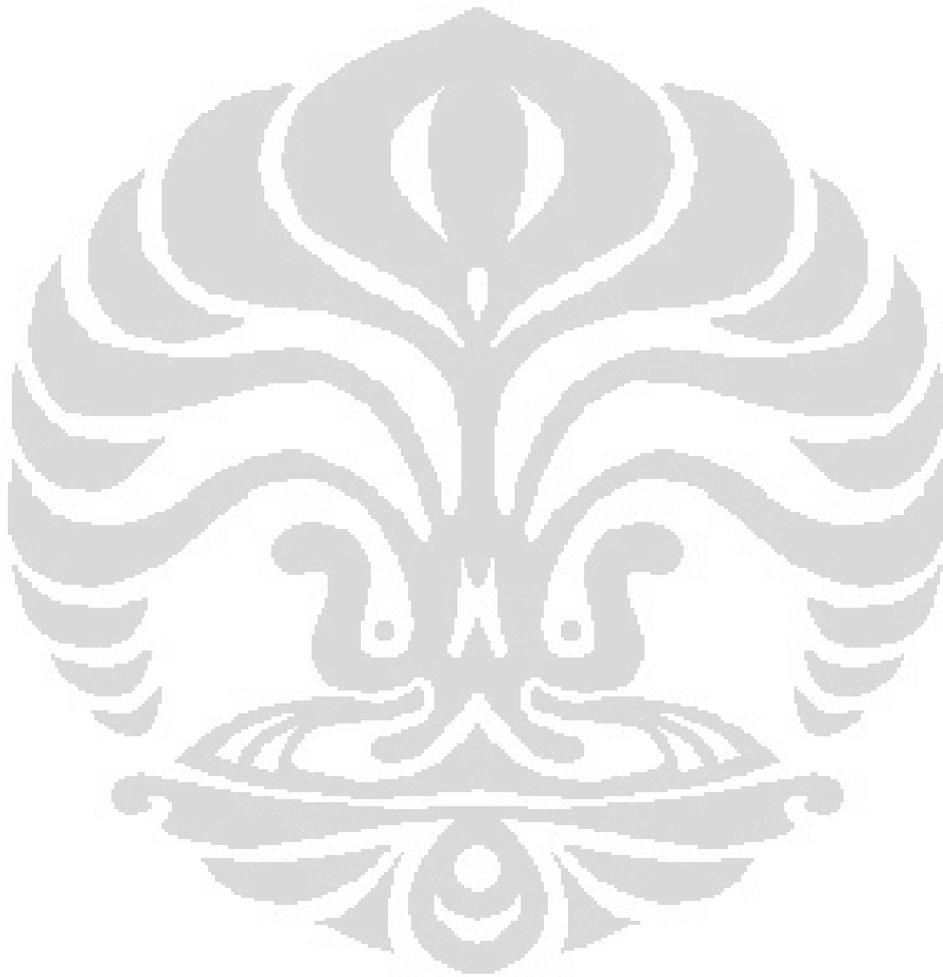
- Lampe, J.W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanisms of action in human experimental studies. dalam H. Winarsi. *Antioksidan alami dan radikal bebas: potensi dan aplikasinya dalam kesehatan* (80). Yogyakarta: Kanisius.
- Lemmens, R.H.M.J., Soerianegara, I., & Wong, W.C. (Ed.). (1995). *Plant Resources of South East Asia. Timber trees: Minor commercial timbers*. Jilid 5(2). Bogor: Prosea Foundation, 284-290.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613, 1–19.
- Mansur, M. (2003). Analisis vegetasi hutan di desa Salua dan Kaduwaa Taman Nasional Lore Lindu, Sulawesi Tengah. *J.Tek.Ling., P3TL-BPPT*. 4 (1), 1 – 7.
- Martin, J.W., & Davis, G.E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles County. Sci. Ser.* 39, 1-124.
- Meng Qiong, Qian Zhengming, Li Xiaoxiang, Li Deqiang, Huang Weihua & Zhao Jing. (2012). Free radical scavenging activity of Eagle tea and their flavonoids. *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2), 246–249.
- Mesiana, Y. (2010). *Uji toksisitas dan aktivitas antioksidan ekstrak hasil fermentasi isolat kapang endofit dari akar dan ranting tanaman Garcinia forbesii* King. Departemen Farmasi FMIPA UI : Depok, 29-30.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen L.B., Nichols, D.E., & McLaughlin, J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45(5), 31-34.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Pe´rez-Jime´nez, J., et al. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International* 41, 274–285.
- Persoone, G., & Wells, P.G. (1987). Artemia in aquatic toxicology: a review. dalam *Artemia Research and its Applications. Morphology, Genetics, Strain characterization Toxicology* (Sorgeloos P Ed.) Belgium : Universita Press, 1259-1275.
- Pusat Promosi Kesehatan DepKes RI. (2009). *Majalah Informasi dan Referensi* (ed. 4).

- Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI. (2002). *Flora Sulawesi: Unik, endemik dan langka*. Bogor: Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 65.
- Qin Xiang-Dong & Liu Ji-Kai. (2003). A new sweet dihydrochalcone-glucoside from leaves of *Lithocarpus pachyphyllus* (Kurz) Rehd. (Fagaceae). *Z. Naturforsch* 58c, 759-761.
- Rahayu, M., & Rugayah. (2007). Pengetahuan tradisional dan pemanfaatan tumbuhan oleh masyarakat lokal pulau Wawonii Sulawesi Tenggara. *Berita Biologi* 8 (6), 489-499.
- Rao, L. J. M., Ramalakshmi, K., Borse, B.B., & Raghavan, B. (2005). Antioxidant and radical-scavenging carbazole alkaloids from the oleoresin of curry leaf (*Murraya koenigii* Spreng.). *Food Chemistry* (100), 742–747.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung : ITB, 157.
- Salganik, R.I. (2001). The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American College of Nutrition* (20), 464S–472S.
- Samuelsson, G. (1999). *Drugs of origin natural: A text book of pharmacognosy*. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press, 46-49.
- Sarker, D., Latif, Z., Gray, I., Alexander. Ed. (2006). *Natural Product Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y.S.R., & De, B. (2010). Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3, 91-100.
- Silverstein, R.M., Webster F.X., & Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds* (7th ed.). New York: John Wiley & Sons, 127-229.
- Tiwari A.K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human disease: multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science* 81 (9), 1179-1187.
- Trease, G.E., & Evans, W.C. (1978). *Pharmacognosy* (11th ed.). London: Bailliere Tindall, 62-66.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., & Kowalska, T. (2008). *Thin layer chromatography for phytochemistry*. USA: CRC Press, 103-129.

Winarsi, H. (2007). *Antioksidan alami dan radikal bebas: potensi dan aplikasinya dalam kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius, 18, 77-81.

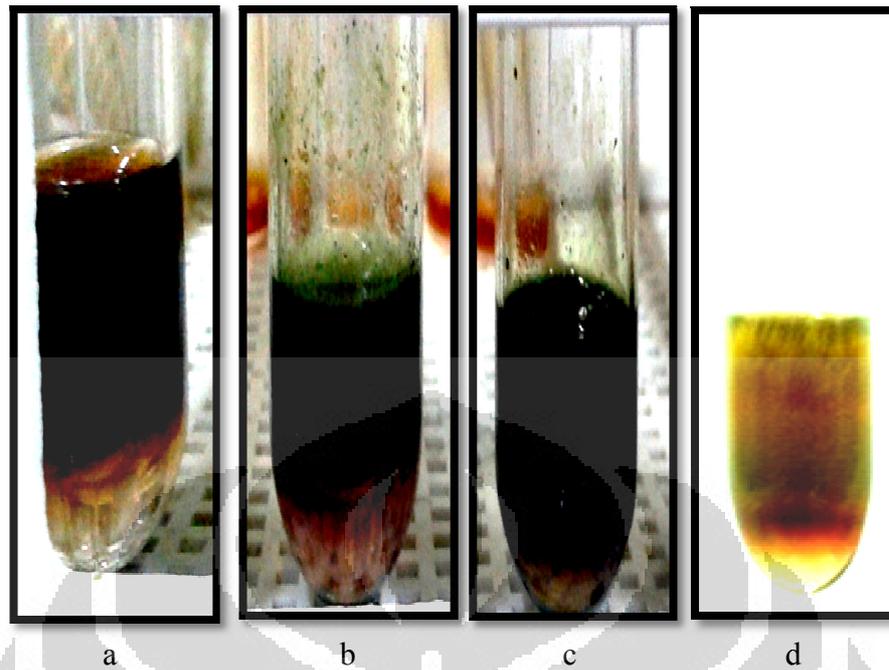
Wu, D., & Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health* 27(4), 277-284.

Zhou Hai-Chao, Lin Yi-Ming, Wei Shu-Dong, Tam Nora Fung-ye. (2011). Structural diversity and antioxidant activity of condensed tannins fractionated from mangosteen pericarp. *Food Chemistry* (129), 1710-1720.



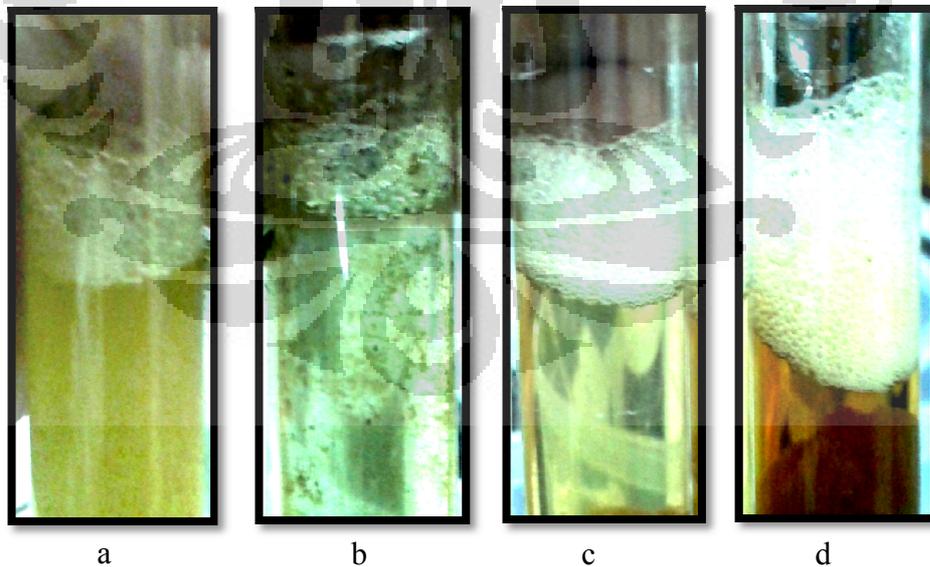


GAMBAR



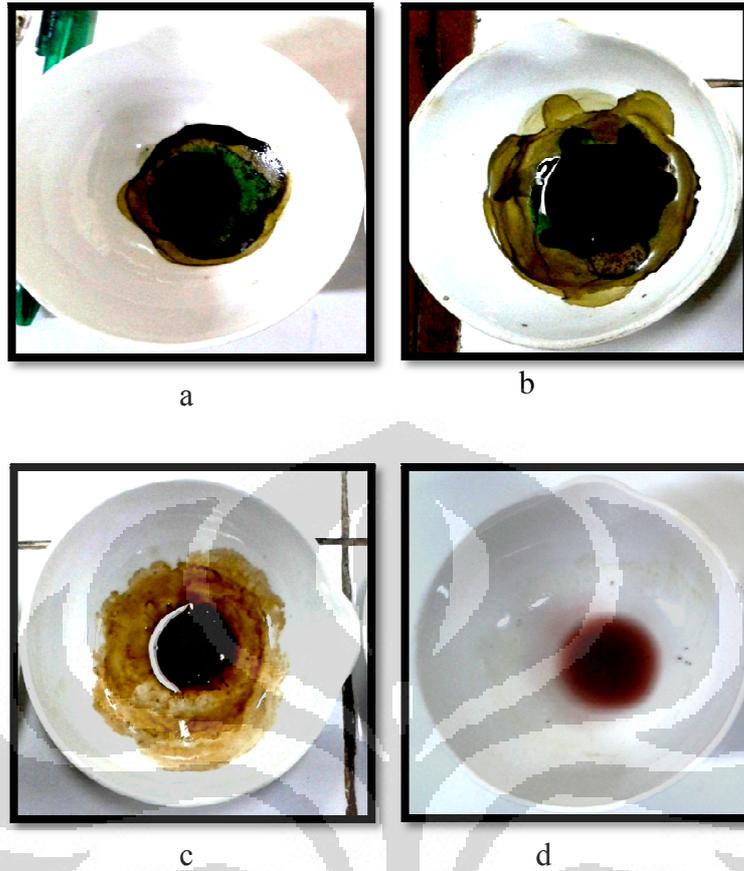
Keterangan: a. Ekstrak metanol, b. Fraksi etilasetat, c. Fraksi butanol, d. Nerii folium (standar)

Gambar 4.2. Identifikasi gugus gula dengan pereaksi Mollisch



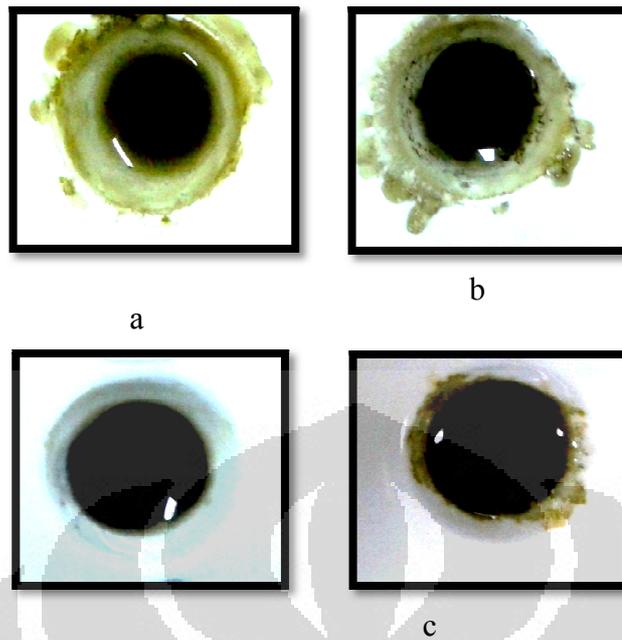
Keterangan: a. Ekstrak metanol, b. Fraksi etilasetat, c. Fraksi butanol, d. Liquiritae radix (standar)

Gambar 4.3. Identifikasi saponin dengan pengocokan menggunakan air panas serta penambahan HCl 2N



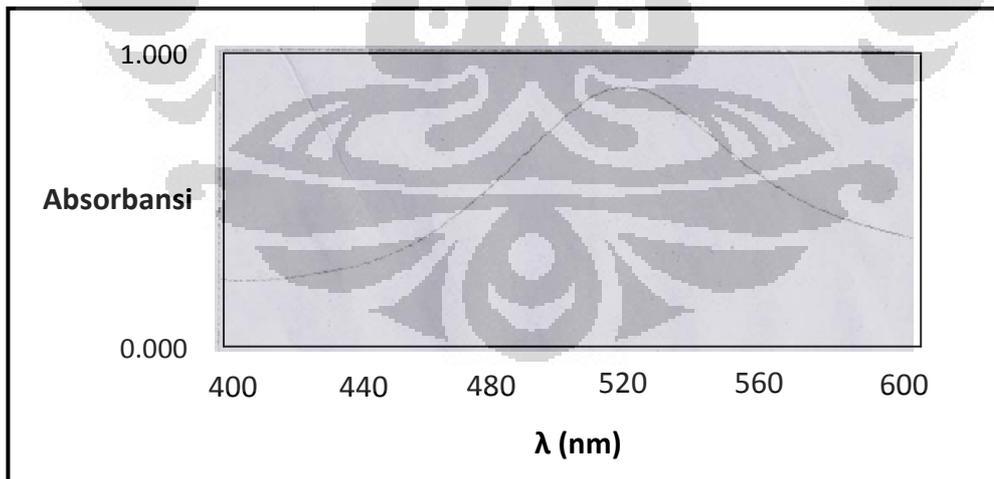
Keterangan : a. Ekstrak metanol, b. Fraksi etil asetat, c. Fraksi butanol, c. Caryophily flos (standar)

Gambar 4.4. Identifikasi terpen dengan pereaksi Liebermann-Bouchard



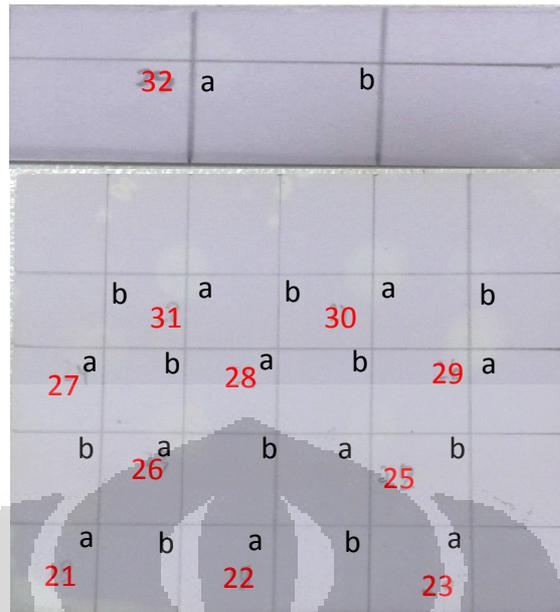
Keterangan : a. Ekstrak metanol, b. Fraksi etil asetat, c. *Camelia folium* (standar)

Gambar 4.5. Identifikasi tanin dengan pereaksi FeCl_3



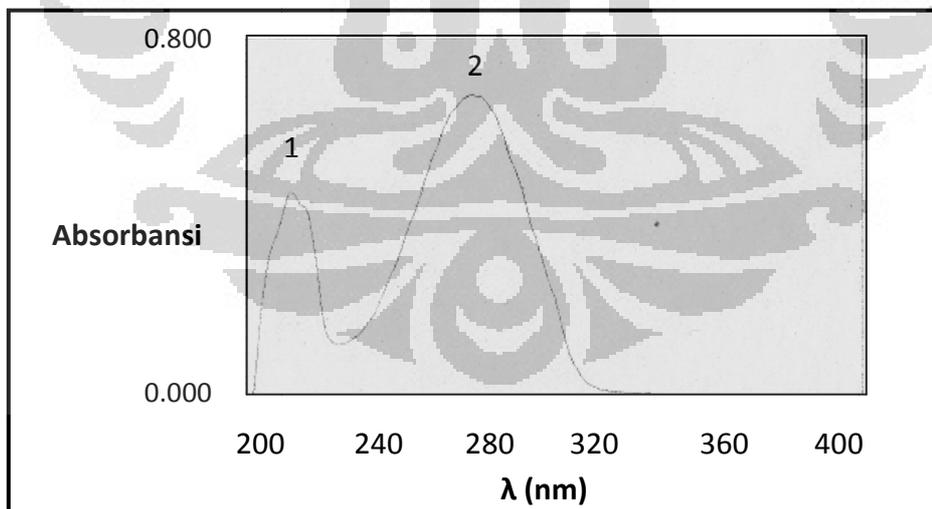
Keterangan : Puncak (515 nm; 0,673)

Gambar 4.7. Spektrum optimasi panjang gelombang DPPH



[Keterangan: 21-32 = Fraksi gabungan; a = 50 $\mu\text{g/ml}$; b = 200 $\mu\text{g/ml}$; bercak kuning = aktif antioksidan]

Gambar 4.8. Uji kualitatif aktivitas antioksidan fraksi gabungan dengan pereaksi semprot DPPH



Keterangan : Puncak 1= (215 nm, 0,458), Puncak 2 = (274 nm; 0,672)

Gambar 4.9. Spektrum uv-vis senyawa LC



Tabel 4.1. Berat dan Rendemen Ekstrak Metanol

Nama Simplisia	Berat Simplisia (g)	Berat Ekstrak Kering (g)	Rendemen (%)
Daun <i>Lithocarpus celebicus</i> (Miq.) Rehder	1500	108,2525	7,2168

Tabel 4.2. Berat Fraksi dan Rendemen Hasil Partisi

Fraksi	Berat Ekstrak Metanol (g)	Berat Fraksi (g)	Rendemen (%)
n-heksan	50,4	20,4932	40,6611
etil asetat		18,6622	37,0282
Butanol		4,6379	9,2022
Metanol		6,0407	11,9855

Tabel 4.3. Hasil Identifikasi Golongan Senyawa

Golongan Senyawa	Standar	Ekstrak Metanol	Fraksi Etil Asetat	Fraksi butanol
Alkaloid	Chinae cortex	-	-	-
Flavonoid	Ortosiphon folium	+	+	+
Terpen	Caryophili flos	+	+	+
Tanin	Camelia folium	+	+	+
Saponin	Liquiritae radix	+	+	+
Glikosida	Nerii folium	+	+	+
Antrakuinon	Rhei radix	-	-	-

Keterangan : (+) : Terdeteksi
 (-) : Tidak terdeteksi

Tabel 4.4 Data Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Hasil Fraksinasi

Sampel	Absorbansi Blanko	Sampel		% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (µg/mL)
		Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			
Quersetin	0,71	2	0,468	34,0845	y =	3,7496
		4	0,345	51,4084	8,953x +	
		5	0,257	63,8028	16,43	
		6	0,222	68,7323	R ² =	
		7	0,149	79,0141	0,992	
Asam askorbat	0,71	5	0,532	25,0704	y =	9,6065
		7,5	0,423	40,4225	5,07x +	
		10	0,335	52,8169	1,295	
		12,5	0,241	66,0563	R ² =	
		15	0,173	75,6338	0,994	
Ekstrak metanol	0,725	50	0,403	44,4138	y =	57,4684
		60	0,346	52,2759	0,553x +	
		70	0,301	58,4828	18,22	
		80	0,271	62,6207	R ² =	
		90	0,240	66,8966	0,979	
Fraksi n- heksan	0,725	50	0,596	17,7931	y =	159,2281
		60	0,559	22,8965	0,285x	
		70	0,544	24,9655	+ 4,620	
		80	0,524	27,7241	R ² =	
		90	0,510	29,6552	0,962	

Tabel 4.4 (Lanjutan) Data Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Hasil Fraksinasi

Sampel	Absorbansi Blanko	Sampel		% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (µg/mL)
		Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi			
Fraksi etil asetat	0,710	10	0,561	20,9859	y =	48,2503
		20	0,543	23,5211	0,823x +	
		30	0,468	34,0845	10,29	
		40	0,390	45,0704	R ² =	
		50	0,345	51,4084	0,970	
Fraksi butanol	0,725	25	0,34	53,1034	y =	23,8062
		27,5	0,316	56,4138	1,682x +	
		30	0,3	58,6207	9,958	
		32,5	0,265	63,4483	R ² =	
		35	0,213	70,6207	0,951	
Fraksi metanol	0,725	25	0,392	45,9310	y = 1,76x	27,0773
		27,5	0,356	50,8965	+ 2,344	
		30	0,318	56,1379	R ² =	
		32,5	0,299	58,7586	0,990	
		35	0,261	64		

Tabel 4.5 Data Uji Toksisitas Ekstrak dan Hasil Fraksinasi

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Mortalitas	Persamaan linier	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak metanol	10	6,5934		669,4189
	100	20,7792	$y = 26,85x -$	
	500	32,7869	25,87	
	1000	70	$R^2 = 0,770$	
Fraksi n- heksan	10	8,9552		125,7332
	100	45,5882	$y = 38,21x -$	
	500	68,5714	30,22	
	1000	88,4615	$R^2 = 0,989$	
Fraksi etil asetat	10	13,4615	$y = 41,36x -$	79,5480
	100	52,1739	28,61	
	500	84,7457	$R^2 = 0,998$	
	1000	95		
Fraksi butanol	10	13,924	$y = 30,61x -$	223,3089
	100	30,9859	21,90	
	500	53,846	$R^2 = 0,900$	
	1000	80		
Fraksi metanol	10	10,1124	$y = 25,87x -$	523,5763
	100	23,3766	20,34	
	500	45,7143	$R^2 = 0,912$	
	1000	64,5161		

Tabel 4.6. Hasil Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Vakum

Fraksi Gabungan	Bobot (gram)	Fraksi Gabungan	Bobot (gram)
1	0,0037	18	0,0321
2	0,0453	19	0,3762
3	0,1433	20	0,4715
4	0,0404	21	0,7327
5	0,0495	22	1,0108
6	0,0477	23	1,92
7	0,0072	24	0,454
8	0,0476	25	1,2554
9	0,0446	26	1,2591
10	0,0206	27	0,7156
11	0,0188	28	1,2748
12	0,3927	29	2,2497
13	0,0395	30	1,4343
14	0,0152	31	1,2662
15	0,0326	32	1,3041
16	0,1437	33	0,3931
17	0,6574	34	0,1761

Tabel 4.7. Data Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Fraksi Gabungan

Fraksi Gabungan (FG)	Berat (gram)	IC ₅₀ (µg/mL)	LC ₅₀ (µg/mL)
26	1,2591	49,2505	191,4697
27	0,7156	59,5365	182,7258
28	1,2748 g	103,2123	158,4893
29	2,2497	35,1910	70,9741

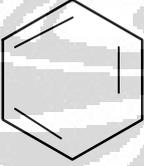
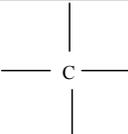
Tabel 4.8. Data Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Murni

Sampel	Absorbansi Blanko	Absorbansi Konsentrasi (µg/mL)	% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ (µg/mL)	
Quersetin	0,71	2	0,468	34,0845	y = 8,953x + 16,43 R ² = 0,992	3,7496
		4	0,345	51,4084		
		5	0,257	63,8028		
		6	0,222	68,7323		
		7	0,149	79,0141		
Asam askorbat	0,71	5	0,532	25,0704	y = 5,07x + 1,295 R ² = 0,994	9,6065
		7,5	0,423	40,4225		
		10	0,335	52,8169		
		12,5	0,241	66,0563		
		15	0,173	75,6338		
Senyawa LC	0,71	50	0,684	3,6620	y = 0,121x - 2,26 R ² = 0,916	431,9008
		60	0,673	5,2113		
		70	0,664	6,4789		
		90	0,653	8,0282		
		100	0,637	10,2817		

Tabel 4.9. Data Uji Toksisitas Senyawa LC

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Mortalitas	Persamaan linier	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Senyawa LC	5	36,3636	$y = 38,73x -$	24,7928
	10	92,8571		
	50	100	2,803	
	100	100	$R^2 = 0,901$	

Tabel 4.10 Data Pergeseran Kimia Spektrum Proton dan Karbon Senyawa LC

No.	Gugus Fungsi	δ_c (ppm) ¹³ CRMI	δ_h (ppm) ¹ HRMI
1.	CH ₃ -O-	51,9078	3,8119
2.	(-C=C-)	117,9989	6,4307
		145,0782	6,4631
			7,7680
			7,7161
3.		128,2621	7,3841
		129,0920	7,3893
		130,4941	7,3944
			7,5203
			7,5242
			7,5293
			7,5319
4.		134,5861	
		167,6459	

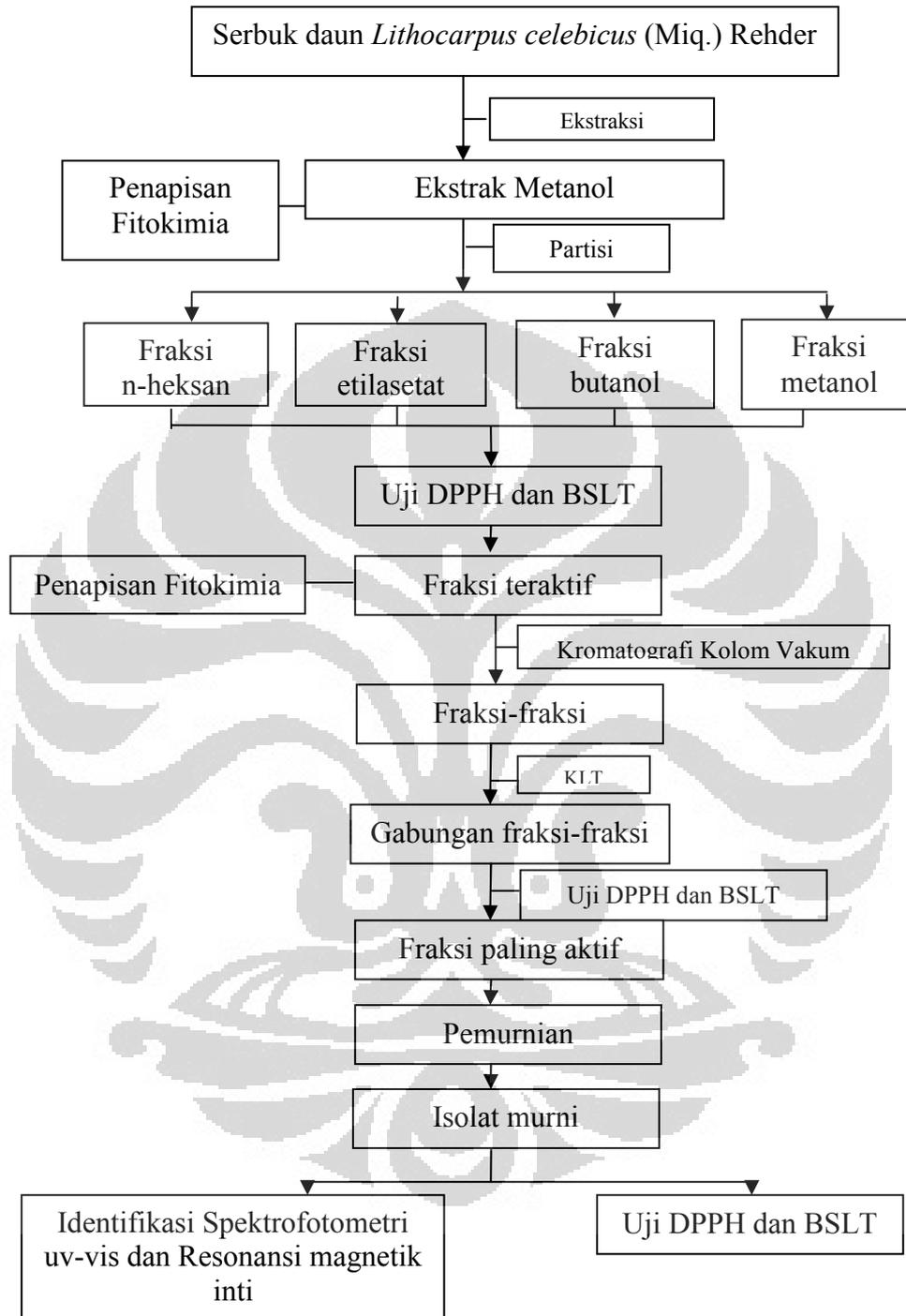
Tabel 4.11 Perbandingan pergeseran kimia proton dan karbon Senyawa LC terhadap Metil Sinamat (diukur pada 500 mHz $^1\text{HRMI}$ dan 125,76 $^{13}\text{CRMI}$ dengan pelarut CDCl_3)

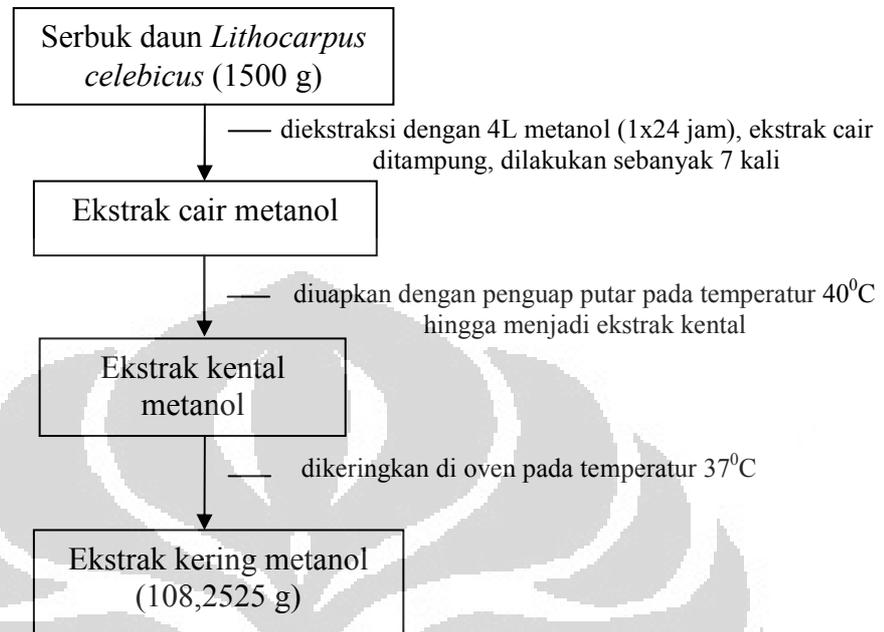
$^1\text{HRMI}$			$^{13}\text{CRMI}$		
No.	Senyawa LC	δh (ppm)	No.	Senyawa LC	δC (ppm)
	Metil Sinamat	δh (ppm)		Metil Sinamat	δC (ppm)
1.		3,8119	1.		51,9078
		3,8206			51,9220
2.		6,4307	2.		117,9989
		6,4307			117,9463
		6,4631	3.		128,2621
		6,4631			128,2572
3.		7,3841	4.		129,0920
		7,3828			129,0775
		7,3893	5.		130,4941
		7,3844			130,4892
		7,3944	6.		134,5861
		7,3944			134,5334
4.		7,5203	7.		145,0782
		7,5242			145,0733
		7,5293	8.		167,6459
		7,5229			167,6410
		7,5319			
		7,5316			
5.		7,6580			
		7,6837			
		7,7161			

The image features a large, faint watermark of the logo of Universitas Indonesia (UI) in the background. The logo is a stylized, symmetrical emblem with a central vertical axis, resembling a traditional Indonesian motif. Overlaid on this watermark is the word "LAMPIRAN" in a bold, black, serif font, centered horizontally.

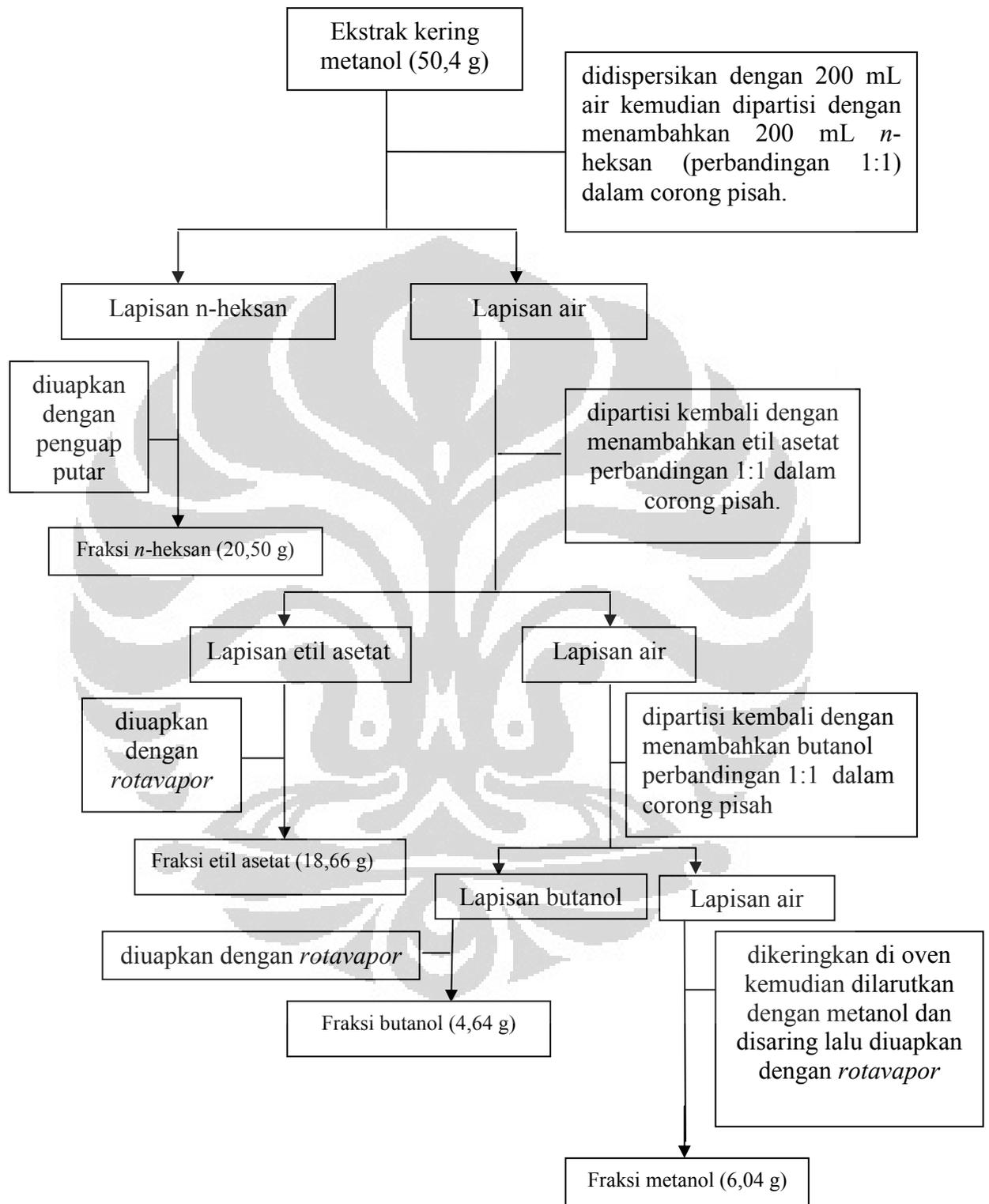
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

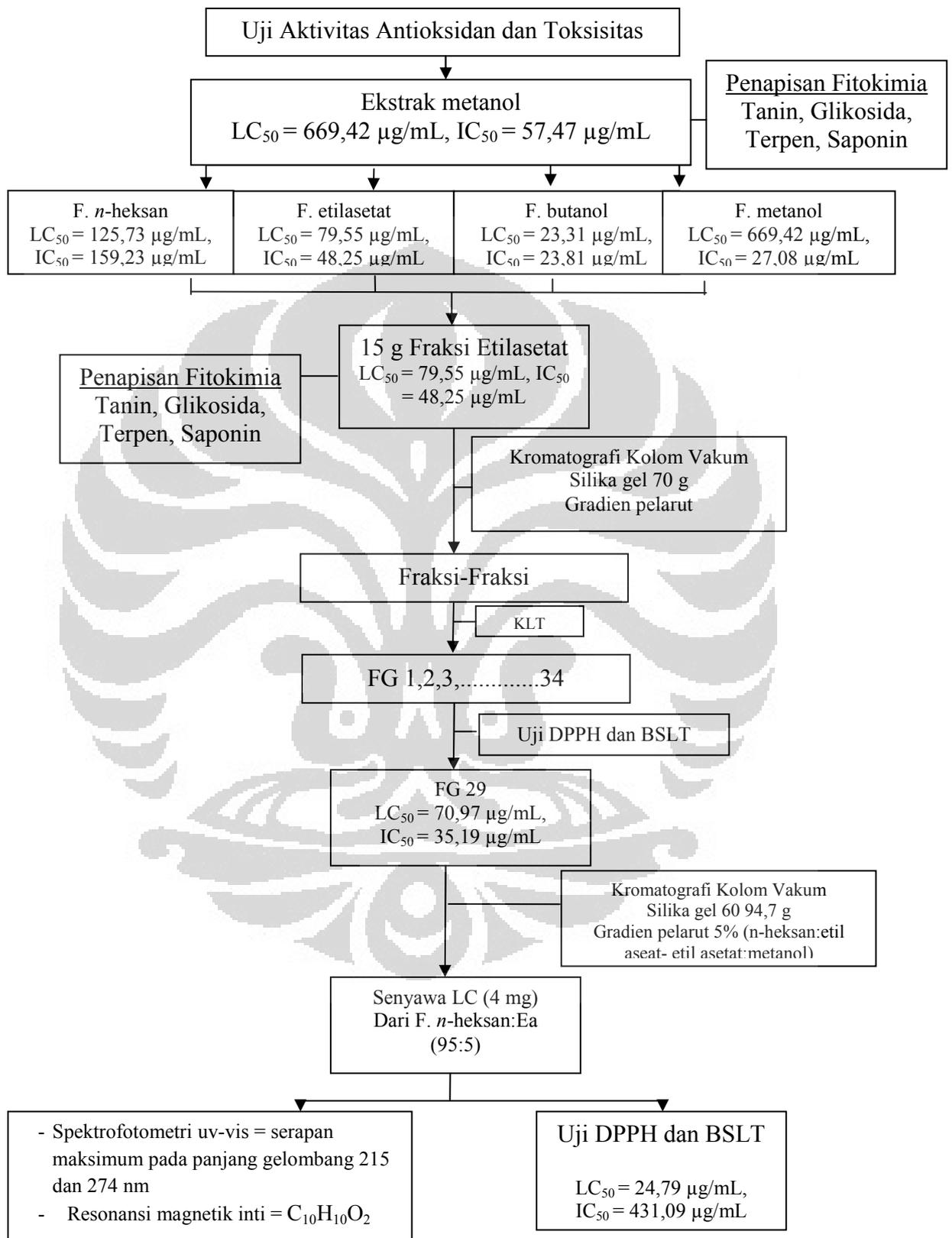


Lampiran 2. Skema Ekstraksi

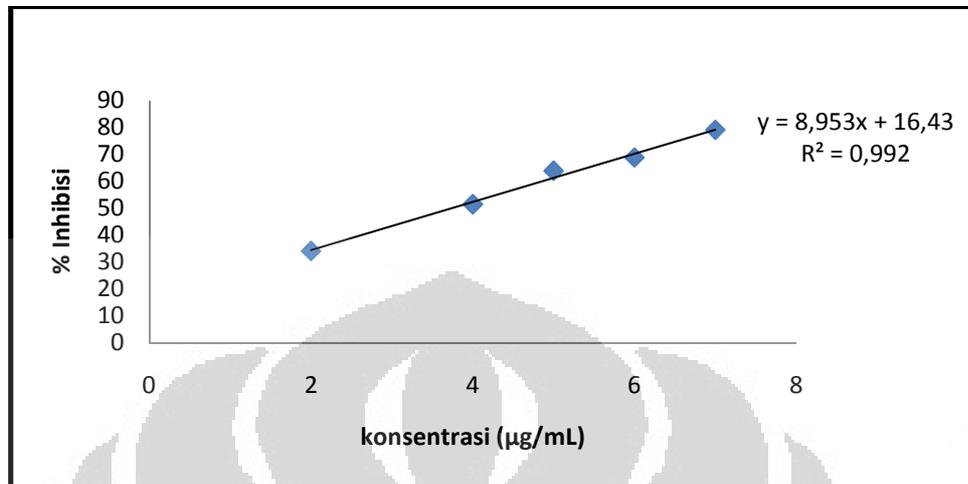
Lampiran 3. Skema Fraksinasi



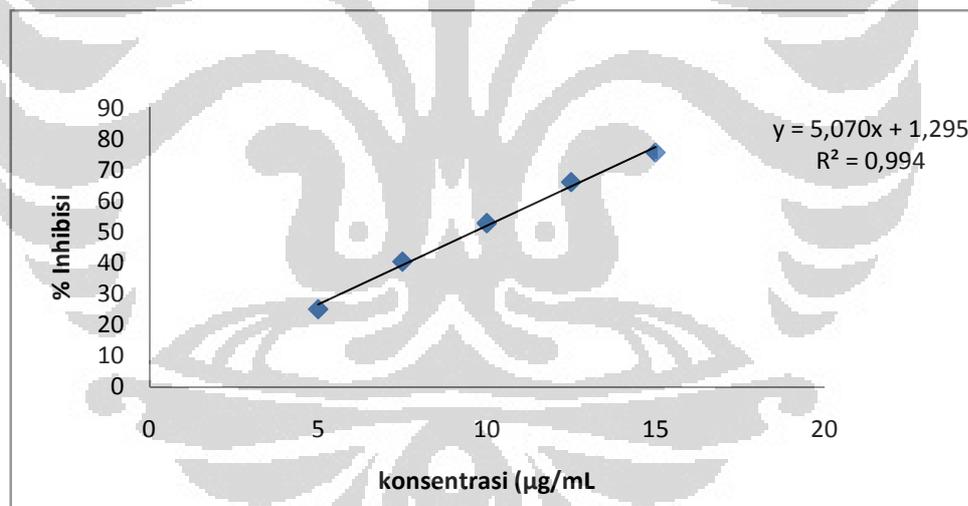
Lampiran 4. Skema Isolasi Senyawa



Lampiran 5. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

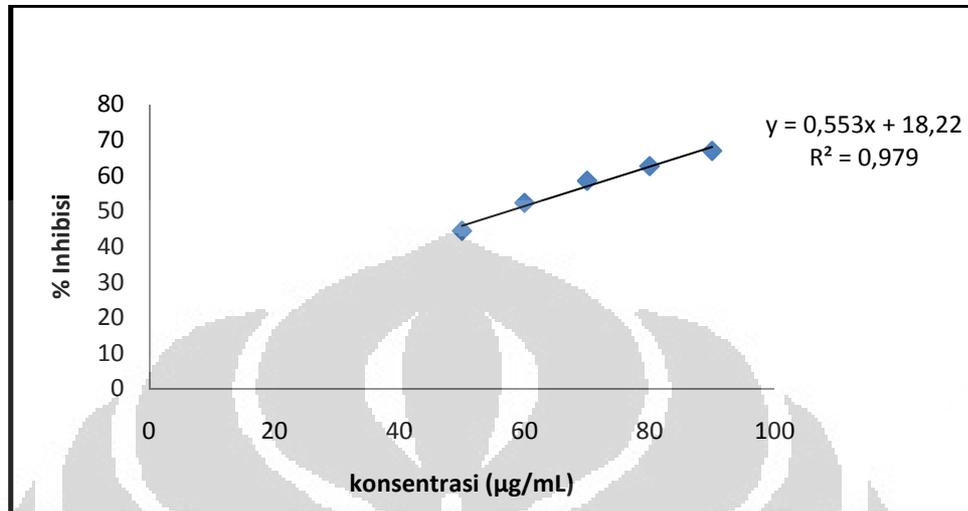


Gambar 1. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Standar Quersetin

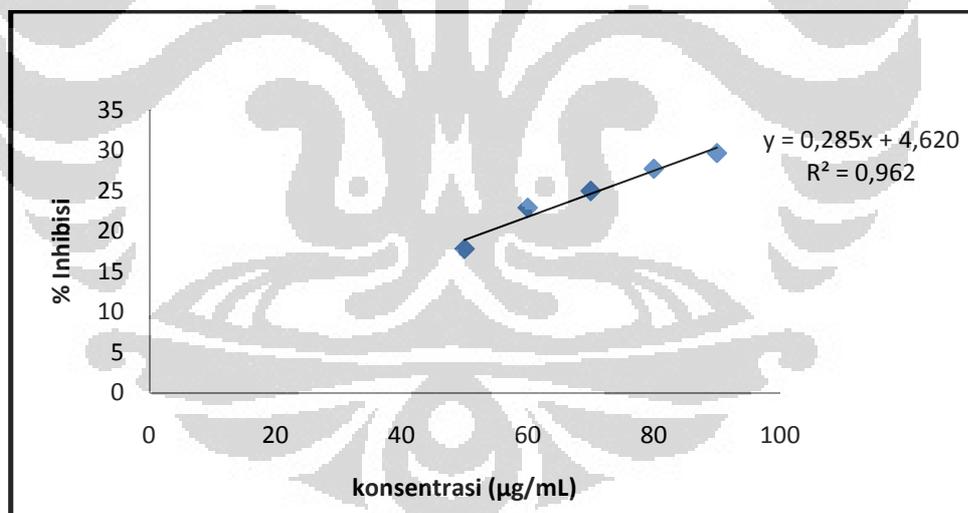


Gambar 2. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Standar Asam Askorbat

Lampiran 5. (Lanjutan) Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

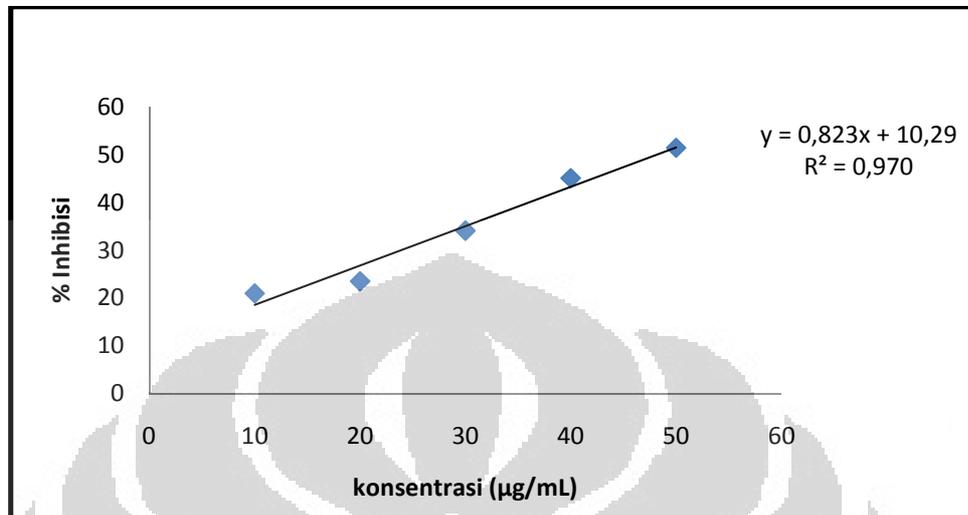


Gambar 3. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Ekstrak Metanol

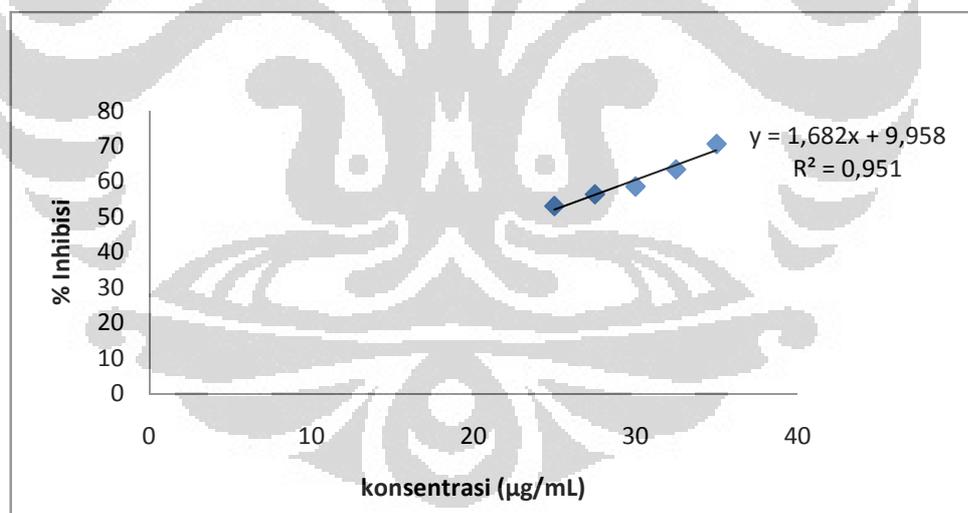


Gambar 4. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Fraksi *n*-heksan

Lampiran 5. (Lanjutan) Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

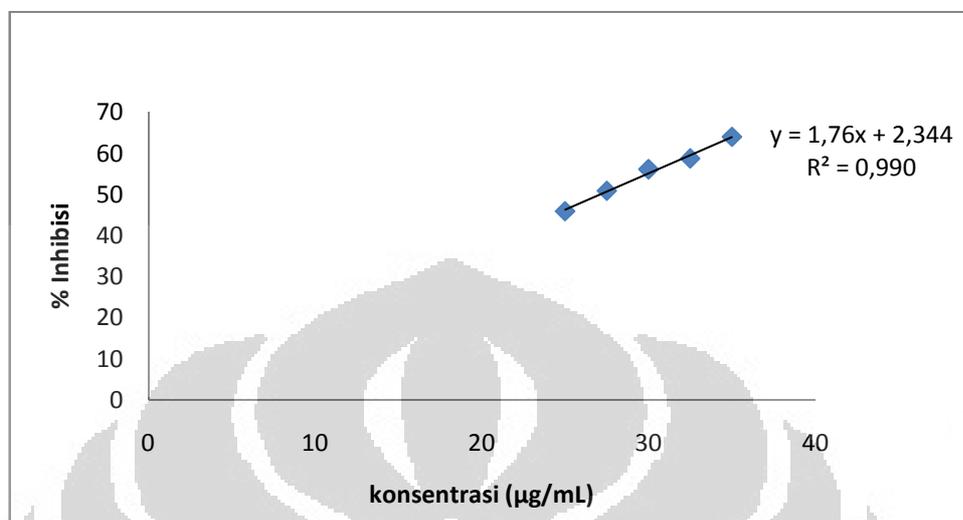


Gambar 5. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Fraksi etil asetat



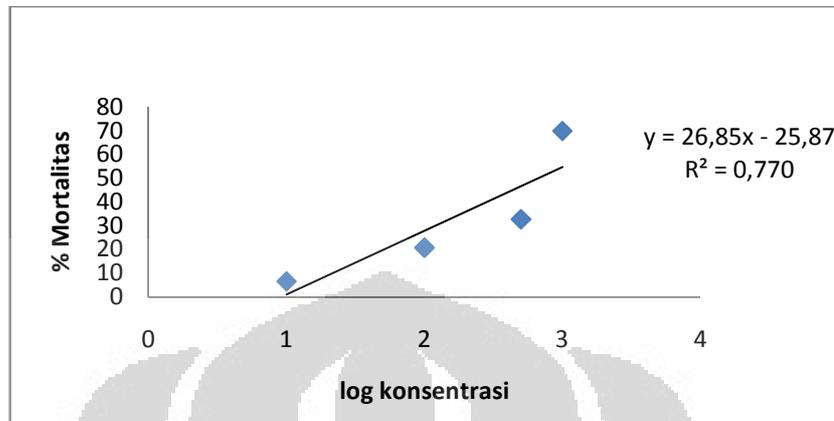
Gambar 6. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Fraksi butanol

Lampiran 5. (Lanjutan) Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

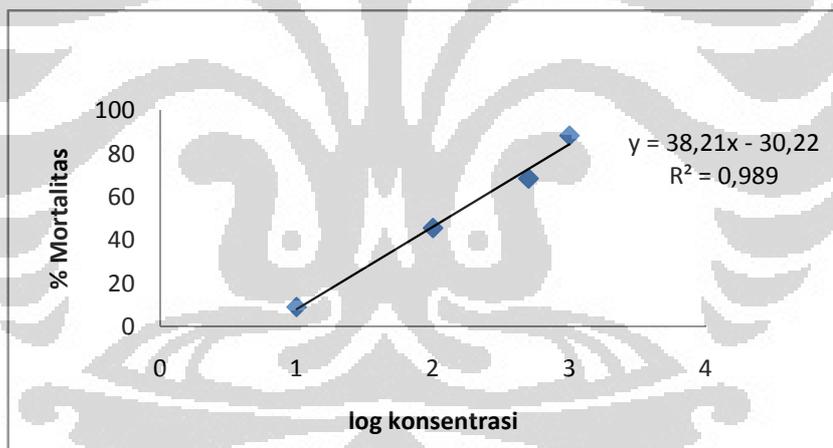


Gambar 7. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Fraksi metanol

Lampiran 6. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

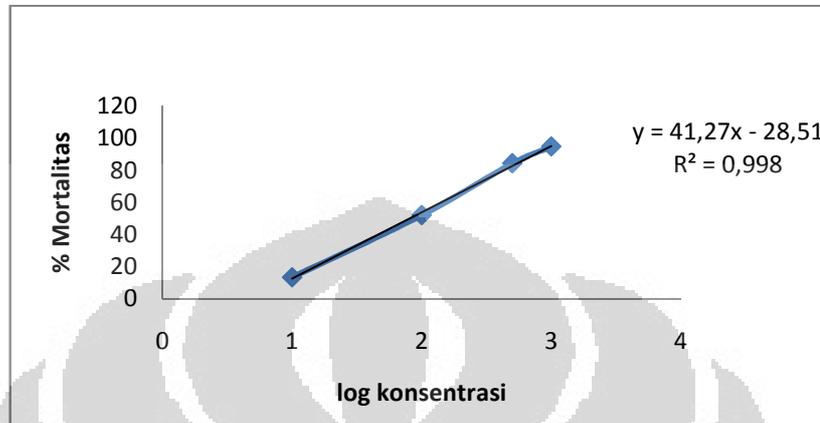


Gambar 1. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Ekstrak metanol

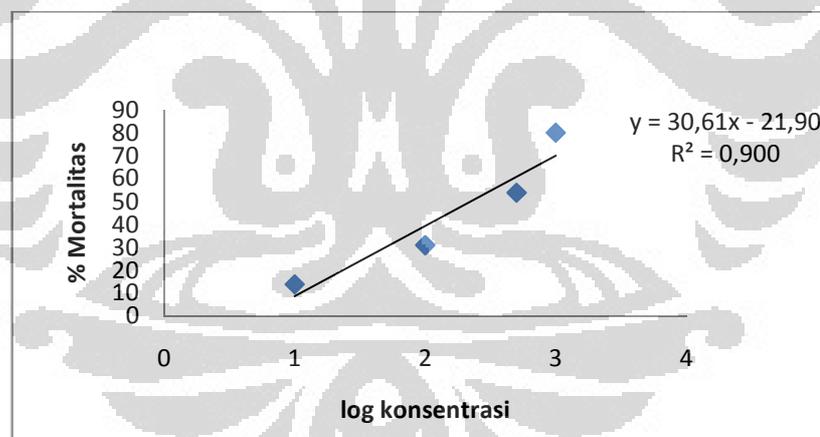


Gambar 2. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Fraksi *n*-heksan

Lampiran 6. (Lanjutan) Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi

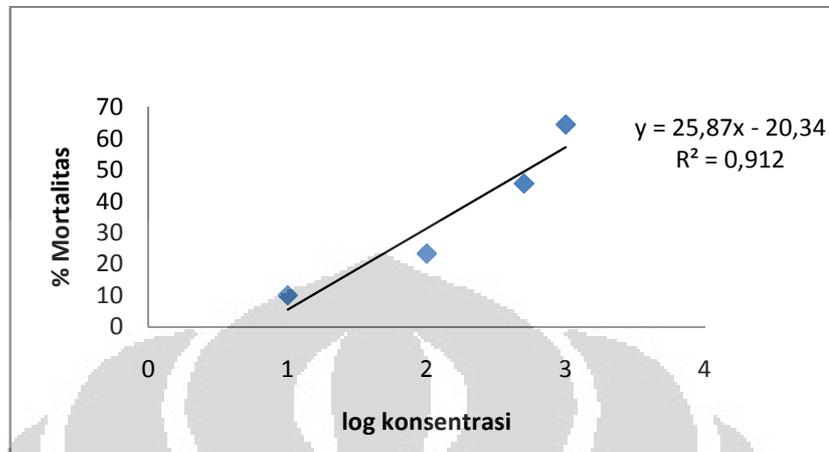


Gambar 3. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Fraksi etil asetat

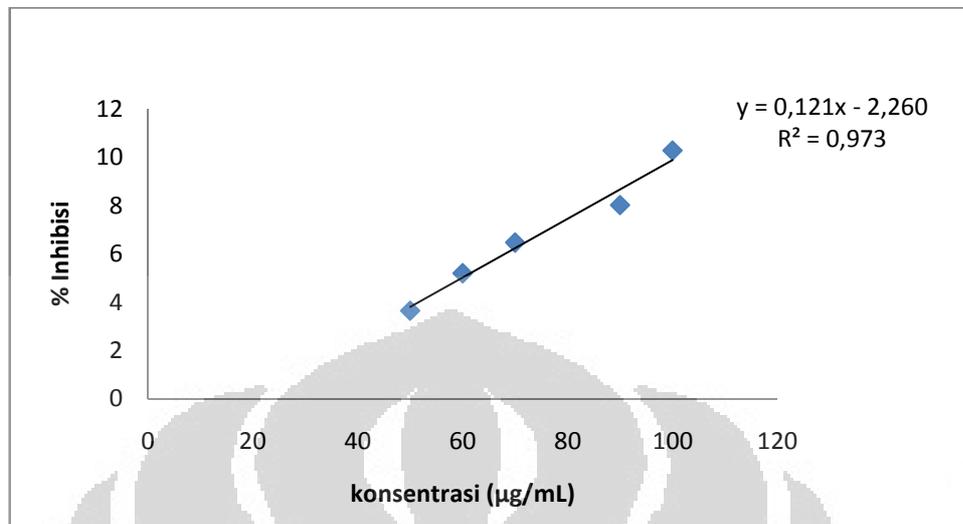
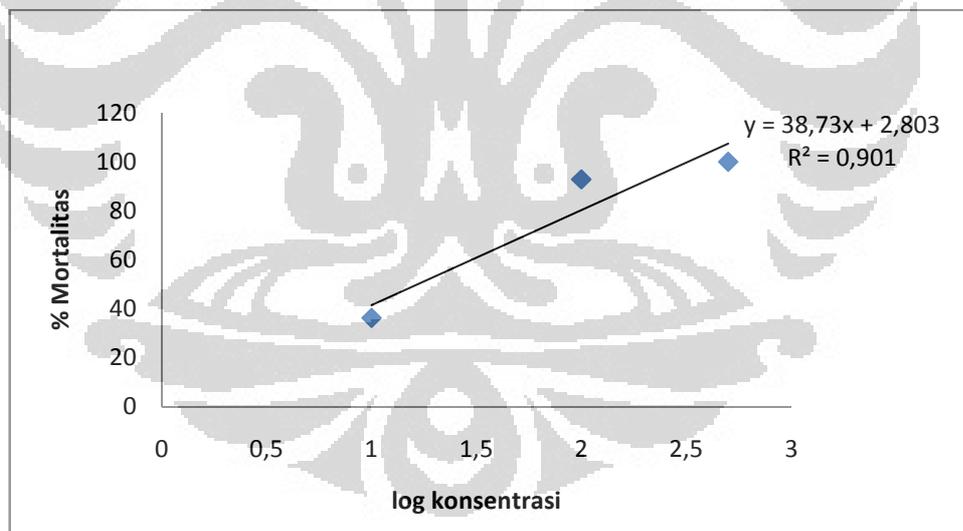


Gambar 4. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC₅₀ Fraksi butanol

Lampiran 6. (Lanjutan) Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC_{50} Ekstrak Metanol dan Hasil Fraksinasi



Gambar 5. Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC_{50} Fraksi metanol

Lampiran 7. Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} & LC_{50} Senyawa LC**Gambar 1.** Kurva Persamaan Regresi Penetapan IC_{50} Senyawa LC**Gambar 2.** Kurva Persamaan Regresi Penetapan LC_{50} Senyawa LC

Lampiran 8. Hasil Determinasi



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, 25 Mei 2012

Nomor : 826 /IPH.1.02/If.8/V/2012
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

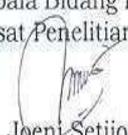
Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Sofa Fajriah M.Sc.
 P2 Kimia Terapan – Puspitek
 SERPONG

Dengan hormat,

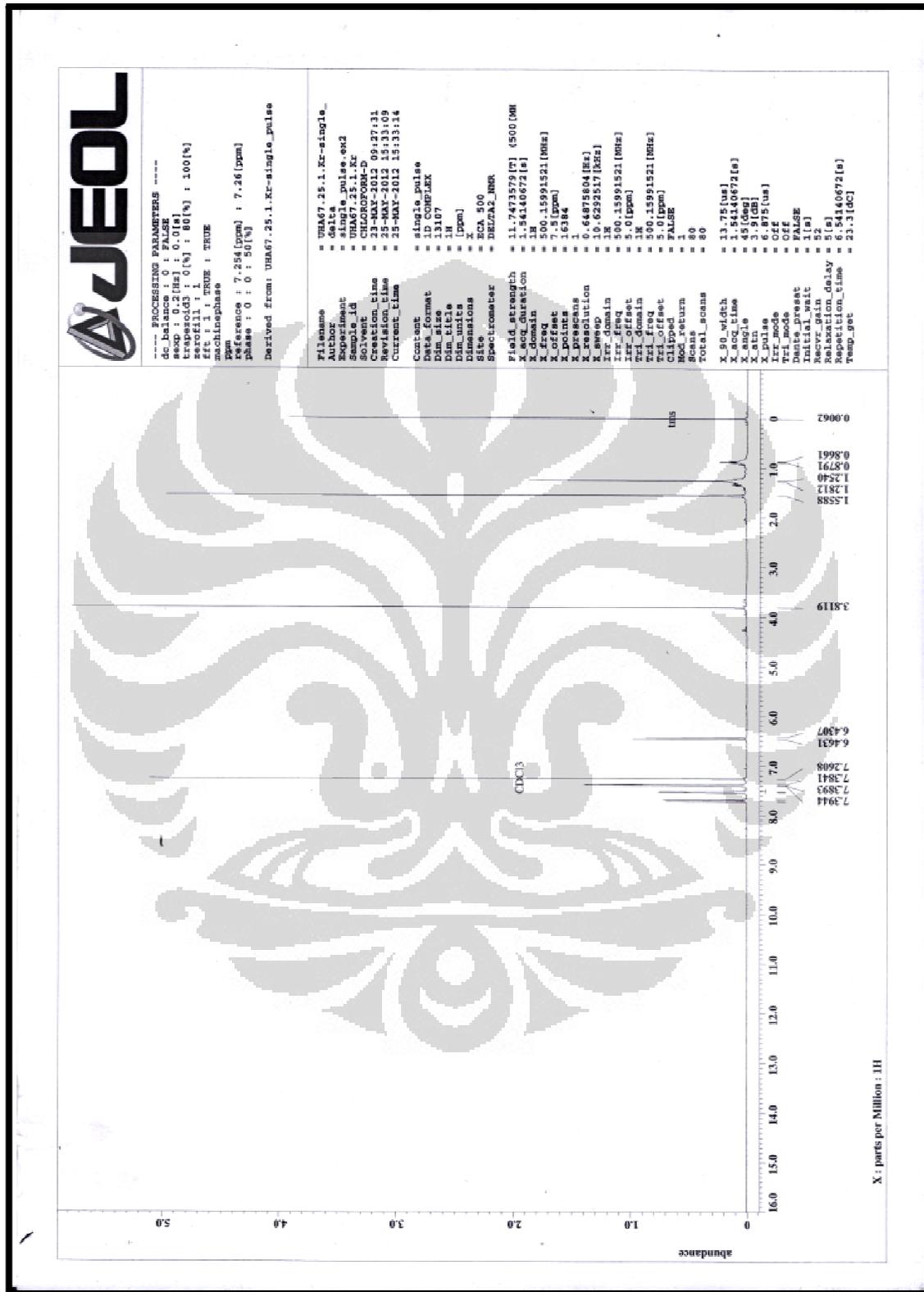
Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke “Herbarium Bogoriense”, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1		<i>Lithocarpus celebicus</i> (Miq.) Rehder	Fagaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


 Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
 NIP. 196706241993032004

Lampiran 9. Spektrum ¹HNMR Senyawa LC



Lampiran 9. (Lanjutan) Spektrum ¹HNMR Senyawa LC

