



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN
CINCAU HIJAU RAMBAT (*Cyclea barbata* Miers.) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI YANG
PALING AKTIF**

SKRIPSI

**ALI MUHAMMAD SHODIQ
0806327692**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI DAUN
CINCAU HIJAU RAMBAT (*Cyclea barbata* Miers.) DAN
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA DARI FRAKSI YANG
PALING AKTIF**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana farmasi

**ALI MUHAMMAD SHODIQ
0806327692**

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

HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, 2 Juli 2012



Ali Muhammad Shodiq

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Ali Muhammad Shodiq

NPM : 0806327692

Tanda tangan : 

Tanggal : 2 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh,

Nama : Ali Muhammad Shodiq
NPM : 0806327692
Program Studi : S1 Reguler Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Cincau Hijau Rambat (*Cyclea Barbata* Miers.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Paling Aktif

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

Pembimbing I : Dr. Katrin, M.S. (.....)

Pembimbing II : Dr. Berna Elya, M.Si. (.....)

Penguji I : Dr. Amarila Malik, M.Si. (.....)

Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH

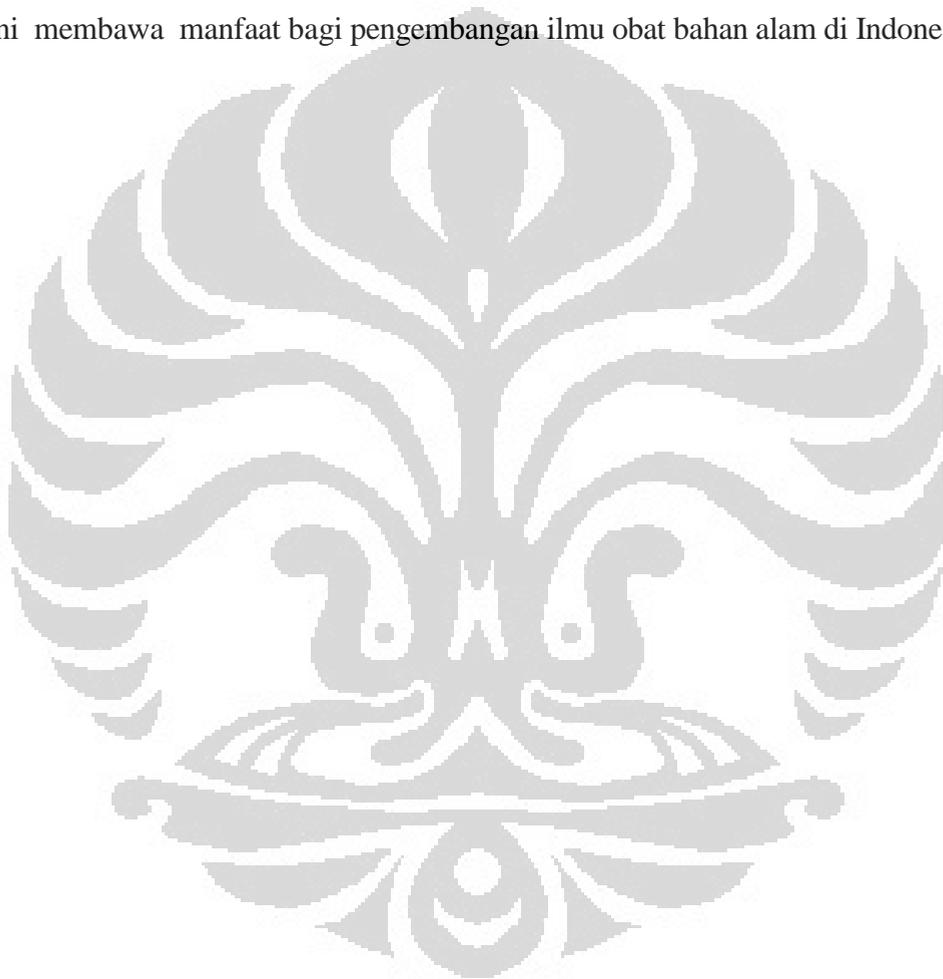
Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Katrin M.S., selaku dosen pembimbing pertama dan kepala laboratorium fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing dan mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Berna Elya, M.Si., selaku dosen pembimbing kedua yang juga telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membimbing dan mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
3. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. Si, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
4. Prof. Drs. Maksum Radji, M.Biomed., Ph.D., Apt, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan akademik selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi UI;
5. Para dosen yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
6. Mba Ulfa dan Mas Agus, selaku laboran laboratorium penelitian fitokimia yang telah memberikan bantuan selama menempuh penelitian;
7. Papa, Mama, Teteh, dan Ade yang telah memberikan dukungan doa, moral, dan materi.
8. Teman-teman seperjuangan di laboratorium fitokimia, Tice, Yunita, Ka

- Atika, dan Ka Putu, yang telah banyak membantu saya dalam penelitian ini;
9. Teman-teman D'Pandewes, Irfan, Ryan, Yogo, Lala, Indah, Ola, Eja, Iwan, dan Delly yang telah memberikan semangatnya selama penelitian ini;
 10. Semua pihak yang turut membantu dan memberikan dukungan selama masa penelitian dan penyusunan skripsi ini;

Akhir kata, saya berharap Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu obat bahan alam di Indonesia.



Penulis
2012

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

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

Nama : Ali Muhammad Shodiq
NPM : 0806327692
Program Studi : Sarjana S1 Reguler
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Cincau Hijau Rambut (*Cyclea Barbata* Miers.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Paling Aktif

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 2 Juli 2012
Yang menyatakan



(Ali Muhammad Shodiq)

ABSTRAK

Nama : Ali Muhammad Shodiq
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Cincau Hijau Rambut (*Cyclea Barbata* Miers.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Paling Aktif

Cyclea barbata Miers. yang termasuk dalam suku Menispermaceae telah lama digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan demam dan radang. Penelitian terdahulu membuktikan seduhan daun *Cyclea barbata* Miers. mampu memperbaiki aktivitas enzim antioksidan mencit bertumor kelenjar susu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun *Cyclea barbata* Miers. serta identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang paling aktif. Ekstraksi dilakukan secara maserasi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak diukur menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Ekstrak metanol menunjukkan aktivitas terbesar dengan IC_{50} 72,57 μ g/ml. Ekstrak metanol kemudian difraksinasi secara kromatografi kolom dipercepat dengan eluen campuran, yaitu n-heksana-etil asetat, kemudian etil asetat-metanol dengan kepolaran yang semakin meningkat. Hasil fraksinasi diperoleh 6 fraksi gabungan (fraksi A-fraksi F). Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan fraksi E mempunyai aktivitas antioksidan terbesar dengan IC_{50} 20,13 μ g/ml. Hasil identifikasi fraksi E menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, polifenol, glikosida, dan saponin. Sedangkan golongan senyawa yang menunjukkan hasil positif antioksidan terdeteksi sebagai alkaloid dan flavonoid.

Kata kunci : 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil, *Cyclea barbata* Miers., identifikasi golongan senyawa
xv + 66 halaman; 23 gambar; 12 tabel; 3 lampiran
Daftar acuan : 39 (1966–2011)

ABSTRACT

Name : Ali Muhammad Shodiq
Program Study : Pharmacy
Title : Antioxidant Activity Assay of Green Cincau (*Cyclea Barbata* Miers.) Leaves Extracts and Fractions and Chemical Compounds Identification from Highest Fraction

Cyclea barbata Miers. included in the Menispermaceae family has been used as a traditional medicine to cured fever and inflammation. The former research has revealed that *Cyclea barbata* Miers leaves infusion could improve antioxidant enzyme activity from mice with breast tumor. The purpose of this research was to studies antioxidant activity of *Cyclea Barbata* Miers. leaves extracts and fractions and to identifies the chemical compounds from highest fraction. The leaves were macerated with n-hexane, ethyl acetate, and methanol respectively. The antioxidant activity of each extract were measured using 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) method. Methanol extract showed the highest activity with IC₅₀ value of 72,57 µg/ml. Methanol extract then fractionated using vacuum liquid chromatography by combination of n-hexane-ethyl acetate, followed by ethyl acetate-methanol with increased polarity. The fractionation obtained 6 fractions (fraction A-fraction F). The antioxidant activity assay showed that fraction E has highest antioxidant activity with IC₅₀ value of 20,13 µg/ml. Identification of fraction E revealed that the fraction contains alkaloids, phenolic compounds, glycosides, and saponins. While the chemical compounds that showed an antioxidant positive result detected as alkaloid and flavonoid.

Keywords : 1,1-Diphenyl-2-picril hydrazyl, *Cyclea barbata* Miers., chemical compounds identification
xv + 66 pages ; 23 pictures; 12 tables; 3 appendices
Bibliography : 39 (1966–2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR/ UCAPAN TERIMA KASIH	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Perumusan masalah dan ruang lingkup.....	3
1.3 Jenis penelitian dan metode yang digunakan.....	3
1.4 Tujuan penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Cyclea barbata</i> Miers.	5
2.1.1 Taksonomi	5
2.1.2 Morfologi tumbuhan	5
2.1.3 Mikroskopik daun	6
2.1.4 Penyebaran, habitat, dan pemanenan.....	7
2.1.5 Khasiat	7
2.1.6 Kandungan kimia.....	7
2.2 Simplisia	8
2.3 Ekstraksi dan ekstrak	9
2.3.1 Ekstraksi cara dingin.....	9
2.3.2 Ekstraksi cara panas.....	10
2.4 Fraksinasi	11
2.4.1 Kromatografi lapis tipis.....	11
2.4.2 Kromatografi kolom.....	15
2.5 Penapisan fitokimia.....	16
2.5.1 Alkaloid	16
2.5.2 Flavonoid	16
2.5.3 Terpenoid.....	16
2.5.4 Tanin.....	17
2.5.5 Glikosida.....	17
2.5.6 Saponin	18
2.5.7 Kuinon	18
2.6 Antioksidan	18
2.6.1 Antioksidan primer	20
2.6.2 Antioksidan sekunder	21

2.6.3 Antioksidan tersier	21
2.7 Uji aktivitas antioksidan	21
2.7.1 Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).....	21
2.7.2 Metode kekuatan pereduksi	22
2.7.3 Metode ABTS.....	22
2.7.4 Kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC)	23
2.7.5 Metode FRAP	23
2.7.6 Metode TBA (<i>Thiobarbituric acid</i>).....	23
2.7.7 Metode CUPRAC	24
2.8 Spektrofotometer <i>uv-vis</i>	24
3. METODE PENELITIAN	26
3.1 Waktu dan tempat	26
3.2 Bahan	26
3.2.1 Bahan uji.....	26
3.2.2 Bahan kimia.....	26
3.3 Alat.....	27
3.4 Cara kerja	27
3.4.1 Penyiapan bahan	27
3.4.2 Ekstraksi	27
3.4.3 Uji pendahuluan aktivitas antioksidan secara kualitatif	28
3.4.4 Uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH.....	28
3.4.5 Fraksinasi	31
3.4.6 Identifikasi golongan senyawa dengan reaksi kimia	31
3.4.7 Identifikasi golongan senyawa dengan KLT	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1 Penyiapan bahan	36
4.2 Ekstraksi.....	37
4.3 Penapisan fitokimia ekstrak.....	38
4.3.1 Alkaloid	39
4.3.2 Flavonoid	39
4.3.3 Terpenoid.....	40
4.3.4 Tanin.....	40
4.3.5 Glikosida.....	41
4.3.6 Saponin	42
4.3.7 Antrakuinon	43
4.4 Uji aktivitas antioksidan ekstrak	43
4.5 Fraksinasi	44
4.6 Uji aktivitas antioksidan fraksi teraktif.....	45
4.7 Penapisan fitokimia fraksi teraktif	46
5. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran	48
DAFTAR ACUAN	49

DAFTAR GAMBAR

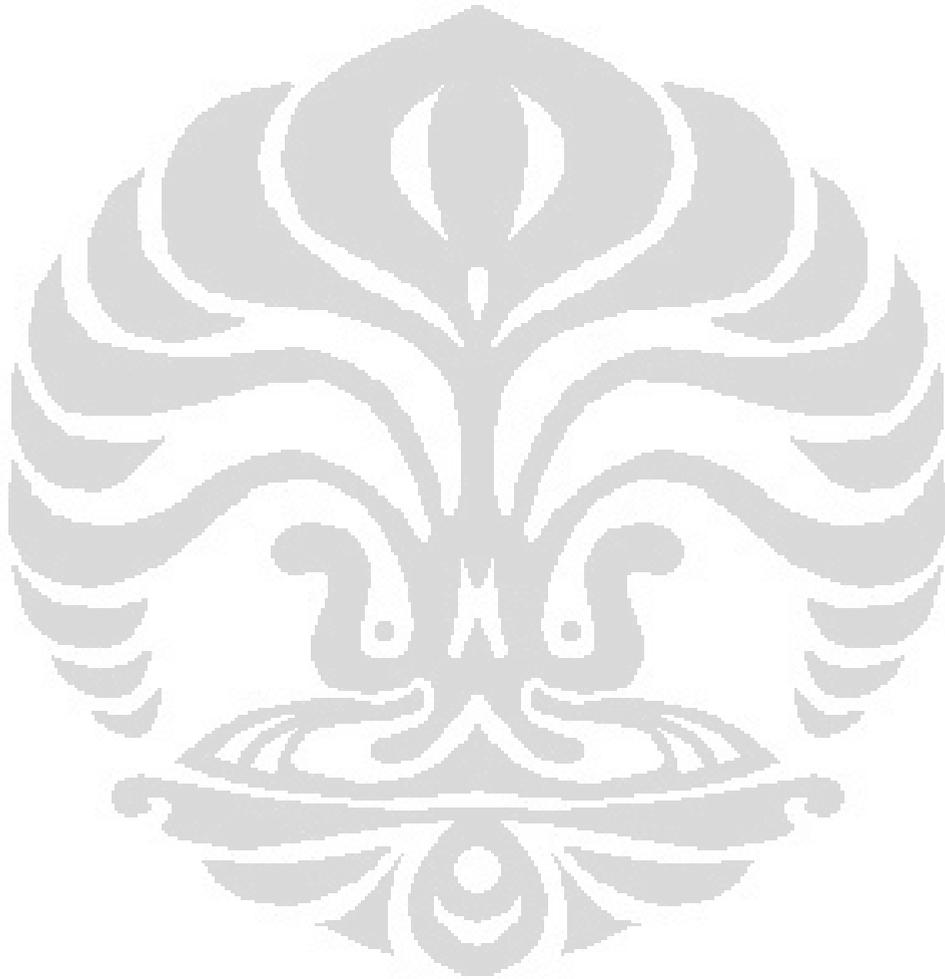
Gambar 2.1. <i>Cyclea barbata</i> Miers.....	6
Gambar 2.2. Struktur kimia tetrandrin dan fangkinolin.....	8
Gambar 2.3. Reaksi radikal DPPH dengan senyawa antioksidan.....	22
Gambar 4.1.a.Fragmen rambut penutup serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. .	53
Gambar 4.1.b.Fragmen rambut penutup serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. dari MMI V	53
Gambar 4.2.a.Fragmen epidermis atas serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. ...	53
Gambar 4.2.b.Fragmen epidermis atas serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. dari MMI V	53
Gambar 4.3.a.Fragmen epidermis bawah serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.	53
Gambar 4.3.b.Fragmen epidermis bawah serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. dari MMI V	53
Gambar 4.4.a.Fragmen parenkim dan berkas pembuluh serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.....	54
Gambar 4.4.b.Fragmen parenkim dan berkas pembuluh serbuk daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. dari MMI V.....	54
Gambar 4.5. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.....	54
Gambar 4.6. Spektrum larutan DPPH 25 µg/ml dalam metanol pada panjang gelombang optimum (517 nm)	54
Gambar 4.7. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan 6 fraksi dari ekstrak metanol.....	55
Gambar 4.8.a.Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan larutan DPPH (kiri) dan H ₂ SO ₄ dalam metanol (kanan).....	55
Gambar 4.8.b.Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorf.....	55
Gambar 4.8.c.Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan pereaksi AlCl ₃ .	55
Gambar 4.9. Profil KLT uji alkaloid fraksi E	56
Gambar 4.10. Profil KLT uji flavonoid fraksi E.....	56
Gambar 4.11. Profil KLT uji terpenoid fraksi E	57
Gambar 4.12. Profil KLT uji tanin fraksi E	57
Gambar 4.13. Profil KLT uji saponin fraksi E.....	58
Gambar 4.14. Profil KLT uji antrakuinon fraksi E	58

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Data rendemen ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.....	38
Tabel 4.2.	Hasil penapisan fitokimia dari ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.	39
Tabel 4.3.	Hasil penapisan fitokimia dari fraksi teraktif (Fraksi E).....	47
Tabel 4.4.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan alkaloid.....	59
Tabel 4.5.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan flavonoid	59
Tabel 4.6.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan terpenoid.....	60
Tabel 4.7.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan tanin	60
Tabel 4.8.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan glikosida.....	60
Tabel 4.9.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan saponin	61
Tabel 4.10.	Penapisan fitokimia ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers. golongan antrakuinon	61
Tabel 4.11.	Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.....	62
Tabel 4.12.	Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi gabungan dari ekstrak daun <i>Cyclea barbata</i> Miers.	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja	64
Lampiran 2. Surat determinasi <i>Cyclea barbata</i> Miers. dari LIPI Cibinong.....	65
Lampiran 3. Sertifikat analisis DPPH (Wako).....	66



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brazil. Sebanyak 5.131.100 keanekaragaman hayati di dunia, 15,3% -nya terdapat di Indonesia. Luar biasanya, keanekaragaman hayati Indonesia, terutama yang berupa tumbuhan, banyak yang berpotensi untuk dijadikan obat. Potensi hayati yang luar biasa ini perlu dieksplorasi dan dimanfaatkan untuk kesehatan dan kesejahteraan rakyat Indonesia (Hanggono,2011).

Dalam dua dasawarsa terakhir ini, penggunaan obat tradisional berbahan dasar tumbuhan di Indonesia, seperti jamu, telah menarik perhatian dan kepopulerannya di masyarakat semakin meningkat. Oleh karena itu, pemerintah Republik Indonesia melalui Peraturan Menteri Kesehatan nomor: 003/Menkes/Per/I/2010 telah mencanangkan suatu program saintifikasi jamu dalam penelitian berbasis pelayanan kesehatan. Salah satu tujuan program ini adalah untuk menciptakan obat tradisional Indonesia yang aman, bermutu, dan memiliki khasiat nyata, yang teruji secara ilmiah melalui penelitian secara empiris berbasis pelayanan kesehatan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2010).

Dalam upaya mewujudkan program saintifikasi jamu tersebut, penelitian terhadap khasiat tumbuhan telah banyak dilakukan, salah satunya adalah uji aktivitas antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat, atau menghambat reaksi oksidasi. Senyawa antioksidan memegang peranan penting dalam pertahanan tubuh terhadap pengaruh buruk yang disebabkan radikal bebas. Radikal bebas diketahui dapat menginduksi penyakit kanker, arteriosklerosis, dan penuaan dini, yang disebabkan oleh kerusakan jaringan akibat oksidasi (Kikuzaki dan Nakatani, 1993).

Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami. Antioksidan sintetik memiliki efektifitas yang tinggi, namun kurang aman bagi kesehatan sehingga penggunaannya diawasi secara ketat di berbagai negara (Hertiani, Nihlati, dan Rohman, 2008). Senyawa antioksidan

sintetik seperti *butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), dan *tertbutylhydroxyquinone* (TBHQ) telah dilarang penggunaannya, karena bersifat karsinogenik. Berbagai studi mengenai BHA dan BHT menunjukkan bahwa komponen ini dapat menimbulkan tumor pada hewan percobaan pada penggunaan jangka panjang (Andarwulan, Wijaya, dan Cahyono, 1996). Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Sunarni, 2005).

Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif dan mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif seperti diabetes, kanker, inflamasi jaringan, kelainan imunitas, infark miokard, dan penuaan dini (Middleton, Kandaswami, dan Theoharides, 2000). Studi epidemiologi menunjukkan konsumsi buah dan sayuran yang cukup berhubungan dengan tingkat kejadian yang lebih rendah terhadap jenis penyakit seperti kanker dan kardiovaskuler. Efek tersebut antara lain disebabkan adanya aktivitas antioksidan alami seperti vitamin C, vitamin E, betakaroten, dan beberapa senyawa polifenol (Cos, *et al.*, 2001).

Salah satu tumbuhan di Indonesia yang sejak dahulu digunakan untuk pengobatan adalah cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) dari Famili Menispermaceae. Daun cincau hijau rambat telah lama dijadikan bahan baku minuman cincau yang dipercaya berkhasiat untuk mengobati demam, sakit perut atau kembung, radang (Chalid, 2003), serta dapat menurunkan tekanan darah dan mengatasi panas dalam (Angelina, Hartati, Dewijanti, Banjarnahor, dan Meilawati, 2008). Masyarakat di Jawa Barat juga telah lama menggunakan daun cincau hijau rambat secara topikal untuk menyembuhkan demam (Roosita, Kusharto, Sekiyama, Fachrurozi, dan Ohtsuka, 2008). Kandungan kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan ini adalah klorofil, karbohidrat, alkaloid siklein, tetrandrin, dimetil tetrandrin, polifenol, saponoid, dan flavonoid (Angelina, Hartati, Dewijanti, Banjarnahor, dan Meilawati, 2008).

Penelitian terdahulu tentang cincau hijau rambat yang pernah dilakukan adalah pengaruh ekstrak daun cincau hijau *Cyclea barbata* L. Miers dan *Premna oblongifolia* Merr terhadap aktivitas enzim antioksidan dan pertumbuhan tumor

kelenjar susu mencit C3H (Chalid, 2003). Pada penelitian ini diketahui seduhan serbuk daun cincau hijau dapat memperbaiki berat hati dan aktivitas katalase mencit. Sedangkan penelitian aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat serta identifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif belum pernah dilakukan.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat dengan metode peredaman radikal 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) dan identifikasi golongan senyawa dari fraksi yang paling aktif. Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan baru dalam ilmu farmasi terutama mengenai antioksidan sehingga akan mendorong pengembangan lebih lanjut tentang pemanfaatan daun cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) sebagai sumber antioksidan alami yang baru.

1.2 Perumusan masalah dan ruang lingkup

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- a. Apakah ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) memiliki aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode peredaman radikal DPPH?
- b. Golongan senyawa apa saja yang terdapat di dalam fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling aktif?

Ruang lingkup penelitian ini adalah fitokimia (biologi farmasi).

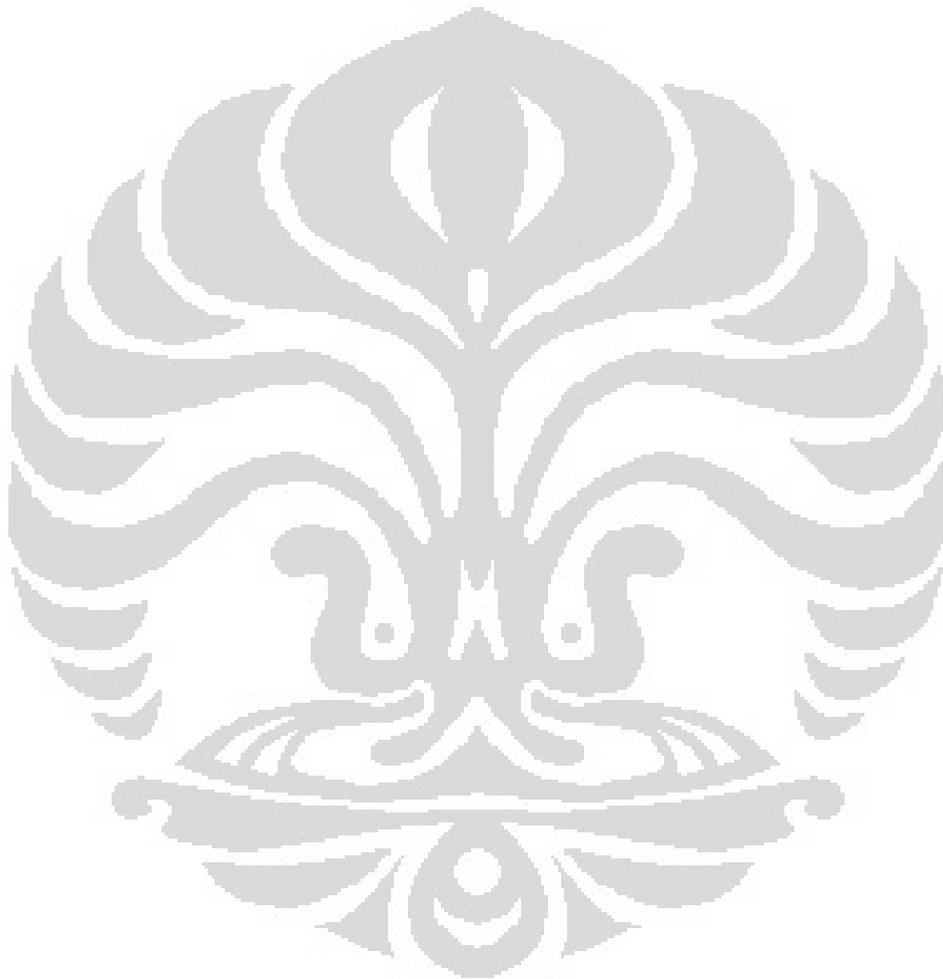
1.3 Jenis penelitian dan metode yang digunakan

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental. Sedangkan metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengukuran serapan radikal DPPH pada panjang gelombang optimum yang menggambarkan besar aktivitas suatu antioksidan dalam meredam radikal bebas dari ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) serta identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif dengan beberapa reaksi identifikasi senyawa metabolit sekunder.

1.4 Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) dengan metode peredaman radikal DPPH.
- b. Mengetahui golongan senyawa dari fraksi yang paling aktif.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Cyclea barbata* Miers.

2.1.1 Taksonomi

Kerajaan : Plantae
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Magnoliidae
Bangsa : Ranunculales
Suku : Menispermaceae
Marga : *Cyclea*
Jenis : *Cyclea barbata* Miers.
Sinonim : *Cyclea peltata* auct.non (Lamk) Hook.f. & Thomson (De Padua, Bunyapraphatsara, dan Lemmens, 1999).

2.1.2 Morfologi tumbuhan

Cyclea barbata Miers. atau cincau hijau rambat merupakan tanaman merambat berkayu sepanjang 8 m, akar berdaging, tebal dan panjang, coklat pucat di bagian luar dan keputihan atau kekuningan di bagian dalam. Waktu muda, batangnya berbulu kasar seperti sikat, setelah itu gundul (De Padua, Bunyapraphatsara, dan Lemmens, 1999). Daun cincau hijau rambat tidak berbau, tidak berasa, tetapi berlendir. Helaian daunnya berwarna hijau kecoklatan dan berbentuk jantung. Panjangnya 5,5 cm sampai 9 cm, sedangkan lebarnya 5,5 cm sampai 9,5 cm. Ujung daun runcing, tepinya tidak rata, berambut halus, dan pancung pangkalnya tumpul. Tangkai daun memiliki panjang 2,5 cm sampai 4,5 cm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989). Bunga jantan dengan kelopak berbulu halus dan daun mahkota berpautan, sedangkan bunga betina berjejalan di bongkol yang agak bulat. Daun buahnya menggimbal dan buahnya berbulu halus (De Padua, Bunyapraphatsara, dan Lemmens, 1999).



[sumber: Koleksi pribadi]

Gambar 2.1. *Cyclea barbata* Miers.

2.1.3 Mikroskopik daun

Epidermis atas terdiri dari satu lapis sel berbentuk empat persegi panjang, kutikula tipis, dan rambut penutup terdiri dari satu sel berbentuk kerucut panjang. Epidermis bawah terdiri dari satu lapis sel, kutikula tebal, dan rambut penutup terdiri dari satu sel bentuk kerucut panjang yang lebih banyak daripada di epidermis atas. Mesofil meliputi jaringan palisade terdiri dari 2 lapis sel, batas lapisan tidak jelas, jaringan bunga karang terbentuk dari beberapa lapis sel berbentuk tidak beraturan dan memiliki banyak rongga udara. Berkas pembuluh tipe kolateral, di atas dan di bawah berkas pembuluh tersebut terdapat serabut (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

Serbuk daun *Cyclea barbata* Miers. berwarna hijau tua. Fragmen pengenal dari serbuk daunnya adalah rambut penutup bersel tunggal berbentuk kerucut, fragmen epidermis atas, fragmen epidermis bawah dengan stomata tipe anomositik, fragmen serabut dengan dinding berombak, fragmen lamina, dan fragmen mesofil dengan berkas pembuluh (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

2.1.4 Penyebaran, habitat, dan pemanenan

Cyclea barbata Miers. tumbuh tersebar di India (Assam), Myanmar, Indo-China, Thailand, Simeulue, pulau-pulau di Paparan Sunda, dan Pulau Jawa. Tumbuhan ini tumbuh di hutan, termasuk hutan jati dan hutan bambu, di padang rumput dengan vegetasi semak belukar, kadang-kadang di daerah berbatu kapur, kadang-kadang dikultivasi, dan hidup di daerah dengan ketinggian di atas 1.100 m di atas permukaan laut (De Padua, Bunyaphatsara, dan Lemmens, 1999).

Daun *Cyclea barbata* Miers. dapat dipanen pertama kali setelah penanaman selama 6 sampai 8 bulan. Selanjutnya, daunnya dapat dipanen 2 sampai 3 bulan sekali (De Padua, Bunyaphatsara, dan Lemmens, 1999).

2.1.5 Khasiat

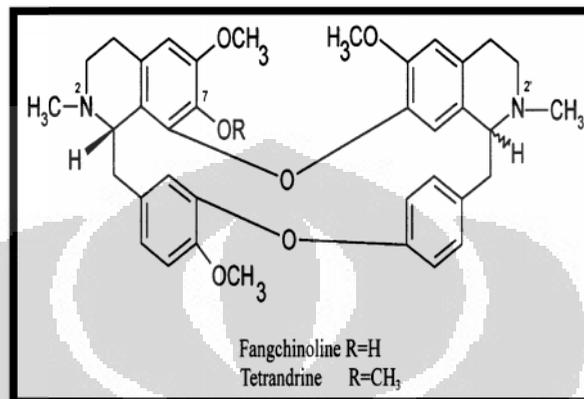
Beberapa penelitian terdahulu telah mengungkap beberapa khasiat dari tumbuhan *Cyclea barbata* Miers., antara lain:

- a. Alkaloid bisbenzilisokuinolin (tetrandrin dan fangkinolin) yang telah diisolasi dari akar *Cyclea barbata* Miers. telah diteliti menunjukkan efek vasodilator, hipotensif, dan agregasi platelet serta aktivitas antiinflamasi, immunosupresi, dan antiplasmodial, baik secara *in vitro*, maupun secara *in vivo* (De Padua, Bunyaphatsara, dan Lemmens, 1999).
- b. Air perasan daun cincau telah diteliti pengaruhnya dalam melindungi lambung tikus dari iritasi, yang diinduksi oleh asam asetil salisilat (Djam'an, 2008).
- c. Serbuk dan air seduhan daun cincau telah diteliti mampu memperbaiki berat hati dan aktivitas katalase pada mencit C3H bertumor kelenjar susu (Chalid, 2003).
- d. Pemberian ekstrak air dari daun cincau dengan dosis 7,5 gr/l telah diteliti dapat meningkatkan jumlah sperma mencit balb/c jantan yang mengalami penurunan akibat paparan asap rokok (Purbandari dan Juniarto, 2010).

2.1.6 Kandungan kimia

Secara umum kandungan daun cincau hijau rambat adalah karbohidrat, lemak, protein, klorofil, dan senyawa-senyawa lainnya seperti polifenol, flavonoid, serta mineral-mineral dan vitamin-vitamin, di antaranya kalsium,

fosfor, vitamin A, dan Vitamin B (Djam'an, 2008). Selain itu, daun cincau hijau rambat juga mengandung alkaloid bisbenzilisokuinolin, seperti tetrandrin, fangkinolin, berbamin, homoaromolin, sikleapeltin, dan sikleabarbatin (De Padua, Bunyaphatsara, dan Lemmens, 1999).



[Sumber: Choi, *et al.*, 2000, telah diolah kembali]

Gambar 2.2. Struktur kimia tetrandrin dan fangkinolin

2.2 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman, atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman, atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan, atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan, dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan pelikan (mineral) yang belum diolah, atau telah diolah dengan cara sederhana, atau belum berupa zat kimia murni (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus

simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

2.3 Ekstraksi dan ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak terlarut dengan pelarut cair. Untuk mengekstraksi bahan alam, terdapat sejumlah metode menggunakan pelarut organik atau pelarut yang mengandung air yang dapat diterapkan. Pada ekstraksi cair-padat, bahan tanaman mengalami kontak dengan pelarut. Proses keseluruhannya bersifat dinamis dan dapat disederhanakan ke dalam beberapa tahap. Pada tahap pertama, misalnya pelarut harus berdifusi ke dalam sel, pada tahap selanjutnya pelarut harus dapat melarutkan metabolit tanaman, dan akhirnya harus berdifusi keluar sel sehingga meningkatkan jumlah metabolit yang terekstraksi. Berikut ini adalah beberapa metode yang sering digunakan dalam ekstraksi bahan alam (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

2.3.1 Ekstraksi cara dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus menerus). Remaserasi berarti

dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*), yang umumnya dilakukan pada suhu kamar. Prosesnya terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, dan tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak) secara terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.3.2 Ekstraksi cara panas

a. 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 3 sampai 5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.

b. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama (lebih dari 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air.

2.4 Fraksinasi

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur dan berbeda kepolaran (Sarker, Latif, dan Gray, 2006). Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol. Untuk menarik lemak dan senyawa nonpolar digunakan n-heksana, etil asetat untuk menarik senyawa semi polar, sedangkan metanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut yang nonpolar sedangkan senyawa-senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga.

Metode yang umumnya digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa yaitu metode kromatografi. Kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase, salah satu di antaranya bergerak secara berkesinambungan dengan arah tertentu dan di dalamnya, zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas yang disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Dengan demikian, masing-masing zat dapat diidentifikasi atau ditetapkan dengan metode analitik. Untuk tujuan kualitatif dapat digunakan kromatografi lapis tipis (KLT) sedangkan untuk tujuan pemisahan senyawa dalam jumlah besar (preparatif) dapat digunakan kromatografi kolom.

2.4.1 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi, atau gabungannya. KLT merupakan salah satu teknik kromatografi yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran multikomponen, analisis kuantitatif, dan isolasi skala preparatif. Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat, dan jumlah zat yang diperiksa

cukup kecil (Harmita, 2006). Berikut ini adalah hal-hal yang perlu diketahui dalam penggunaan KLT.

2.4.1.1 Fase diam

Fase diam adalah lapisan tipis penyerapan yang seragam atau media terpilih yang digunakan sebagai media pembawa. Penjerap dilekatkan pada penyangga sebagai pelapis untuk mendapatkan lapisan yang stabil dengan ukuran yang sesuai. Penyangga yang sering digunakan adalah lempeng gelas, lembaran plastik, dan aluminium (Touchstone dan Dobbins, 1983), tetapi jika tidak dinyatakan lain, lempeng yang digunakan dalam Farmakope Herbal Indonesia edisi 1 adalah lempeng silika atau selulosa siap pakai. Zat penjerap terdiri dari bahan penjerap yang halus, umumnya berdiameter 5 μm hingga 40 μm . Zat penjerap dapat dilapiskan langsung pada lempeng kaca atau dengan menggunakan kalsium sulfat terhidrasi 5% hingga 15%, pasta kanji, atau perekat lain (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Zat penjerap yang paling sering digunakan antara lain silika gel, alumina, kieselguhr, dan selulosa (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Ukuran standar untuk lempeng KLT adalah 20 x 20 cm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Ukuran lainnya dari lempeng antara lain 5 x 20 cm, 10 x 20 cm, dan 20 x 40 cm. Lempeng mikro dapat dibuat dari slide mikroskop (Gritter, Bobbitts, dan Schwarting, 1991).

Lapis tipis dapat mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak tak berwarna pada lapisan yang telah dikembangkan. Jadi lapisan yang mengandung indikator fluoresensi akan berpendar jika disinari pada panjang gelombang yang tepat. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakkan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau mengandung cincin aromatik, maka sinar ultraviolet yang mengeksitasi tidak akan mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya berupa bercak gelap dengan latar belakang yang berfluoresensi. Indikator terkandung pada penjerap dengan konsentrasi 1% (Gritter, Bobbitts, dan Schwarting, 1991).

2.4.1.2 Fase gerak

Sifat dan komposisi kimia fase gerak ditentukan oleh jenis zat yang dipisahkan dan jenis penjerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi fase gerak dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Seluruh senyawa organik termasuk pelarut, digolongkan menurut kemampuan dasarnya untuk membuat ikatan hidrogen. Ada pelarut yang merupakan donor atau aseptor pasangan elektron dan mempunyai kemampuan untuk membentuk jembatan intermolekular (hidrofilik dan pelarut polar) ataupun pelarut yang tidak mempunyai kemampuan tersebut (lipofilik, hidrofobik, dan pelarut non polar). Di antara perbedaan ekstrem tersebut terdapat pelarut dengan polaritas sedang (Gritter, Bobbits, dan Schwarting, 1991).

2.4.1.3 Penyiapan dan penotolan sampel

Beberapa cara penyiapan sampel dilakukan dengan tujuan membuat sampel siap untuk dianalisis secara kromatografi. Cara tersebut dapat berupa pelarutan sampel, ekstraksi, kromatografi kolom, sentrifugasi, dan penguapan. Cara tersebut kadang dilakukan bersamaan untuk mendapatkan sampel yang sesuai untuk kromatografi. Untuk sampel berupa ekstrak, penyiapan dapat dilakukan dengan kromatografi kolom dan partisi pelarut (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Sampel dilarutkan pada pelarut yang sesuai. Larutan sampel yang ditotolkan umumnya antara 0,1 hingga 1% sebanyak 1 hingga 20 μ l. Pelarut yang sangat polar atau tidak menguap sebaiknya tidak digunakan pada KLT untuk melarutkan sampel. Hal ini akan menghasilkan titik mulai yang besar dan kromatogram cincin. Jika memang benar-benar diperlukan, gunakan volume yang sangat kecil dan diaplikasikan dengan baik, kemudian pelarut dihilangkan dengan bantuan udara hangat. Hal ini harus dilakukan dengan hati-hati untuk memastikan zat tidak mengkristal pada garis mulai. Jika ini terjadi, akan terjadi kromatogram dari garis mulai ke garis depan (Gritter, Bobbits, dan Schwarting, 1991).

Campuran dilarutkan dan ditotolkan pada garis mulai berupa titik atau pita. Penotolan berupa titik sebaiknya mempunyai diameter antara 2 mm dan paling

besar 5 mm. Selain itu, penotolan dilakukan dengan jarak antara 1,5 sampai 2 cm dari tepi bawah lempeng dan biarkan mengering (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

2.4.1.4 Pengembangan

Setelah sampel ditotolan pada salah satu ujung lempeng, ujung tersebut dibenamkan dalam fase gerak dengan sampel di atas cairan. Gaya kapiler akan menyebabkan fase gerak bergerak melewati media dalam proses yang disebut pengembangan. Setelah fase gerak telah hampir mencapai ujung lainnya dari lempeng, lempeng dipindahkan dan dikeringkan sebelum prosedur pendeteksian. Pengembangan lapis tipis biasanya dilakukan dengan membiarkan fase gerak bermigrasi pada lempeng yang berada pada bejana dengan ukuran sesuai yang telah dijenhkan (Touchstone dan Dobbins, 1983).

2.4.1.5 Metode deteksi

Bercak yang terpisah dapat diamati dengan beberapa cara setelah lempeng dikeringkan. Cara untuk mendeteksi bercak terdiri dari dua macam, yaitu metode kimia dan metode fisik. Dari kedua jenis metode tersebut, masing-masing dapat dibedakan lagi menjadi dua macam, yaitu metode destruktif dan metode nondestruktif (tidak memberikan perubahan permanen pada identifikasi kimia zat). Contoh untuk metode kimia destruktif adalah pengurangan dengan asam sulfat, sedangkan metode nondestruktif adalah dengan uap iodin (Touchstone dan Dobbins, 1983). Contoh untuk metode fisik adalah pengamatan di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008). Metode fisik ini bersifat nondestruktif terhadap sebagai besar zat, tetapi pada beberapa vitamin dan steroid dapat bersifat destruktif (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Derajat retensi dinyatakan dengan Rf yang digunakan untuk menyatakan posisi dari zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan (Harmita, 2006):

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh pusat bercak sampel (cm)}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \quad (2.1)$$

2.4.2 Kromatografi kolom

Kromatografi kolom dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif, maupun analisis kuantitatif. Karena kromatografi kolom memberikan pilihan fase diam yang lebih luas, kromatografi kolom lebih dipilih untuk pemisahan masing-masing senyawa secara kuantitatif dari suatu campuran. Alat-alat yang digunakan dalam kromatografi kolom sangat sederhana, terdiri dari tabung atau kolom kromatografi berbentuk silinder yang umumnya memiliki diameter dalam antara 10 mm hingga 30 mm dan panjangnya antara 150 mm hingga 400 mm, sebuah batang pemampat untuk memadatkan wol kaca, kapas, atau zat penjerap yang terbuat dari plastik, kaca, baja tahan karat, atau aluminium, tabung pengalir yang umumnya berdiameter dalam antara 3 mm hingga 6 mm, dan dapat dilengkapi dengan sebuah kran untuk mengatur laju aliran pelarut yang melalui kolom dengan teliti. Sedangkan untuk zat penjerap yang dapat digunakan pada kromatografi kolom antara lain aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel, tanah diatom terkalsinasi, dan tanah silika yang dimurnikan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Kromatografi kolom dibagi menjadi dua jenis, yaitu kromatografi kolom adsorpsi dan partisi. Pada kromatografi kolom adsorpsi, zat uji yang dilarutkan dalam sejumlah kecil pelarut dituangkan ke dalam kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam zat penjerap, kemudian zat berkhasiat diadsorpsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penjerap. Dengan penambahan pelarut lebih lanjut melalui kolom, oleh gaya gravitasi atau dengan memberikan tekanan, masing-masing zat bergerak turun dalam kolom dengan kecepatan tertentu sehingga terjadi pemisahan. Pada kromatografi partisi, zat yang harus dipisahkan terbagi antara dua cairan yang tidak saling bercampur. Salah satu cairan, yaitu fase diam, umumnya diadsorpsikan pada penyangga padat, karena itu mempunyai area permukaan yang sangat luas terhadap pelarut yang mengalir atau fase gerak. Kontak cairan dengan cairan secara berurutan yang berulang kali terjadi menghasilkan efisiensi pemisahan yang tidak dapat dicapai dengan cara ekstraksi cair-cair biasa (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

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, terpenoid, tanin, glikosida, saponin, dan kuinon (Harborne, 1987).

2.5.1 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia, namun juga memiliki banyak aktivitas fisiologi yang menonjol sehingga digunakan secara luas dalam bidang pengobatan. Alkaloid biasanya tidak berwarna, sering kali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal, tetapi hanya sedikit yang berupa cairan pada suhu kamar (Harborne, 1987).

2.5.2 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari $C_6-C_3-C_6$. Flavonoid umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, yaitu gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum ultraviolet dan spektrum tampak. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah, tepung sari, dan akar (Harborne, 1987).

2.5.3 Terpenoid

Terpenoid adalah suatu senyawa yang berasal dari molekul isopren, $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$, dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpen yang lebih sukar menguap (C_{20}), sampai ke senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C_{30}), serta pigmen karotenoid (C_{40}). Masing-masing golongan terpenoid itu penting, baik pada

pertumbuhan dan metabolisme, maupun pada ekologi tumbuhan. Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform (Harborne, 1987).

2.5.4 Tanin

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam Angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Dalam industri, tanin dimanfaatkan untuk mengubah kulit hewan mentah menjadi kulit siap pakai, karena kemampuannya menyambung-silang protein. Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan 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 dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987).

2.5.5 Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Glikosida yang gulanya berupa glukosa disebut glukosida. Berdasarkan konfigurasi, glikosida dibedakan menjadi α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β . Umumnya glikosida mudah terhidrolisis oleh asam mineral atau enzim. Hidrolisis oleh asam memerlukan panas, sedangkan hidrolisis oleh enzim tidak memerlukan panas. Pada tanaman, hidrolisis enzim terjadi pada proses perkecambahan, luka, dan aktivitas fisiologis dari sel. Hidrolisis glikosida dengan asam lemah atau enzim akan menghasilkan gula pereduksi dan aglikon yang dapat diklasifikasikan sebagai aldehid, alkohol, fenol, dan lain-lain (Harborne, 1987).

2.5.6 Saponin

Saponin terdapat pada tanaman tinggi. Senyawa ini dapat membentuk larutan koloidal dalam air dan bila dikocok akan membuih. Saponin berasa pahit atau getir. Senyawa ini dapat mengiritasi membran mukosa dan membentuk senyawa kompleks dengan kolesterol. Selain itu, saponin juga bersifat toksik terhadap ikan dan hewan berdarah dingin lainnya. Hal ini menyebabkan saponin dimanfaatkan sebagai racun ikan. Pada konsentrasi yang rendah, saponin sering menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987).

2.5.7 Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna dan mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon, yang terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, yaitu benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol, serta mungkin terdapat *in vivo* dalam bentuk gabungan dengan gula sebagai glikosida atau dalam bentuk kuinol tanpa warna, kadang-kadang juga bentuk dimer. Dalam hal demikian, diperlukan hidrolisis asam untuk melepaskan kuinon bebasnya (Harborne, 1987).

2.6 Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang berkemampuan untuk memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Antioksidan bekerja untuk menstabilkan kelebihan radikal bebas dalam tubuh dengan cara mendonorkan atau memberikan elektronnya agar dapat menghambat aktivitas senyawa oksidan tersebut. Oleh karena itu, tubuh memerlukan substansi penting, yaitu antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Tanpa antioksidan yang cukup, reaksi negatif yang disebabkan oleh radikal bebas dapat merusak atau menghancurkan seluruh sel tubuh kita (Winarsi, 2007).

Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan

faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran dari ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan, dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung dan kanker (Winarsi, 2007).

Radikal bebas yang mengambil elektron dari sel tubuh manusia dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbullah sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menjadi penyakit kanker. Sebenarnya, tubuh manusia dapat menghasilkan antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Padahal keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif dan penyakit-penyakit kronis yang dihasilkan (Winarsi, 2007).

Stres oksidatif adalah keadaan di mana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh menetralsirnya. Akibatnya intensitas proses oksidasi sel-sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak. Stres oksidatif merupakan salah satu penyebab utama penuaan dini dan timbulnya penyakit kronis seperti kanker, penyakit jantung, dan Alzheimer. Stres oksidatif dapat dicegah dan dikurangi dengan asupan antioksidan yang cukup dan optimal ke dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh senyawa metabolit sekunder tanaman dapat berfungsi sebagai penangkap radikal bebas yang dapat melindungi diri dari penyakit aterosklerosis, hipertensi, oksidasi lipoprotein densitas rendah (LDL), dan beberapa penyakit kanker lainnya (Akagawa, 2001). Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan sel yang disebabkan spesies oksigen reaktif (ROS), mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif, serta mampu menghambat peroksidase lipid pada makanan (Kuncahyo, 2007). Selain itu, aplikasi antioksidan secara topikal memiliki efek memperlambat penuaan kulit dan efek fotoprotektif terhadap radiasi sinar ultraviolet, baik UV-A, maupun UV-B, yang dapat merusak kulit (Dreher dan Maibach, 2001). Beberapa sumber antioksidan yang sering digunakan secara topikal adalah vitamin C, vitamin E, ALA, dan koenzim Q10.

Karakteristik yang diperlukan suatu molekul agar efektif sebagai antioksidan adalah:

- a. Molekul memiliki hidrogen atau substituen pendonor elektron dengan potensial reduksi yang cukup dibandingkan dengan radikal yang akan ditangkap.
- b. Molekul memiliki kemampuan mendelokalisasi radikal yang telah dihasilkan.
- c. Molekul memiliki potensial kelat-metal transisi yang bergantung pada gugus fungsi dan susunan molekulnya.
- d. Molekul memiliki kemampuan menembus sel target, yang bergantung pada lipofilisitas atau hidroksifilisitas antioksidan atau koefisien partisi.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dapat digolongkan menjadi 3 kelompok (Winarsi, 2007).

2.6.1 Antioksidan primer

Antioksidan ini disebut juga sebagai antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer atau antioksidan enzimatis apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk akan berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif. Tubuh dapat menghasilkan antioksidan berupa enzim yang aktif bila didukung oleh nutrisi pendukung atau mineral yang disebut juga kofaktor. Antioksidan primer yang berperan sebagai kofaktor yaitu:

- a. Superoksida dismutase (SOD)

Antioksidan ini merupakan enzim yang bekerja bila ada mineral-mineral seperti tembaga dan mangan, yang bersumber pada kacang-kacangan dan padi-padian.

- b. Glutation peroksidase

Enzim tersebut mendukung aktivitas enzim SOD bersama-sama dengan enzim katalase dan menjaga konsentrasi oksigen akhir agar stabil dan tidak berubah menjadi prooksidan. Glutation sangat penting untuk melindungi selaput-selaput sel.

c. Katalase

Enzim katalase di samping mendukung aktivitas enzim SOD, juga dapat mengatalisis perubahan berbagai macam peroksida dan radikal bebas menjadi oksigen dan air.

2.6.2 Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Contoh antioksidan sekunder atau antioksidan nonenzimatis adalah vitamin A, vitamin C, vitamin E, dan β -karoten, yang dapat diperoleh dari buah-buahan dan sayur-sayuran. Senyawa-senyawa ini berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai.

2.6.3 Antioksidan tersier

Antioksidan tersier bekerja untuk memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak akibat serangan radikal bebas. Salah satu enzim yang termasuk kelompok ini adalah enzim metionin sulfoksida reduktase.

2.7 Uji aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan suatu zat dapat dilakukan dengan beberapa uji, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Berikut adalah beberapa metode uji aktivitas antioksidan yang banyak dilakukan.

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

Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolerasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan meredam radikal DPPH dan memantau absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer (Yu, 2008). Radikal DPPH yang mengandung elektron bebas memberikan serapan yang kuat pada panjang gelombang maksimum 517 nm dan berwarna ungu. Perubahan warna dari ungu menjadi kuning terjadi ketika elektron tak berpasangan menjadi berpasangan dengan suatu radikal hidrogen dari suatu antioksidan penangkap radikal bebas menjadi bentuk DPPH-H (Prakash, Rigelhof,

2.7.4 Kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC)

ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) merupakan metode analisis baru yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan makanan dan senyawa kimia lainnya. Prosedur analisis ini mengukur kemampuan makanan, vitamin, suplemen nutrisi, atau bahan kimia lainnya untuk melindunginya dari radikal bebas atau bertindak sebagai antioksidan. Uji ini dilakukan dengan menggunakan trolox (analog vitamin E) sebagai standar untuk menentukan trolox ekuivalen (TE). Nilai ORAC kemudian dihitung dari TE dan dinyatakan sebagai satuan atau nilai ORAC. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar kekuatan nilai antioksidannya. Pengujian ini berdasarkan pembentukan radikal bebas menggunakan AAPH (*2,2-azobis-2-amidopropane dihydrochloride*) dan pengukuran dari fluoresensi dengan adanya penghambat radikal (Lopez-Alarcon dan Lissi, 2006).

2.7.5 Metode FRAP

FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji tercepat dan sangat bermanfaat untuk analisis rutin. Aktivitas antioksidan diperkirakan dengan mengukur peningkatan serapan yang disebabkan oleh pembentukan ion Fe^{2+} dari pereaksi FRAP yang berisi TPTZ (*2,4,6-tri-(2-pyridyl(-s-triazine))*) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ atau $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ dan serapannya diukur pada 595 nm. Kompleks biru $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+}$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$ yang berwarna kuning dengan reaksi berikut: $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{3+} + \text{A}_R\text{OH} \rightarrow \text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+} + \text{H}^+ + \text{A}_R=\text{O}$ (Benzie dan Strain, 1996).

2.7.6 Metode TBA (*Thiobarbituric acid*)

Uji TBA merupakan salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan mikrosom dari hati tikus dan induksi lipid peroksidasi dengan ion Fe^{3+} yang memicu produksi sejumlah kecil malonaldehida (MDA). TBA bereaksi dengan MDA untuk membentuk kromogen merah muda yang dapat dideteksi secara spektrofotometer pada panjang

gelombang 595 nm (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar, dan Lakshman, 2005).

2.7.7 Metode CUPRAC

Metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) menggunakan bis(neokuproin) tembaga(II) ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$) sebagai pereaksi kromogenik. Pereaksi $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ yang berwarna biru akan mengalami reduksi menjadi $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ yang berwarna kuning dengan reaksi: $n \text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+} + \text{A}_R(\text{OH})n$
 $n \text{Cu}(\text{Nc})_2^+ + \text{A}_R(=\text{O})n + n \text{H}^+$ (Apak, Güçlü, Özyürek, dan Çelik, 2007).

IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/ml}$, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 $\mu\text{g/ml}$, sedang jika bernilai IC_{50} 100-150 $\mu\text{g/ml}$, dan lemah jika nilai IC_{50} bernilai 151-200 $\mu\text{g/ml}$.

2.8 Spektrofotometer *uv-vis*

Spektrum *uv-vis* merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. Radiasi elektromagnetik atau gelombang elektromagnetik adalah sejenis energi yang disebarkan oleh suatu sumber cahaya dan bergerak lurus ke depan (kecuali kalau dibiarkan atau dipantulkan) dengan kecepatan yang sangat tinggi. Gelombang elektromagnetik dapat berupa cahaya tampak, panas radiasi, sinar X, sinar ultraviolet, gelombang mikro, dan gelombang radio. Bentuk energi radiasi elektromagnetik mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Karena bersifat sebagai gelombang, beberapa parameter perlu diketahui, misalnya panjang gelombang, frekuensi, bilangan gelombang, dan serapan. REM mempunyai vektor listrik dan vektor magnet yang bergetar dalam bidang-bidang yang tegak lurus satu sama lain dan masing-masing tegak lurus pada arah perambatan radiasi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Spektrum serapan adalah hubungan antara serapan dengan panjang gelombang yang biasanya digambarkan dalam bentuk grafik. Untuk mengidentifikasi suatu zat pada daerah ultraviolet, umumnya dilakukan dengan

menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut dan dengan kadar yang tertera seperti pada monografi, untuk menetapkan serapan maksimum atau minimum. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa kadang-kadang perlu dibandingkan dengan pembanding kimia yang sesuai. Pembanding kimia tersebut dikerjakan dengan cara dan kondisi yang sama dengan zat yang diperiksa. Blanko digunakan untuk koreksi serapan yang disebabkan pelarut, pereaksi, sel, ataupun pengaturan alat. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum atau yang tercantum dalam monografi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Senyawa atau zat yang dapat diperiksa adalah zat yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih dikenal dengan istilah kromofor. Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan mengabsorpsi radiasi sinar ultraviolet dan cahaya tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Gugus auksokrom yaitu gugus yang mempunyai elektron nonbonding dan tidak menyerap radiasi ultraviolet jauh, contohnya -OH, -NH₂, -NO₂, dan -X (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995a).

Jenis spektrofotometer *uv-vis* ada dua yaitu *single beam* dan *double beam*. Pada *single beam*, celah keluar sinar monokromatis hanya satu, wadah kuvet yang dapat dilalui sinar hanya satu, dan setiap perubahan panjang gelombang alat harus dinolkan. Pada *double beam*, celah keluar sinar monokromatis ada dua, wadah kuvet yang dapat dilalui sinar ada dua sekaligus, dan cukup satu kali dinolkan dengan cara mengisi kedua kuvet dengan larutan blanko (Harmita, 2006).

Spektrofotometer *uv-vis* digunakan terutama untuk analisis kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisis kualitatif. Analisis kuantitatif dengan cara pembuatan kurva kalibrasi atau dengan menggunakan rumus Lambert-Beer. Analisis secara kualitatif dengan membandingkan panjang gelombang maksimum, membandingkan serapan, daya serap, persen ekstingsi, dan membandingkan spektrum serapannya. Spektrum serapan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu jenis pelarut, pH pelarut, kadar larutan, di mana jika konsentrasi tinggi akan terjadi polimerisasi yang menyebabkan panjang gelombang maksimum berubah sama sekali, tebal larutan, dan lebar celah (Harmita, 2006).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2012 sampai dengan Mei 2012 di Laboratorium Penelitian Fitokimia Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia (FMIPA UI) Depok.

3.2 Bahan

3.2.1 Bahan uji

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cincau hijau rambat (*Cycleae barbatae Folium*) dari tumbuhan *Cyclea barbata* Miers. yang dipanen 6 bulan setelah penanaman. Simplisia diperoleh dari kebun Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balittro) di Cimanggu dan Parung, Bogor dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, LIPI, Cibinong, Bogor.

3.2.2 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol teknis yang telah didestilasi, metanol p.a (Merck), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Wako), kuersetin (Sigma), kloroform (Merck), silika gel 60H (Merck), lempeng KLT Silika F₂₅₄ (Merck), H₂SO₄ 10% dalam metanol sebagai penampak noda pada KLT, aquades, asam klorida p.a (Merck), asam borat (Mallinckordt), asam oksalat (Mallinckordt), asam asetat glasial p.a. (Merck), asam sulfat p.a (Merck), benzen p.a (Merck), besi (III) klorida (Merck); aluminium klorida (Merck), etanol p.a (Merck), natrium hidroksida (Mallinckordt), aseton p.a (Merck), dietil eter p.a (Merck), serbuk magnesium (Merck), serbuk seng (Merck), timbal (II) asetat, anisaldehyd, gelatin, natrium klorida, natrium sulfat anhidrat, aluminium klorida, Mayer LP, Dragendorf LP, Bouchardat LP, dan Molisch LP.

3.3 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker* (IKA Labortechnik KS501D) untuk maserasi, cawan penguap, penguap vakum putar (Buchi R-215), labu erlenmeyer, tabung reaksi, botol vial, beaker glass, labu takar, gelas ukur, pipet volume, pipet mikro, pipet tetes (Pyrex), corong Buchner (Jangkar), spektrofotometer *uv-vis* (Shimadzu), kuvet, plat tetes, gelas arloji, rak tabung reaksi, batang pengaduk, spatel, sendok tanduk, timbangan analitik (ACIS), alat penggiling, mikroskop cahaya, kaca objek, *deck glass*, bejana kromatografi, kertas saring, kertas kromatografi 3 CHR (Whatman), peralatan kolom kromatografi vakum, *vortex-mixer* (VM-2000), dan inkubator 37°C (Memmert).

3.4 Cara kerja

3.4.1 Penyiapan bahan

Penyiapan bahan simplisia melalui berbagai tahap. Tahap pertama adalah pengumpulan bahan baku. Bahan baku berupa daun cincau hijau rambat (*Cyclea barbata* Miers.) segar yang telah berumur 6 bulan setelah penanaman diambil dari kebun Balitro di Cimanggu dan Parung, Bogor sebanyak 10 kg. Tahap kedua adalah sortasi basah dengan cara manual. Tahap ketiga adalah pencucian yang dilakukan dengan air mengalir. Dilanjutkan tahap keempat, yaitu perajangan. Tahap kelima adalah pengeringan. Pengeringan rajangan dilakukan di tempat terbuka, pada tampah yang ditutupi oleh kain hitam yang terlindung dari sinar matahari secara langsung. Pengeringan ini dilakukan dari jam 07.00 sampai jam 12.00 selama 5 hari, dilanjutkan dengan oven pada suhu 50°C selama 1 jam. Tahap terakhir adalah penggilingan. Penggilingan rajangan serta pengayakan dilakukan hingga didapat serbuk simplisia yang diinginkan, yaitu serbuk 40 mesh (serbuk agak kasar) sebanyak 850 g.

3.4.2 Ekstraksi

Serbuk kering simplisia sebanyak 850 g dimasukkan ke dalam bejana dan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat. Pertama, serbuk simplisia diekstraksi dengan pelarut n-heksana

menggunakan *shaker*. Proses ekstraksi diulang sebanyak 6 kali. Ampas dipisahkan dari filtrat dengan penyaring. Selanjutnya filtrat dipekatkan. Kedua, ampas hasil ekstraksi pertama dimaserasi dengan pelarut etil asetat. Proses maserasi kedua juga diulang sebanyak 6 kali. Ketiga, ampas hasil ekstraksi kedua dimaserasi dengan pelarut metanol dan diulang sebanyak 6 kali.

Setiap proses maserasi menggunakan pelarut sebanyak 4 liter dengan pengocokan selama 6 jam dan didiamkan selama 18 jam setelah pengocokan. Hasil maserasi tersebut adalah ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol. Kemudian masing-masing ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan penguap putar pada suhu 50°C hingga didapat ekstrak kental. Selanjutnya, masing-masing ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap bobot simplisia awal.

3.4.3 Uji pendahuluan aktivitas antioksidan secara kualitatif

Sebelum melakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH secara kuantitatif, perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif, baik untuk ekstrak, maupun untuk fraksi. Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 1 mg/ml. Kemudian larutan ekstrak diperlakukan dengan dua cara. Cara pertama penotolan dilakukan pada kertas kromatografi Whatman dengan penyemprot DPPH 100 µg/ml tanpa dielusi. Cara kedua, sebanyak 5 µl dari masing-masing ekstrak ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄, yang telah dielusi dengan fase gerak tertentu. Selanjutnya lempeng yang telah ditotolkan disemprot dengan larutan DPPH dalam metanol dengan konsentrasi 100 µg/ml. Lempeng dibiarkan beberapa menit, kemudian amati bercak yang timbul pada lempeng. Bercak berwarna kuning atau putih dengan latar belakang ungu menunjukkan adanya komponen aktif yang menghambat radikal bebas DPPH (Sarker, Latif, dan Gray, 2006).

3.4.4 Uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH

Pada masing-masing ekstrak dari daun cincau hijau rambat (ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol) diuji aktivitas antioksidan dengan metode Blois. Nilai IC₅₀ dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi.

3.4.4.1 Pembuatan larutan DPPH

Sejumlah 10 mg DPPH (BM=394,32) ditimbang dan dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan DPPH 100 µg/ml, lalu disimpan dalam botol gelap. Untuk setiap pengujian, larutan DPPH harus dibuat baru.

3.4.4.2 Optimasi panjang gelombang DPPH

Spektrum serapan larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 100 µg/ml diukur dengan menggunakan spektrofotometer *double beam* pada panjang gelombang 400 nm hingga 800 nm, lalu ditentukan panjang gelombang optimumnya.

3.4.4.3 Pembuatan larutan blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 1,0 ml metanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH 100 µg/ml, lalu ditambahkan 2,0 ml metanol dikocok hingga homogen. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

3.4.4.4 Penyiapan larutan kuersetin sebagai pembanding

a. Pembuatan larutan induk

Sejumlah 10 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 ml dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan induk kuersetin 200 µg/ml.

b. Pembuatan larutan seri

Sebanyak 5,0 ml larutan induk kuersetin dipipet ke dalam labu ukur 10,0 ml dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan 100 µg/ml. Dari larutan kuersetin 100 µg/ml, dipipet 0,05; 0,1; 0,2; 0,25; dan 0,3 ml dan dimasukkan ke dalam labu 5,0 ml. Kemudian dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas,

dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 1, 2, 4, 5, dan 6 µg/ml.

c. Pengujian

Dari masing-masing larutan uji dipipet 1,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH 100 µg/ml, lalu ditambahkan 2,0 ml metanol p.a, dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimum.

3.4.4.5 Penyiapan larutan uji

a. Pembuatan larutan induk

Sejumlah 50 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50,0 ml dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan induk 1000 µg/ml.

b. Pembuatan larutan seri

Dari larutan induk 1000 µg/ml, dipipet 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; dan 3,0 ml dan dimasukkan ke dalam labu 5,0 ml. Kemudian dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400, dan 600 µg/ml.

c. Pengujian

Dari masing-masing larutan uji dipipet 1,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH 100 µg/ml, lalu ditambahkan 2,0 ml metanol p.a, dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimum.

3.4.4.6 Perhitungan

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

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorban blanko} - \text{absorban sampel}}{\text{absorban blanko}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan $y = A + Bx$, dimana x adalah konsentrasi bahan uji (µg/ml) dan y adalah presentase inhibisi rata-rata (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition*

Concentration 50% atau IC_{50} , yaitu konsentrasi bahan uji yang diperlukan untuk menangkan 50% radikal DPPH selama 30 menit (*operating time*) atau jeda waktu yang dibutuhkan oleh bahan uji untuk mereduksi radikal DPPH dengan sempurna. Setelah 30 menit akan didapatkan absorbansi yang konstan (Hertiani, Nihlati, dan Rohman, 2011).

3.4.5 Fraksinasi

Ekstrak yang memiliki IC_{50} terendah berdasarkan uji peredaman radikal DPPH selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom dipercepat. Untuk mengetahui eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik, terlebih dahulu diperiksa dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai macam perbandingan eluen. Terlebih dahulu 20 g ekstrak dilarutkan dengan sedikit pelarut yang sesuai, kemudian ditambahkan sedikit serbuk silika gel sehingga diperoleh serbuk kering yang homogen. Selanjutnya, pada pengerjaan kromatografi kolom dipercepat, fase diam yang dipilih menggunakan 120 g silika gel 60 H dan sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut mulai dari n-heksana-etil asetat dengan perbandingan eluen 100:0, 90:10, 80:20, 50:50, dan 20:80, dilanjutkan dengan etil asetat-metanol dengan perbandingan eluen 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, dan 0:100 sehingga didapatkan eluen-eluen dengan gradien kepolaran yang berbeda-beda.

Setiap eluat ditampung dalam vial 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 fraksi gabungan. Masing-masing fraksi gabungan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal DPPH yang sama seperti uji dengan ekstrak. Kemudian, identifikasi senyawa kimia dilakukan pada fraksi yang paling aktif.

3.4.6 Identifikasi golongan senyawa dengan reaksi kimia

3.4.6.1 Identifikasi alkaloid

Beberapa miligram ekstrak kental dilarutkan dalam 10 ml campuran aquades dan asam klorida 2 N (9:1), kemudian dipanaskan selama 2 menit di atas

penangas air. Selanjutnya didinginkan dan disaring. Filtrat yang didapatkan digunakan sebagai larutan percobaan yang selanjutnya dilakukan sebagai berikut:

- a. larutan percobaan diambil 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat LP, hasil positif dengan terbentuknya endapan coklat hitam,
- b. larutan percobaan diambil 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer LP, hasil positif dengan terbentuknya endapan putih,
- c. larutan percobaan diambil 1 ml kemudian ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorf LP, hasil positif dengan terbentuknya endapan jingga coklat (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

3.4.6.2 Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 10 ml metanol dan 5 ml petroleum eter, dikocok dan didiamkan. Diambil lapisan metanol, diuapkan pada suhu 40°C. Sisa larutan ditambahkan 5 ml etil asetat P, disaring, selanjutnya dilakukan sebagai berikut:

- a. larutan uji diambil 1 ml, diuapkan, lalu sisanya dilarutkan dalam 1-2 ml etanol (95%), kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 2 ml asam klorida 2 N dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes asam klorida P, jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
- b. larutan uji diambil 1 ml, diuapkan, lalu sisanya dilarutkan dalam 1 ml etanol (95%), kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida P. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.
- c. larutan uji diambil 1 ml, diuapkan, lalu sisanya dibasahkan dengan aseton, kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P, dipanaskan hati-hati di atas penangas air. Sisa yang didapatkan dicampur dengan 10 ml dietil eter P. Amati dengan sinar ultraviolet 366 nm, larutan berfluoresensi kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

3.4.6.3 Identifikasi terpenoid/sterol

Beberapa miligram ekstrak kental ditambahkan 5 ml dietil eter, kemudian diuapkan di dalam cawan penguap, ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat glasial dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif akan ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah-violet-biru (Farnsworth, 1966).

3.4.6.4 Identifikasi tanin

Beberapa miligram ekstrak kental dilarutkan dalam 5 ml air suling panas dan diaduk. Setelah dingin disentrifugasi dan bagian cairan didekantasi dan diberi larutan natrium klorida 10%, kemudian disaring. Filtrat sebanyak masing-masing 1 ml dikerjakan sebagai berikut:

- a. ditambahkan 3 ml larutan gelatin 10%, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih,
- b. ditambahkan 2 tetes larutan besi (III) klorida 1%, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau violet,
- c. ditambahkan 3 ml larutan natrium klorida-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan natrium klorida 10%), hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan (Farnsworth, 1966).

3.4.6.5 Identifikasi glikosida

Ekstrak ditambahkan dengan 15 ml HCl 10%, kemudian dipanaskan selama 10 menit dan disaring. Filtrat disari tiga kali, tiap kali dengan 5 ml dietil eter. Sari dikumpulkan dan ditambahkan natrium sulfat anhidrat, kemudian disaring sehingga didapat larutan uji. Larutan uji diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C, kemudian ditambahkan dengan 2 ml metanol dan diuapkan. Hasil penguapan dilarutkan dengan 1 ml aquades dan 8 tetes Mollisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 1 ml asam sulfat P. Hasil positif terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

3.4.6.6 Identifikasi saponin

Beberapa miligram ekstrak kental ditambahkan 10 ml aquades panas, kemudian didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N, buih tidak hilang (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b).

3.4.6.7 Identifikasi kuinon/ antrakuinon

Beberapa miligram ekstrak kental dilarutkan dengan 5 ml asam sulfat 2 N, dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Selanjutnya ditambahkan 10 ml benzen P, dikocok, dan didiamkan. Lapisan benzen dipisahkan, disaring, maka filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1 sampai 2 ml natrium hidroksida 2 N, kemudian didiamkan, lapisan air akan berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b; Farnsworth, 1966).

3.4.7 Identifikasi golongan senyawa dengan KLT

a. Identifikasi alkaloid

Identifikasi alkaloid untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen kloroform-metanol (85:15) dan menggunakan penyemprot Dragendorff LP. Hasil positif akan menunjukkan warna jingga-coklat (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

b. Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50), diambil lapisan atas, dan menggunakan penyemprot $AlCl_3$. Hasil positif akan menunjukkan warna kuning pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

c. Identifikasi terpenoid/ sterol

Identifikasi terpenoid/sterol untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen benzen-etil asetat (90:10) dan menggunakan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat. Hasil positif akan

menunjukkan warna biru kuat, hijau, merah, atau coklat pada cahaya tampak setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

d. Identifikasi tanin

Identifikasi tanin untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50) dan menggunakan penyemprot larutan FeCl_3 10%. Hasil positif akan menunjukkan warna hijau-kehitaman (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

e. Identifikasi saponin

Identifikasi saponin untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (50:10:40) dan menggunakan penyemprot larutan anisaldehyd-asam sulfat. Hasil positif akan menunjukkan warna biru, biru-ungu, atau kekuningan pada cahaya tampak setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

f. Identifikasi antrakuinon

Identifikasi antrakuinon untuk fraksi dilakukan dengan menggunakan KLT, dengan eluen etil asetat-metanol-aquades (100:17:13) dan menggunakan penyemprot larutan KOH. Hasil positif akan menunjukkan warna merah pada cahaya tampak atau flourosensi kuning di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984). Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan bahan

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Cyclea barbata* Miers.. Tanaman *Cyclea barbata* Miers. untuk penelitian ini diperoleh dari kebun Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) di Cimanggu dan Parung, Bogor pada bulan Januari dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, LIPI, Cibinong, Bogor (Lampiran 2). Determinasi dilakukan untuk mengetahui jenis dan kesesuaian tanaman yang dimaksud. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun dengan alasan untuk menghindari kerusakan tanaman. Adapun dasar dalam pemilihan tanaman uji adalah hasil penelitian terdahulu tentang pengaruh ekstrak daun cincau hijau *Cyclea barbata* L. Miers dan *Premna oblongifolia* Merr terhadap aktivitas enzim antioksidan dan pertumbuhan tumor kelenjar susu mencit C3H. Pada penelitian ini, diketahui seduhan serbuk daun cincau hijau rambat dapat memperbaiki berat hati dan aktivitas katalase mencit (Chalid, 2003). Sedangkan penelitian aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun cincau hijau rambat serta identifikasi golongan senyawa dari fraksi yang aktif belum dilakukan.

Serbuk simplisia daun *Cyclea barbata* Miers. yang diperoleh dari Balitro Bogor telah melalui berbagai tahap proses penyiapan serbuk simplisia sebagai berikut. Sepuluh kilogram daun *Cyclea barbata* Miers. segar yang dipetik pada usia enam bulan setelah penanaman disortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing lainnya yang masih menempel pada tanaman dengan cara manual. Setelah itu, daun yang telah disortasi dicuci dengan air yang mengalir untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang masih menempel.

Kemudian daun dirajang untuk mempermudah proses pengeringan. Pengeringan rajangan dilakukan di tempat terbuka, pada tampah yang ditutupi oleh kain hitam, terlindung dari sinar matahari secara langsung. Pengeringan ini dilakukan dari jam 07.00 sampai jam 12.00 selama 5 hari, dilanjutkan dengan oven pada suhu 50°C selama 1 jam. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam simplisia sehingga simplisia tidak cepat rusak dan busuk. Sedangkan pengeringan

yang dilakukan tidak dengan cahaya matahari langsung bertujuan agar senyawa yang dapat rusak akibat pemanasan langsung dapat terlindungi. Setelah pengeringan, rajangan digiling dan diayak dengan ayakan 40 mesh (serbuk agak kasar) agar derajat kehalusan serbuk simplisia seragam. Serbuk simplisia tidak boleh terlalu halus karena akan menyebabkan pelarut sulit masuk pada bagian antara serbuk. Untuk mencegah kerusakan atau penurunan mutu simplisia, serbuk simplisia disimpan dalam wadah bersih, kering, dan terlindung dari cahaya. Sedangkan untuk memastikan keasliannya, telah dilakukan identifikasi mikroskopik terhadap serbuk simplisia daun *Cyclea barbata* Miers. Hasil identifikasi mikroskopik menunjukkan serbuk simplisia yang diperoleh dari Balitro memiliki fragmen rambut penutup bersel tunggal berbentuk kerucut, fragmen epidermis atas, fragmen epidermis bawah, parenkim, dan berkas pembuluh. Fragmen yang diperoleh juga telah dibandingkan dengan gambar yang ada dalam *Materia Medica* jilid V (Gambar 4.1-4.4).

4.2 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang kepolarannya meningkat. Metode maserasi dipilih untuk menghindari kerusakan kandungan kimia tanaman yang tidak tahan panas. Maserasi diulang beberapa kali agar terjadi proses ekstraksi yang optimal di mana seluruh senyawa dapat diekstraksi. Pada saat ekstraksi, digunakan pelarut yang kepolarannya semakin meningkat, yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Ketiga pelarut tersebut dipilih untuk dapat memisahkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan kepolarannya sehingga akan memudahkan penapisan fitokimia. Pelarut n-heksana digunakan untuk menarik senyawa-senyawa nonpolar seperti triterpenoid, steroid, pigmen, dan lemak. Pelarut etil asetat seharusnya dapat menarik senyawa-senyawa semipolar seperti klorofil, aglikon flavonoid, dan asam fenolat bebas. Sedangkan pelarut metanol digunakan untuk menarik senyawa-senyawa seperti alkaloid, kumarin, heterosida flavonoid, tanin, glikosida, saponin, dan senyawa polar lainnya.

Sejumlah 850 gram serbuk kering daun *Cyclea barbata* Miers. dimaserasi dengan pelarut n-heksana sebanyak 3 liter yang telah didestilasi. Maserasi

dilakukan selama tujuh hari dengan enam kali pengulangan maserasi. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana yang berwarna coklat. Terhadap ampas n-heksana dilakukan kembali maserasi berturut-turut dengan 4 liter etil asetat yang telah didestilasi. Maserasi dilakukan selama tujuh hari dengan enam kali pengulangan maserasi. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat yang berwarna hijau kehitaman. Kemudian terhadap ampas etil asetat dilakukan kembali maserasi berturut-turut dengan 4 liter metanol yang telah didestilasi. Maserasi dilakukan selama tujuh hari dengan enam kali pengulangan maserasi. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental metanol yang berwarna coklat kehitaman. Lalu masing-masing ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap berat simplisia awal. Berat ekstrak dari masing-masing ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol diperoleh berturut-turut adalah 20 g, 42,6 g dan 102,6 g (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Data rendemen ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers.

No.	Ekstrak	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen Ekstrak (%)
1.	n-Heksana	20,0	2,35
2.	Etil asetat	42,6	5,01
3.	Metanol	102,6	12,07

4.3 Penapisan fitokimia ekstrak

Ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol diidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang ada di dalamnya. Hasil identifikasi golongan senyawa ekstrak *Cyclea barbata* Miers. diperlihatkan pada Tabel 4.2. berikut:

Tabel 4.2. Hasil penapisan fitokimia dari ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers.

No.	Golongan senyawa	Ekstrak n-heksana	Ekstrak etil asetat	Ekstrak metanol
1.	Alkaloid	-	+	+
2.	Flavonoid	-	+	+
3.	Terpenoid/sterol	+	+	+
4.	Tanin	-	-	+
5.	Glikosida	-	-	+
6.	Saponin	-	-	+
7.	Antrakuinon	-	-	-

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi

4.3.1 Alkaloid

Pada Tabel 4.4, terlihat bahwa ekstrak kental yang terdeteksi mengandung senyawa alkaloid adalah ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol. Umumnya, senyawa alkaloid ditemukan dalam bentuk garam yang bersifat larut air di dalam tanaman. 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 dalam suasana asam yaitu aquades dan HCl 2 N dengan perbandingan 1:9. Setelah dimurnikan, larutan diuji dengan pereaksi Mayer, Dragendorf, dan Bouchardart. Larutan uji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorf akan membentuk senyawa adisi yang tidak larut berupa endapan. sedangkan dengan pereaksi Bouchardat akan membentuk senyawa kompleks bebas yang terlihat sebagai endapan coklat kehitaman (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995b). Berdasarkan tabel 4.4, terlihat bahwa ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol terdeteksi positif terhadap ketiga reaksi tersebut. Perlu diketahui bahwa kepekaan alkaloid terhadap jenis pereaksi yang diperiksa dan atau kuantitas kandungan senyawa alkaloid dalam tanaman tersebut juga dapat mempengaruhi hasil reaksi.

4.3.2 Flavonoid

Pada pengujian flavonoid, terlebih dahulu dilakukan pemisahan senyawa flavonoid dari ikatan glikosida dengan cara menghidrolisis ekstrak menggunakan HCl 2 N. Akibat terpisahnya glikosida, senyawa flavonoid menjadi lebih reaktif.

Senyawa flavonoid dipisahkan menggunakan etil asetat. Kemudian pengujian flavonoid dilakukan dengan ketiga pereaksi yaitu dengan serbuk Zn, serbuk Mg, dan serbuk asam borat-asam oksalat. Dengan penambahan serbuk logam, maka logam ini akan bereaksi dengan senyawa flavonoid membentuk gelembung-gelembung H_2 dan garam fenolat yang akan menyebabkan timbulnya warna pada larutan ekstrak (Robinson, 1995).

Pada Tabel 4.5, dapat terlihat bahwa ekstrak kental yang mengandung senyawa flavonoid adalah ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol, meskipun warna yang dihasilkan tidak seintensif ekstrak standar yang digunakan, yaitu ekstrak metanol daun kumis kucing. Hal ini mungkin disebabkan karena flavonoid yang terkandung dalam daun *Cyclea barbata* Miers. tidak larut dalam etil asetat atau kuantitas senyawa yang diuji tidak memenuhi batas deteksi dari metode yang digunakan. Untuk memperoleh hasil yang akurat, cara terbaik untuk memisahkan dan mengidentifikasi golongan flavonoid sebaiknya menggunakan metode kromatografi lapis tipis (Harborne, 1987).

4.3.3 Terpenoid

Sesuai dengan strukturnya, terpenoid pada umumnya merupakan senyawa yang larut dalam lipid dan berada dalam sitoplasma sel tumbuhan. Oleh karena itu, ekstraksi senyawa terpenoid dari jaringan tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut petroleum eter, dietil eter, atau kloroform (Harborne, 1987).

Pada penapisan ini, senyawa terpenoid ditarik dengan menggunakan pelarut dietil eter, yang kemudian diuji dengan reaksi Liebermann-Burchard. Hasil pengujian pada Tabel 4.6 menunjukkan ketiga ekstrak memiliki kandungan terpen dengan menghasilkan warna hijau kebiruan.

4.3.4 Tanin

Berdasarkan Tabel 4.7, ekstrak kental yang mengandung senyawa tanin hanyalah ekstrak metanol, sedangkan pada kedua ekstrak lainnya tidak terdeteksi mengandung senyawa tanin. Hal ini mungkin disebabkan karena kuantitas senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut dan atau beberapa faktor lain

yang mempengaruhi seperti umur tanaman, iklim, daerah tumbuh, dan waktu pengumpulan bahan (panen).

Telah diketahui bahwa tanin merupakan senyawa fenol yang dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Ekstrak uji yang ditetaskan dengan gelatin 10% akan membentuk endapan putih atau adanya perubahan warna yang lebih keruh pada larutan uji. Endapan putih atau adanya perubahan warna yang lebih keruh tersebut menunjukkan hasil positif terhadap senyawa tanin. Larutan uji yang ditetaskan NaCl-gelatin 1% menghasilkan endapan yang lebih banyak dibandingkan dengan gelatin saja. Hal ini disebabkan karena NaCl pada pereaksi tersebut dapat mengakibatkan penjenuhan dan terjadinya proses *salting out* sehingga endapan yang dihasilkan lebih banyak. Larutan FeCl_3 pada pengujian tanin dapat membedakan tanin terhidrolisis (galotanin) dan tanin terkondensasi (proantosianidin). Pada tanin terhidrolisis, larutan akan berubah warna menjadi biru atau biru kehitaman, sedangkan pada tanin terkondensasi berubah menjadi hijau tua. Berdasarkan uji dengan larutan FeCl_3 ini, ekstrak metanol daun *Cyclea barbata* Miers. terdeteksi mengandung tannin terhidrolisis.

4.3.5 Glikosida

Pengujian glikosida dilakukan dengan terlebih dahulu menghidrolisis senyawa tersebut dengan asam klorida 10% dan pemanasan. Saat glikosida terhidrolisis, molekul akan terpecah menjadi gugus glikon dan aglikon. Keduanya terhubung oleh suatu ikatan glikosidik berupa jembatan O, jembatan S, jembatan N, dan jembatan C. Jembatan antara glikon dan aglikon sangat mudah terurai oleh pengaruh asam, basa, enzim, air, dan panas. Semakin pekat kadar asam atau basa, maupun semakin panas lingkungannya, glikosida akan semakin mudah dan cepat terhidrolisis (Harborne, 1987).

Dalam bentuk glikosida, senyawa ini larut dalam pelarut polar seperti air, tetapi jika telah terurai menjadi aglikonnya, senyawa tersebut larut dalam pelarut organik nonpolar. Untuk menarik senyawa yang bukan gula, dilakukan penyarian dengan dietil eter sebanyak tiga kali. Penyarian ini juga untuk mempermudah

pengamatan dengan memisahkan pengotor-pengotor yang bersifat nonpolar (Harborne, 1987).

Setelah dilakukan penyarian, diperoleh larutan uji yaitu filtrat HCl untuk uji bagian gula. Filtrat HCl diuapkan dan ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengurangi kadar air yang tersisa di dalamnya. Filtrat kering yang didapatkan dilarutkan dengan metanol dan diuapkan kembali. Setelah diuapkan, filtrat dilarutkan dengan aquades dan diuji dengan pereaksi Mollisch. Reaksi positif ditandai dengan munculnya cincin ungu di permukaan antara lapisan asam dan lapisan sampel.

Hasil yang terlihat pada Tabel 4.8, menunjukkan bahwa filtrat HCl dari ekstrak metanol saja yang terdeteksi mengandung glikosida. Hal yang harus diperhatikan adalah banyaknya jumlah ekstrak untuk pengujian. Semakin banyak ekstrak yang diuji, semakin pekat warna cincin ungu yang dihasilkan dan semakin sulit pengamatan. Warna yang terlalu pekat akan seperti mendekati warna hitam sehingga sebaiknya jumlah ekstrak yang diuji tidak berlebihan.

4.3.6 Saponin

Berdasarkan Tabel 4.9, ekstrak kental yang mengandung saponin adalah ekstrak metanol. Tingginya buih yang terbentuk adalah 1,2 cm dan tidak hilang setelah penambahan HCl 2 N dan stabil dalam waktu lebih dari 10 menit sehingga disimpulkan hasil positif terhadap saponin.

Telah diketahui golongan senyawa saponin mempunyai beberapa sifat yang dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang metode penapisannya yang sederhana. Sifat-sifat tersebut antara lain dapat menghasilkan busa setelah pengocokan yang kuat, kemampuan untuk menghemolisis sel darah merah, dan bersifat racun terhadap ikan (Robinson, 1995). Metode yang paling sederhana, cepat, dan sedikit peralatan yang dibutuhkan adalah dengan menggunakan indeks buih/busa. Reaksi identifikasi ini akan memberikan lapisan buih setinggi 1 cm atau lebih bila larutan uji ditambah air dan dikocok dalam tabung reaksi selama 10-15 detik dan selanjutnya dibiarkan selama 10 menit sebelum dilakukan pengamatan. Penambahan 1 tetes asam klorida 2 N yang tidak menghilangkan buih menunjukkan hasil positif terhadap saponin.

4.3.7 Antrakuinon

Berdasarkan Tabel 4.10, dapat terlihat bahwa tidak ada ekstrak yang terdeteksi mengandung antrakuinon. Antrakuinon di alam kemungkinan dalam bentuk bebas, glikosida, atau antron, bentuk tereduksinya. Untuk mengidentifikasi antrakuinon, perlu ditambahkan asam sulfat 2 N dan dipanaskan terlebih dahulu untuk menghidrolisis antrakuinon yang berada dalam bentuk glikosidanya. Kemudian dilakukan pengujian terhadap senyawa antrakuinon.

4.4 Uji aktivitas antioksidan ekstrak

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah dengan mengukur kemampuan ekstrak dalam peredaman radikal bebas DPPH dengan menggunakan spektrofotometer *uv-vis*. Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur daya penangkapan radikal bebas adalah 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan. Jika disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik akan stabil selama bertahun-tahun (Yu, 2008).

Sebelum dilakukan uji aktivitas kuantitatif dengan spektrofotometer, dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan pereaksi semprot DPPH. Uji pendahuluan secara kualitatif dilakukan dengan cara menotolkan larutan sampel dari tiap ekstrak dan larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/ml pada sebidang kertas kromatografi Whatman, kemudian disemprot dengan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml. Uji pendahuluan ini dilakukan untuk memperkirakan ekstrak mana yang memiliki aktivitas antioksidan. Bercak berwarna kuning atau putih dengan latar belakang berwarna ungu menunjukkan adanya komponen aktif yang menghambat radikal bebas DPPH (Sarker, Latif, dan Gray, 2006). Hasil uji pendahuluan ini menunjukkan ketiga ekstrak menimbulkan bercak berwarna kuning dengan latar belakang berwarna ungu dengan intensitas yang berbeda (Gambar 4.5).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer *uv-vis double beam* dengan mengukur inhibisi

konsentrasi yang sebanding dengan kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas DPPH. Langkah pertama dilakukan optimasi panjang gelombang DPPH. Berdasarkan penelusuran literatur panjang gelombang optimal dari DPPH antara 515-517 nm. Setelah dilakukan optimasi, didapatkan DPPH memiliki panjang gelombang optimum sebesar 517 nm (Gambar 4.6). Oleh sebab itu, pengukuran serapan ekstrak diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari larutan metanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh senyawa penghambat radikal bebas. Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan kepada larutan reagen DPPH. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi efektif (*Effective Concentration*), EC_{50} atau IC_{50} (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar dan Lakshman, 2005).

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 72,57 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan sedang dengan nilai IC_{50} 114,20 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan ekstrak n-heksana menunjukkan aktivitas antioksidan lemah dengan nilai IC_{50} 229,92 $\mu\text{g/ml}$. Sebagai pembanding, digunakan kuersetin yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 1,39 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4.11).

Perubahan warna dari ungu menjadi kuning terjadi ketika elektron tidak berpasangan menjadi berpasangan dengan suatu radikal hidrogen dari suatu antioksidan penangkap radikal bebas menjadi bentuk DPPH-H (Prakash, Rigelhof, dan Millers, 2001). Sedangkan yang terukur pada panjang gelombang 517 nm adalah sisa radikal DPPH berwarna ungu yang tidak bereaksi dengan senyawa antioksidan selama waktu inkubasi (30 menit).

4.5 Fraksinasi

Setelah mengetahui ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbesar adalah ekstrak metanol dengan nilai IC_{50} 72,57 $\mu\text{g/ml}$, maka ekstrak metanol difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dipercepat dengan bantuan pompa vakum. Cara ini dipilih karena dianggap efisien untuk menghasilkan pemisahan

yang baik dengan proses yang cepat. Fraksinasi dilakukan terhadap 20 g ekstrak metanol menggunakan eluen dengan tingkat kepolaran semakin meningkat, yaitu n-heksana-etil asetat dengan perbandingan eluen 100:0, 90:10, 80:20, 50:50, dan 20:80, dilanjutkan dengan etil asetat-metanol dengan perbandingan eluen 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, dan 0:100. Dari hasil fraksinasi ini, diperoleh 16 fraksi yang kemudian dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan eluen heksan-etil asetat-metanol (3:6:1).

Fraksi yang memiliki kesamaan pola pada kromatogram KLT digabung. Bercak yang timbul pada lempeng KLT diamati baik secara langsung, maupun di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Lempeng KLT juga diamati setelah disemprot menggunakan pereaksi semprot H₂SO₄ dalam metanol dan telah dipanaskan di atas *hot plate*. Penggabungan fraksi menghasilkan 6 fraksi gabungan, yaitu fraksi A (gabungan fraksi 1-2), fraksi B (gabungan fraksi 3-5), fraksi C (gabungan fraksi 6-7), fraksi D (gabungan fraksi 8-9), fraksi E (gabungan fraksi 10-13), dan fraksi F (gabungan fraksi 14-16). Masing-masing fraksi tersebut diuji aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal DPPH yang sama seperti uji dengan ekstrak. Kemudian identifikasi senyawa kimia dilakukan pada fraksi yang paling aktif.

4.6 Uji aktivitas antioksidan fraksi teraktif

Sama seperti uji aktivitas antioksidan yang dilakukan pada ekstrak, sebelum dilakukan uji aktivitas kuantitatif dengan spektrofotometer, dilakukan uji kualitatif terhadap fraksi dengan menggunakan pereaksi semprot DPPH. Uji pendahuluan secara kualitatif dilakukan dengan cara menotolkan larutan sampel dari tiap fraksi dan larutan standar kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/ml pada sebidang kertas kromatografi Whatman, kemudian disemprot dengan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml. Uji pendahuluan ini dilakukan untuk memperkirakan ekstrak mana yang memiliki aktivitas antioksidan. Bercak berwarna kuning atau putih dengan latar belakang berwarna ungu menunjukkan adanya komponen aktif yang menghambat radikal bebas DPPH (Sarker, Latif, dan Gray, 2006). Hasil uji pendahuluan ini menunjukkan keenam fraksi menimbulkan

bercak berwarna kuning dengan latar belakang berwarna ungu dengan intensitas yang berbeda (Gambar 4.7).

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer *uv-vis double beam* dengan mengukur inhibisi konsentrasi yang sebanding dengan kemampuan fraksi dalam meredam radikal bebas DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan fraksi E memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat di antara keenam fraksi yang diuji dengan nilai IC_{50} sebesar 20,13 $\mu\text{g/ml}$ (Tabel 4.12). Setelah itu, fraksi E diuji aktivitas antioksidan kembali menggunakan KLT. Hal ini bertujuan untuk mengetahui Rf bercak yang memberikan hasil positif uji antioksidan. Eluen yang digunakan adalah n-heksana-diklormetan-metanol (20:35:45). Kemudian disemprot dengan larutan penampak noda H_2SO_4 dalam metanol. Hasilnya didapat 4 bercak pada lempeng dengan Rf masing-masing 0,26; 0,58; 0,67; dan 0,89. Setelah disemprot dengan larutan DPPH, ada 2 bercak yang menimbulkan warna kuning dengan latar belakang warna ungu, yaitu bercak yang memiliki Rf 0,58; dan 0,67 (Gambar 4.8a). Setelah diidentifikasi golongan senyawa pada kedua bercak tersebut dengan berbagai pereaksi semprot, bercak yang memiliki Rf 0,58 terdeteksi sebagai senyawa alkaloid (dengan penyemprot Dragendorf) dan bercak yang memiliki Rf 0,67 terdeteksi sebagai senyawa flavonoid (dengan penyemprot AlCl_3). Keterangan selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.8b-4.8c.

4.7 Penapisan fitokimia fraksi teraktif

Setelah fraksi E diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat, penapisan fitokimia dilakukan terhadap fraksi tersebut. Karena bobot fraksi yang sedikit, maka tidak memungkinkan untuk melakukan *spot test* terhadap fraksi sebagaimana yang dilakukan terhadap ekstrak. Oleh karena itu, penapisan fitokimia terhadap fraksi E dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan pereaksi semprot dan eluen yang berbeda di tiap golongan senyawa, kecuali untuk identifikasi golongan senyawa glikosida.

Untuk identifikasi senyawa alkaloid digunakan eluen kloroform-metanol (85:15) dengan pereaksi semprot Dragendorf. Hasilnya fraksi E terdeteksi mengandung alkaloid, ditunjukkan dengan 1 bercak berwarna jingga dengan Rf

0,55. Untuk identifikasi senyawa flavonoid digunakan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50) dengan pereaksi semprot AlCl_3 . Hasilnya fraksi E terdeteksi mengandung flavonoid, ditunjukkan dengan 2 bercak berfluorosensi kuning pada panjang gelombang 366 nm dengan Rf 0,48 dan 0,56. Untuk identifikasi senyawa terpenoid digunakan eluen benzen-etilasetat (90:10) dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat. Hasilnya fraksi E tidak terdeteksi mengandung terpen, karena tidak ada bercak yang berwarna biru-violet.

Untuk identifikasi senyawa tanin digunakan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades 40:10:50 dengan pereaksi semprot FeCl_3 10 %. Hasilnya fraksi E terdeteksi mengandung tanin, ditunjukkan dengan 1 bercak berwarna kehitaman dengan Rf 0,19. Untuk identifikasi senyawa saponin digunakan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades 50:10:40 dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat. Hasilnya fraksi E terdeteksi mengandung saponin, ditunjukkan dengan 1 bercak berwarna ungu dengan Rf 0,65. Untuk identifikasi senyawa antrakuinon digunakan eluen etil asetat-metanol-aquades 100:17:13 dengan pereaksi semprot KOH. Hasilnya fraksi E tidak terdeteksi mengandung terpen, karena tidak ada bercak yang berwarna merah. Sedangkan untuk identifikasi senyawa glikosida digunakan pereaksi Mollisch. Hasilnya fraksi E membentuk cincin ungu. Pengujian dilakukan menggunakan kontrol positif dengan ekstrak tanaman pembanding yang sudah terbukti memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder. Hasil dari penapisan fitokimia tersebut menunjukkan fraksi E mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, glikosida, dan saponin (Tabel 4.3). Hasil selengkapnya dapat dilihat di Gambar 4.9-4.14.

Tabel 4.3. Hasil penapisan fitokimia dari fraksi teraktif (Fraksi E)

No.	Golongan Senyawa	Fraksi E
1.	Alkaloid	+
2.	Flavonoid	+
3.	Terpenoid/sterol	-
4.	Tanin	+
5.	Glikosida	+
6.	Saponin	+
7.	Antrakuinon	-

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi

Universitas Indonesia

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

- a. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol dari daun *Cyclea barbata* Miers. menunjukkan nilai IC_{50} berturut-turut 229,92; 114,20 dan 72,57 $\mu\text{g/ml}$, dengan aktivitas antioksidan paling kuat diberikan oleh ekstrak metanol. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi A, B, C, D, E, dan F dari ekstrak metanol menunjukkan nilai IC_{50} berturut-turut 277,70; 396,08; 35,04; 37,55; 20,13; dan 26,99 $\mu\text{g/ml}$, dengan aktivitas antioksidan paling kuat diberikan oleh fraksi E.
- b. Hasil identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif, yaitu fraksi E terdeteksi mengandung senyawa alkaloid, polifenol, glikosida, dan saponin. Sedangkan golongan senyawa yang memberikan hasil positif antioksidan terdeteksi sebagai senyawa alkaloid dan flavonoid.

5.2 Saran

- a. Untuk mendukung data penelitian ini, hendaknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi senyawa aktif dari daun *Cyclea barbata* Miers. yang memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji khasiat lain dari tanaman *Cyclea barbata* Miers. baik secara *in vitro*, maupun secara *in vivo*.

DAFTAR ACUAN

- Akagawa, M. dan Suyama, K. (2001). Amine Oxidase Like Activity of Polyphenols. *Jurnal Biochemistry*, 268: 1953–1963.
- Andarwulan, N., Wijaya, C.H., dan Cahyono, D.T.. (1996). Aktivitas Antioksidan dari Daun Sirih (Piper betle L). *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, Vol. VII, No 1: 29–37.
- Angelina, M., Hartati, S., Dewijanti, I.D., Banjarnahor, S.D.S., dan Meilawati, L. (2008). Penentuan LD50 Daun Cinco (*Cyclea Barbata* Miers.) pada Mencit. *Makara, Sains*, Vol.12, No.1: 23–26.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., dan Çelik, S.E. (2007). Mechanism Of Antioxidant Capacity Assays and The CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*, Vol.160, no.4, 413–419.
- Benzie, I.F.F., dan Strain, J.J. (1996). Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70–76.
- Chalid, Sri Yadi. (2003). Pengaruh Ekstrak Cincau Hijau *Cyclea barbata* L.Miers terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Katalase pada Mencit C3H Bertumor Kelenjar Susu. *Tesis*, Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, 37–41.
- Choi, H.S., *et al.* (2000). Anti-inflammatory Effects of Fangchinoline and Tetrandrine. *Journal of Ethnopharmacology* 69: 173–179.
- Cos, P., *et al.* (2001). Cytotoxicity and Lipid Peroxidation-Inhibiting Activity of Flavonoids. *Planta Medica* 67: 515–519.
- De Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N., dan Lemmens, R.H.M.J. (eds.). (1999). *PROSEA: Plant Resources of South-East Asia 12 (1) Medicinal and Poisonous Plants 1*. Bogor: PROSEA Foundation, 219–222.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1989). *Materia Medika Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 172–176.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia*. Ed. Ke-4. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 7; 1006–1008; 1061.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, x; 333–337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 9–31.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia I*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 162–165; 172.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2010). *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 003/Menkes/Per/I/2010 tentang Sainifikasi Jamu dalam Penelitian Berbasis Pelayanan Kesehatan*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1–15.
- Djam'an, Qathrunnada. (2008). Pengaruh Air Perasan Daun *Cyclea Barbata* Miers (Cincau Hijau) terhadap Konsentrasi HCl Lambung dan Gambaran Histopatologik Lambung Tikus Galur Wistar yang Diinduksi Acetylsalicylic Acid. *Tesis*, Semarang: Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, 20; 23.
- Dreher, F. dan Maibach, H. (2001). Protective Effects of Topical Antioxidants in Humans. *Curr Probl Dermatol* 29: 157–164.
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, 255–276.
- Gritter, R.J., Bobbitts, J.M., dan Schwarting, A.E. (1991). *Pengantar Kromatografi*. Ed. ke-2. (K. Padmawinata, penerjemah). Bandung: Penerbit ITB, 108; 114–115.
- Gurav, S. (2007). Free Radical Scavenging Activity of *Polygala Chinensis* Linn. *Pharmacologyonline*, 2: 245–253.
- Hanggono, Tri. (2011). *Biotechnology Enhancement for Toipical Biodiversity*. <http://www.unpad.ac.id/archives/36173>. [23 Januari 2012, pukul 11.41].
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB, 69; 102; 109; 123; 234.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 19–22; 205; 212.

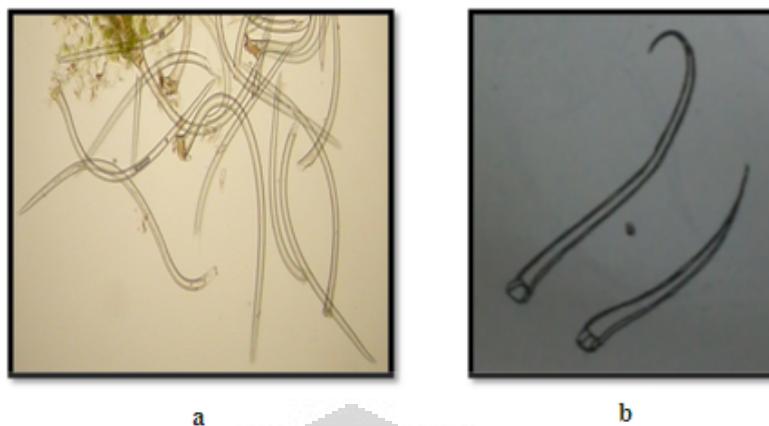
- Hertiani, T., Nihlati A., I., dan Rohman, A. (2008). Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci [*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlechth] dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*, Vol.13, No. 45.
- Kikuzaki, K. and Nakatani, N. (1993), Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents, *Journal of Food. Sci.*, 58(6), 1407–1410.
- Kuncahyo, S.I. (2007). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil. *Seminar Nasional Teknologi 2007*, E1–E9.
- Lopez-Alarcon, C., Lissi, E. (2006). A Novel and Simple ORAC Methodology Based On The Interaction of Pyrogallol Red with Peroxyl Radicals. *Free Rad Res*, 40 (9), 979–985.
- Middleton JR., E., Kandaswami, C., dan Theoharides, T.C. (2000). The Effect of Plant Flavonoids on Mamalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease & Cancer. *Pharmacological Reviews* 52 (4): 711–722.
- Prakash, A., Rigelhof, F., dan Millers, E. (2001). Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, Vol.19, No. 2.
- Purbandari, R. dan Juniarto, A.Z. (2010). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun *Cyclea Barbata* L. Miers terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit Balb/C Jantan yang Dipapar Asap Rokok. *Laporan Akhir Hasil Penelitian*, Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Bandung: ITB, 156–158; 209–213.
- Roosita, K., Kusharto, C.M., Sekiyama, M., Fachrurozi, Y., dan Ohtsuka, R. (2008). Medicinal Plants Used by The Villagers of a Sundanese Community in West Java, Indonesia. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 72–81.
- Sarker, S.D., Latif, Z., dan Gray, A.I. (eds.). (2006). *Natural Product Isolation* Ed. Ke-2. New Jersey: Humana Press, 7–8; 20.
- Shivappasad, H. N., Mohan, S., Kharya, M.D., Shiradkar, M.R., dan Lakshman, K. (2005). *In-Vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation: A review*.

<http://www.pharmainfo.net/reviews/vitro-models-antioxidant-activity-evaluation-review>. [23 Januari 2012, pukul 14.27]

- Sunarni, T. (2005). Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa Kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2 (2) 2001: 53–61.
- Touchstone, J.C., dan Dobbins, M.F. (1983). *Practice of Thin Layer Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 22–38; 73; 103; 137; 163.
- Wagner, H., Bladt, S., dan Zgainski, E.M. (1984). *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*. New York: Springer-Verlag, 54; 164; 226; 299–301.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami & Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius, 11–23; 73–88.
- Yu, Liangli. (ed.). (2008). *Wheat Antioxidant*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 120; 125–126.

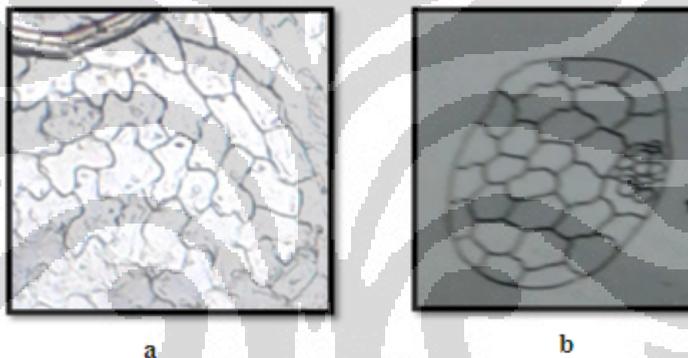


GAMBAR



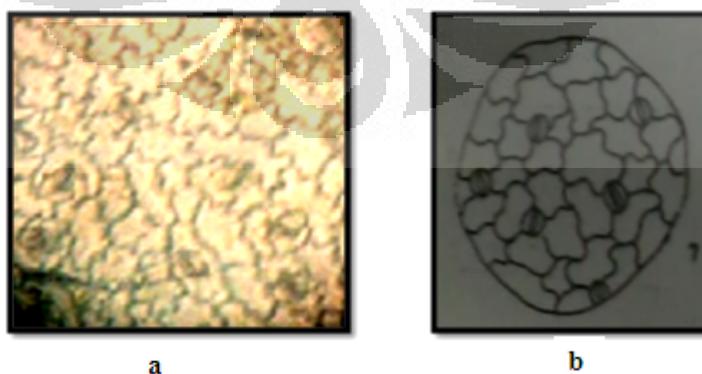
Keterangan: Fragmen pada gambar a dilihat dengan mikroskop cahaya, perbesaran 100x

Gambar 4.1.a. Fragmen rambut penutup serbuk daun *Cyclea barbata* Miers.;
b. Fragmen rambut penutup serbuk daun *Cyclea barbata* Miers. dari MMI V



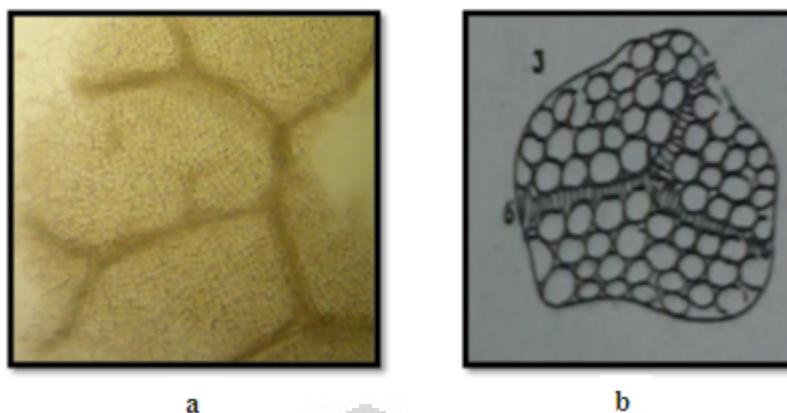
Keterangan: Fragmen pada gambar a dilihat dengan mikroskop cahaya, perbesaran 100x

Gambar 4.2.a. Fragmen epidermis atas serbuk daun *Cyclea barbata* Miers.;
b. Fragmen epidermis atas serbuk daun *Cyclea barbata* Miers. dari MMI V



Keterangan: Fragmen pada gambar a dilihat dengan mikroskop cahaya, perbesaran 100x

Gambar 4.3.a. Fragmen epidermis bawah serbuk daun *Cyclea barbata* Miers.;
b. Fragmen epidermis bawah serbuk daun *Cyclea barbata* Miers. dari MMI V



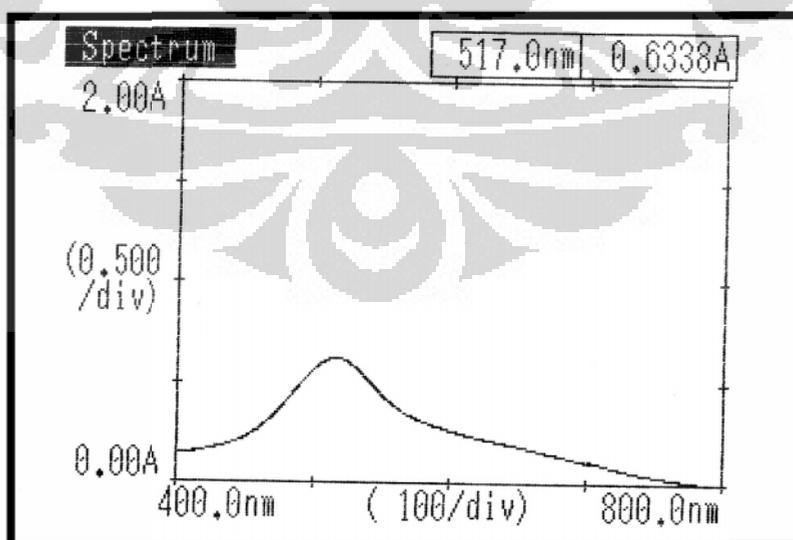
Keterangan: Fragmen pada gambar a dilihat dengan mikroskop cahaya, perbesaran 100x

Gambar 4.4.a. Fragmen parenkim dan berkas pembuluh serbuk daun *Cyclea barbata* Miers.; **b.** Fragmen parenkim dan berkas pembuluh serbuk daun *Cyclea barbata* Miers. dari MMI V

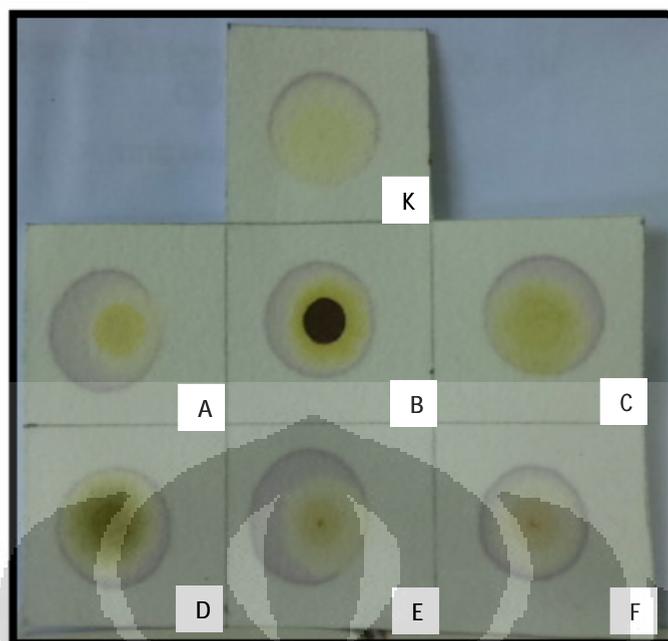


Keterangan: K. standar kuersetin; H. ekstrak n-heksana; E. ekstrak etil asetat; M. ekstrak metanol

Gambar 4.5. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers.

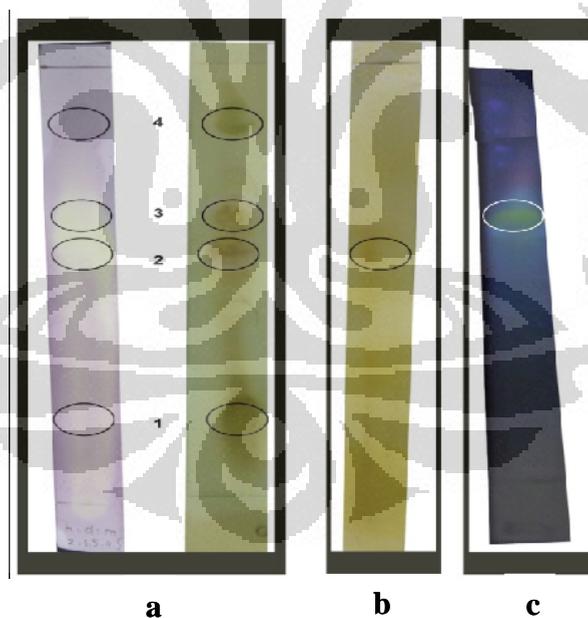


Gambar 4.6. Spektrum larutan DPPH 25 $\mu\text{g/ml}$ dalam metanol pada panjang gelombang optimum (517 nm)



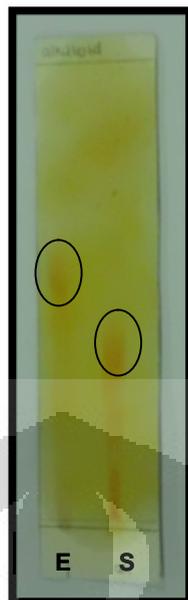
Keterangan: K. standar kuersetin; A-F. Fraksi A sampai F

Gambar 4.7. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan 6 fraksi dari ekstrak metanol



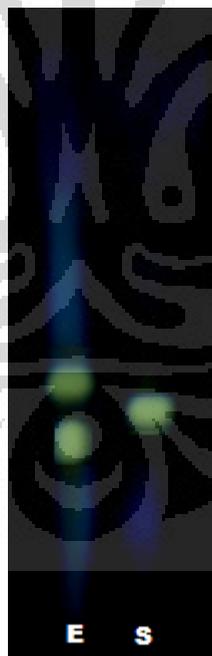
Keterangan: eluen yang digunakan n-heksana-diklormetan-metanol (20:35:45); a. 1. $R_f = 0,26$; 2. $R_f = 0,58$; 3. $R_f = 0,67$; 4. $R_f = 0,89$; menunjukkan hanya 2 bercak yang memiliki aktivitas antioksidan, yaitu bercak 2 dan 3; b. bercak 2 berwarna jingga (positif alakaloid); c. bercak 3 berfluorosensi kuning (positif flavonoid)

Gambar 4.8. a. Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan larutan DPPH (kiri) dan H_2SO_4 dalam metanol (kanan); **b.** Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorf; **c.** Profil KLT fraksi E setelah disemprot dengan pereaksi $AlCl_3$



Keterangan: E. Fraksi E, 1 bercak dengan Rf 0,55; S. pembeding Chinae Cortex; dengan eluen kloroform-metanol (85:15), dengan penyemprot Dragendorf menunjukkan hasil positif (jingga)

Gambar 4.9. Profil KLT uji alkaloid fraksi E



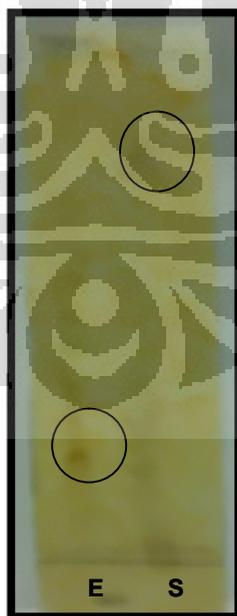
Keterangan: E. Fraksi E, 2 bercak dengan Rf 0,48 dan 0,56; S. pembeding Orthosiphonis Folium; dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50), dengan penyemprot AlCl₃ menunjukkan hasil positif (fluorosensi kuning pada panjang gelombang 366 nm)

Gambar 4.10. Profil KLT uji flavonoid fraksi E



Keterangan: E. Fraksi E, hasil negatif; S. pembanding Caryophilli Flos; dengan eluen benzenetilasetat (90:10), dengan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan hasil negatif (tidak berwarna biru-ungu)

Gambar 4.11. Profil KLT uji terpenoid fraksi E



Keterangan: E. Fraksi E, 1 bercak dengan Rf 0,19; S. pembanding Thea Folium; dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50), dengan penyemprot FeCl_3 menunjukkan hasil positif (kehitaman)

Gambar 4.12. Profil KLT uji tanin fraksi E



Keterangan: E. Fraksi E, 1 bercak dengan Rf 0,65; S. pembanding *Orthosiphonis Folium*; dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (50:10:40), dengan penyemprot anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan hasil positif (ungu)

Gambar 4.13. Profil KLT uji saponin fraksi E



Keterangan: E. Fraksi E, hasil negatif; S. pembanding *Rhei Radix*; dengan eluen etil asetat-metanol-air (100:17:13), dengan penyemprot KOH menunjukkan hasil negatif (tidak berwarna merah)

Gambar 4.14. Profil KLT uji antraquinon fraksi E



Tabel 4.4. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan alkaloid

No.	Ekstrak	Mayer	Bouchardat	Dragendorf	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan	Tidak ada endapan	-
2.	Etil asetat	Endapan putih	Endapan coklat	Endapan jingga	+
3.	Metanol	Endapan putih	Endapan coklat	Endapan jingga	+
4.	Standar	Endapan putih	Endapan coklat	Endapan jingga	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol Chinae Cortex

Tabel 4.5. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan flavonoid

No.	Ekstrak	Serbuk Zn	Serbuk Mg	Asam oksalat-asam borat	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Jernih	Jernih	Tidak fluorosensi	-
2.	Etil asetat	Merah muda	Kuning	Fluorosensi kuning	+
3.	Metanol	Kuning muda	Kuning kehijauan	Fluorosensi kuning	+
4.	Standar	Merah muda	Kuning	Fluorosensi kuning	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol *Ortosiphonis Folium*

Tabel 4.6. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan terpenoid

No.	Ekstrak	Lieberman-burchard	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Hijau kebiruan	+
2.	Etil asetat	Hijau kebiruan	+
3.	Metanol	Hijau kebiruan	+
4.	Standar	Merah kecoklatan	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol Caryophilli Flos

Tabel 4.7. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan tanin

No.	Ekstrak	Gelatin 10 %	FeCl ₃ 1 %	NaCl-Gelatin	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Warna tetap	Warna tetap	Warna tetap	-
2.	Etil asetat	Warna tetap	Warna tetap	Warna tetap	-
3.	Metanol	Endapan putih keruh	Hijau kehitaman	Endapan putih	+
4.	Standar	Endapan putih	Hijau kehitaman	Endapan putih	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol Thea Folium

Tabel 4.8. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan glikosida

No.	Ekstrak	Filtrat HCl	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Tidak ada cincin ungu	-
2.	Etil asetat	Tidak ada cincin ungu	-
3.	Metanol	Ada cincin ungu	+
4.	Standar	Ada cincin ungu	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol Centellae Herba

Tabel 4.9. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan saponin

No.	Ekstrak	Setelah 10 menit	Penambahan HCl 2 N	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Tidak timbul busa	Tidak timbul busa	-
2.	Etil asetat	Busa setinggi 0,5 cm	Busa hilang	-
3.	Metanol	Busa setinggi 1,2 cm	Busa tetap	+
4.	Standar	Busa setinggi 2,6 cm	Busa tetap	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol *Orthosiphonis Folium*

Tabel 4.10. Penapisan fitokimia ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers. golongan antrakuinon

No.	Ekstrak	Benzen-NaOH 2 N	Kesimpulan
1.	n-Heksana	Jernih pada lapisan air	-
2.	Etil asetat	Jernih pada lapisan air	-
3.	Metanol	Kuning pada lapisan air	-
4.	Standar	Merah pada lapisan air	+

Keterangan: + : terdeteksi - : tidak terdeteksi
Standar yang digunakan adalah ekstrak metanol *Rhei Radix*

Tabel 4.11. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun *Cyclea barbata* Miers.

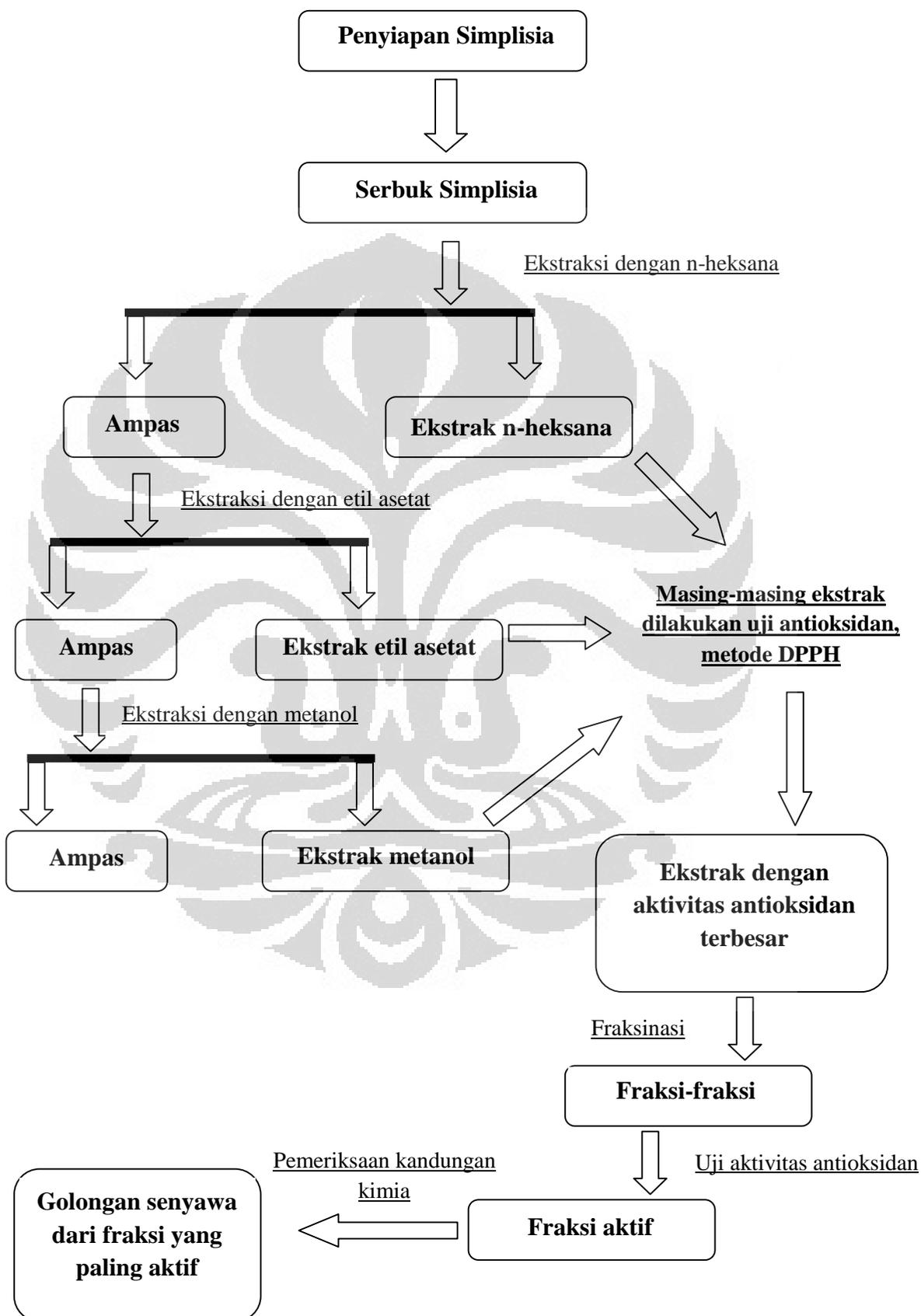
Sampel	Kons. Uji ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan		% Inhibisi	Persamaan Linier	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
		Blanko	Sampel			
Kuersetin	0,25	0,656	0,624	4,88	$y = 37,9x - 2,77$ $r = 0,9968$	1,39
	0,50		0,540	17,68		
	1,00		0,417	36,43		
	1,25		0,360	45,12		
	1,50		0,311	52,59		
Ekstrak n- heksana	12,5	0,656	0,650	0,91	$y = 0,22x - 0,62$ $r = 0,9979$	229,92
	25,0		0,619	5,64		
	50,0		0,583	11,13		
	100,0		0,516	21,34		
	150,0		0,445	32,16		
Ekstrak etil asetat	12,5	0,656	0,609	7,16	$y = 0,41x + 3,16$ $r = 0,9972$	114,20
	25,0		0,567	13,57		
	50,0		0,491	25,15		
	75,0		0,430	34,45		
	100,0		0,373	48,48		
Ekstrak metanol	25,0	0,656	0,498	24,05	$y = 0,54x + 10,99$ $r = 0,9998$	72,57
	50,0		0,407	37,96		
	75,0		0,315	51,98		
	100,0		0,232	64,63		
	125,0		0,145	77,90		

Tabel 4.12. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi gabungan dari ekstrak metanol daun *Cyclea barbata* Miers.

Sampel	Kons. Uji ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan		% Inhibisi	Persamaan Linier	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
		Blanko	Sampel			
Fraksi A	25	0,582	0,532	8,46	$y = 0,15x + 7,51$ $r = 0,9903$	277,70
	50		0,487	16,21		
	75		0,459	21,06		
	150		0,400	31,22		
	250		0,321	44,76		
Fraksi B	50	0,582	0,536	7,79	$y = 0,12x + 2,94$ $r = 0,9753$	396,08
	75		0,510	12,26		
	100		0,487	16,23		
	125		0,476	18,10		
	150		0,467	19,72		
Fraksi C	12,5	0,582	0,403	30,72	$y = 0,84x + 20,46$ $r = 0,9997$	35,04
	20,0		0,363	37,53		
	25,0		0,339	41,77		
	30,0		0,316	45,74		
	45,0		0,268	54,01		
Fraksi D	2,5	0,582	0,473	18,72	$y = 0,86x + 17,85$ $r = 0,9967$	37,55
	12,5		0,414	28,85		
	25,0		0,345	40,76		
	37,5		0,286	50,87		
	50,0		0,237	59,21		
Fraksi E	1,25	0,582	0,448	22,97	$y = 1,41x + 21,54$ $r = 0,9998$	20,13
	2,50		0,435	25,25		
	12,50		0,352	39,56		
	20,00		0,292	49,78		
	25,00		0,252	56,73		
Fraksi F	12,5	0,582	0,410	29,46	$y = 1,37x + 13$ $r = 0,9991$	26,99
	20,0		0,345	40,64		
	25,0		0,302	48,01		
	30,0		0,265	54,43		
	40,0		0,191	67,25		



Lampiran 1. Skema kerja



Lampiran 2. Surat determinasi *Cyclea barbata* Miers. Dari LIPI Cibinong



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, 19 Januari 2012

Nomor : 094/IPH.1.02/If.8/1/2012
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

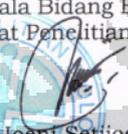
Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Scr(i). Ali Muhammad Shadiq
Mhs. Univ. Indonesia

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.	Cincau Hijau Rarbat	<i>Cyclea barbata</i> Miers.	Menispermaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
NIP. 196706241993032004



D:\Ident 2012\Ali Muhammad Shadiq.doc\IS-ABR

Page 1 of 1

Lampiran 3. Sertifikat analisis DPPH (Wako)

CERTIFICATE OF ANALYSIS : 047-04051		Page 1 of 1
 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan		
Certificate of Analysis		
Product Number : 047-04051 Chemical Name : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Grade : Lot Number : EPP4945 Unit : 1g		
TEST	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	Blackish purple, Crystalline powder or mass	Passed
Solubility in ethanol	to pass test(dissolve)	Passed
Date of QC-Release		Mar. 3, 2010
<i>M. Nanaura</i> Mitsuo Nanaura General Manager Q.A. Department		Date of issue : May 29, 2012 Issuing Number : 7847933
This is an electronically generated document		