



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN SENYAWA ALKALOID DARI KULIT
BATANG *Phoebe declinata* Nees**

SKRIPSI

**ROSHAMUR CAHYAN FORESTRANIA
0806328032**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN SENYAWA ALKALOID DARI KULIT
BATANG *Phoebe declinata* Nees**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
sarjana farmasi**

**ROSHAMUR CAHYAN FORESTRANIA
0806328032**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
DEPOK
JUNI 2011**

SURAT 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, 25 Juni 2012



Roshamur Cahyan Forestrania

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Roshamur Cahyan Forestrania

NPM : 0806328032

Tanda Tangan :



Tanggal : 25 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Roshamur Cahyan Forestrania
NPM : 0806328032
Program : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan
Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang *Phoebe declinata*
Nees.

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing 1 : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. (.....)
Pembimbing 2 : Dr. Harmita, Apt. (.....)
Penguji : Dr. Abdul Mun'im M.Si., Apt (.....)
Penguji : Drs. Hayun M.Si. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juni 2012

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena berkat rahmat dan hidayah-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan sebagai upaya untuk memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa adanya bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Berna Elya, M. Si. dan Dr. Harmita, Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. Si, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI;
3. Dra. Maryati Kurniadi, M.Si, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi UI;
4. Dr. Katrin, M.Si selaku ketua Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI;
5. Prof. Dr. A. Hamid A. Hadi selaku ketua Laboratorium Fitokimia *Center Natural Product* Universitas Malaya Malaysia. Senior serta rekan kerja di laboratorium fitokimia Universitas Malaya, Kak Ainnul Azizan dan Abang Mehran Fadaei, yang telah membantu dalam pengujian spektrum IR, UV-Vis, ^1H dan ^{13}C -NMR.
6. Para dosen yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI;
7. Laboran dan penanggung jawab laboratorium Fitokimia serta staf pegawai departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu saya selama menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI;
8. Orang tua saya, Murtiono dan Sri Hartati, serta adik saya, Kuky Cahya Hamurajib yang telah memberikan dukungan serta bantuan materiil dan moril;

9. Senior S2 Herbal Farmasi UI, Kak Aktsar Roskiana Ahmad, S.Far. dan Kak Ruth Elenora, S.Si., Apt., sahabat-sahabat Farmasi angkatan 2008, Sri Rahayu, Ayun Arifianti, dan Kartika Widyanti, serta teman-teman lain yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini;
10. Semua pihak yang turut membantu dan memberikan dukungan selama saya melakukan penelitian dan penyusunan skripsi.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis
2012

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Roshamur Cahyan Forestrania
NPM : 0806328032
Program Studi : Sarjana Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

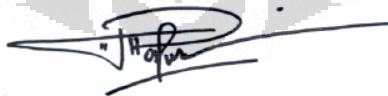
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang *Phoebe declinata* Nees.

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, 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 : 25 Juni 2012
Yang menyatakan



(Roshamur Cahyan Forestrania)

ABSTRAK

Nama : Roshamur Cahyan Forestrania
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang *Phoebe declinata* Nees.

Phoebe declinata Nees merupakan tanaman asli Indonesia yang berpotensi memiliki senyawa yang beraktivitas farmakologis. Pada penelitian ini, isolasi dari kulit batang *Phoebe declinata* Nees ditujukan untuk mendapat senyawa alkaloid. Metode ekstraksi yang digunakan dalam proses isolasi adalah metode ekstraksi refluks secara bertingkat. Proses ekstraksi dilakukan berturut-turut dengan pelarut heksana dan diklorometan. Ekstrak kental diklorometan yang diperoleh difraksinasi dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom pertama dilakukan menggunakan fase gerak diklorometan dan metanol serta silika gel sebagai fase diamnya. Fraksi yang diketahui menunjukkan hasil positif alkaloid dan memiliki aktivitas antioksidan selanjutnya dikolom ulang dengan fase gerak heksana dan etil asetat. Salah satu fraksi hasil kolom kedua menunjukkan terbentuknya kristal yang positif terhadap pereaksi alkaloid. Kristal yang didapat dimurnikan dan ditentukan kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis 2 dimensi dan diuji titik lelehnya, selanjutnya isolat disebut sebagai PD2. Isolat PD2 dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis, IR, ¹H, dan ¹³C-NMR, serta diketahui sebagai alkaloid yang memiliki gugus metoksi dengan inti aromatis. Isolat yang diperoleh tersebut diuji aktivitas antioksidan menggunakan 1,1-difenil-2-pikrilhidrasil (DPPH). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat PD2 memiliki aktivitas antioksidan yang lemah, yakni dengan IC₅₀ sebesar 148,4 µg/mL. Perbandingan yang digunakan dalam penelitian ini adalah boldin, yaitu dengan IC₅₀ 5,8 µg/mL.

Kata Kunci : *Phoebe declinata* Nees, alkaloid, karakterisasi, metode DPPH.

xvii + 119 halaman : 33 gambar; 8 tabel

Daftar Pustaka : 179 (1957-2012)

ABSTRACT

Name : Roshamur Cahyan Forestrania
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation, Characterization, and Antioxidant Assay of Alkaloid Compound from Stem Bark of *Phoebe declinata* Nees.

Phoebe declinata Nees is one of potential Indonesia plant species in exhibition various therapeutic chemical constituent. Isolation from the bark of this plant is afforded to alkaloid group. The extraction method was divided into two steps. Each step used reflux with hexane and dichloromethane solvent, respectively. The yield of dichloromethane crude extract achieved to first column chromatography with dichloromethane-methanol as its mobile phase and silica gel 60 as its stationary phase. The fraction which had alkaloid and indicated highest antioxidant activity was proceeded to the next fractionation by second column chromatography with mobile phase hexane-ethylacetate and the same previous stationary phase. One of the fractions yield was found crystals positive of alkaloid reaction. The crystal was purified and determined its purities by 2D thin layer chromatography and melting point range. The crystal then named as PD2. Characterization of PD2 was established using UV-Vis, IR, ^1H , and ^{13}C -NMR spectroscopic data, and known as an aromatic alkaloid substituted by methoxy. The alkaloid isolated was also subjected to investigate of its antioxidant activity by DPPH method. IC_{50} was noticed to be 148.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ which is weakly free radical scavenging activity. The standard used was boldin that had IC_{50} 5.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by the same method.

Key Words : *Phoebe declinata* Nees, alkaloid, characterization, DPPH method.
xvii + 119 pages : 33 pictures; 8 tables
Bibliography : 179 (1957-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Marga <i>Phoebe</i>	5
2.2. Tanaman <i>Phoebe declinata</i> Nees.....	8
2.3. Simplisia	10
2.4. Ekstraksi dan Fraksinasi	10
2.4.1 Ekstraksi	10
2.4.1.1 Cara Dingin	11
2.4.1.2 Cara Panas	11
2.4.2 Fraksinasi	12
2.4.2.1 Kromatografi Kolom (KK)	13
2.4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	15
2.5. Penapisan Fitokimia Alkaloid.....	18
2.5.1 Golongan Alkaloid	18
2.5.2 Penapisan Fitokimia	20
2.6. Karakterisasi Senyawa.....	20
2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis.....	20
2.6.2 Spektrofotometer Inframerah	22
2.6.3 Spektrofotometri Resonansi Magnetik Inti Proton(¹ H-NMR) ..	23
2.6.4 Spektrofotometri Resonansi Magnetik Inti Karbon(¹³ C-NMR) ..	25
2.7. Radikal Bebas dan Antioksidan.....	26
2.7.1 Radikal Bebas	26
2.7.1.1 Definisi Radikal Bebas	26
2.7.1.2 Asal Radikal Bebas	27
2.7.1.3 Tipe Radikal Bebas	28

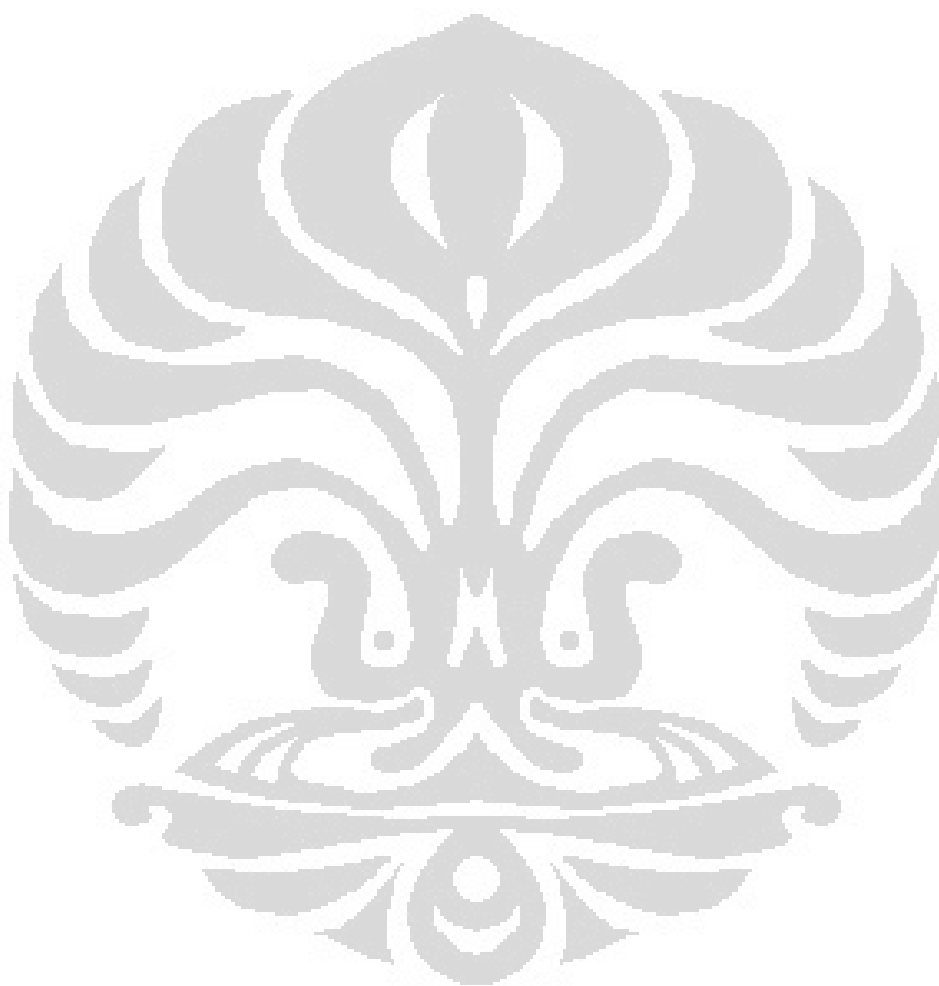
2.7.1.4 Sumber Radikal Bebas	31
2.7.1.5 Patofisiologis Radikal Bebas	31
2.7.2 Antioksidan	35
2.7.2.1 Definisi Antioksidan	35
2.7.2.2 Klasifikasi Antioksidan	35
2.7.2.3 Fisiologi Antioksidan	39
2.8. Boldin (Standar Antioksidan)	40
2.9. Uji Aktivitas Antioksidan	41
2.9.1 Metode Uji Antioksidan Secara In vivo	41
2.9.2 Metode Uji Antioksidan Secara In vitro	42
2.9.2.1 Metode Peredaman Radikal DPPH	42
2.9.2.2 Metode TBA (Asam tiobarbiturat)	43
2.9.2.3 Metode Tiosianat	43
2.9.2.4 Metode ABTS	44
2.9.2.5 Aktivitas Penangkap Radikal Superoksida	45
2.9.2.6 Aktivitas Penangkap Radikal Hidroksil	45
2.9.2.7 Metode DMPD	45
2.9.2.8 Metode Uji ORAQ	46
2.9.2.9 Metode β -karoten linoleat	46
2.9.2.10 Metode Konjugasi Dena	46
2.9.2.11 Metode Fosfo Molibdat	47
2.9.2.12 Metode Xantin Oksidase	47
2.9.2.13 Metode TRAP	47
2.9.2.14 Metode FRAP	48
2.9.2.15 Metode <i>Reducing Power</i>	48
BAB 3. METODE PENELITIAN	49
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	49
3.2. Alat	49
3.3. Bahan	49
3.3.1 Bahan Uji	49
3.3.2 Bahan Kimia	50
3.3.3 Bahan Pembanding	50
3.4. Cara Kerja	50
3.4.1 Penyiapan Simplisia	50
3.4.2 Penapisan Fitokimia Alkaloid Simplisia	51
3.4.3 Pembuatan Ekstrak	51
3.4.4 Penapisan Fitokimia Alkaloid Ekstrak Diklorometan	52
3.4.5 Uji Antioksidan Kualitatif Ekstra Diklorometan	53
3.4.6 Kromatografi Kolom Ekstrak Diklorometan	53
3.4.7 Uji Antioksidan Kualitatif dan Kuantitatif Fraksi Kolom Pertama	54
3.4.7.1 Pembuatan Larutan DPPH	54
3.4.7.2 Penentuan Panjang Gelombang	55
3.4.7.3 Pembuatan Larutan Blanko	55
3.4.7.4 Persiapan Larutan Uji	55
3.4.7.5 Persiapan Larutan Standar (BHT dan Boldin)	56

3.4.7.6 Perhitungan IC ₅₀	56
3.4.8 Kromatografi Kolom Fraksi Aktif Alakloid	56
3.4.9 Uji Antioksidan Kualitatif Fraksi Alkaloid Kolom Kedua	57
3.4.10 Kemurnian dan Karakterisasi Isolat.....	57
3.4.10.1 Pemeriksaan secara Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi	57
3.4.10.2 Pemeriksaan Sifat Fisika Isolat	58
3.4.10.3 Pemeriksaan UV-Vis	58
3.4.10.5 Pemeriksaan Spektrum Inframerah	58
3.4.10.5 Pemeriksaan Spektrum ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR.....	59
3.4.11 Uji Antioksidan Kuantitatif Isolat.....	59
BAB 4. PEMBAHASAN	60
4.1 Penyiapan Bahan.....	60
4.2 Penapisan Fitokimia Alkaloid Serbuk Simplisia	61
4.3 Ekstraksi.....	62
4.4 Penapisan Fitokimia Alkaloid Ekstrak Diklorometan	63
4.5 Uji Antioksidan Ekstrak Diklorometan	63
4.6 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom dan Uji Antioksidan Fraksi	64
4.7 Pemurnian Isolat	65
4.8 Karakterisasi Isolat	66
4.9 Uji Antioksidan Kuantitatif Isolat.....	67
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	69
5.1 Kesimpulan	69
5.2 Saran	69
DAFTAR ACUAN	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Struktur inti alkaloid golongan aporfin	6
2.2. Struktur grandin A.....	7
2.3. Struktur phoebegrandin	7
2.4. <i>Phoebe declinata</i> Nees	9
2.5. Kromatografi kolom	14
2.6. Struktur cincin alkaloid heterosiklik	19
2.7. Terminologi pergeseran posisi pita serapan	21
2.8. Mekanisme radikal bebas dalam memperoleh keadaan stabil ..	26
2.9. Membran Protein	32
2.10. Aktivitas antioksidan enzim	37
2.11. Struktur boldin.....	40
2.12. Struktur radikal dan non radikal DPPH.....	43
2.13. Pembentukan radikal dan peroksidasi asam linoleat	44
4.1. Batang <i>Phoebe declinata</i> Nees	86
4.2. Serbuk simplisia <i>Phoebe declinata</i> Nees	87
4.3. Uji alkaloid dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff) pada simplisia <i>Phoebe declinata</i> Nees.....	88
4.4. Uji alkaloid dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff) pada ekstrak diklorometan	89
4.5. Uji alkaloid pada ekstrak diklorometan dengan pereaksi semprot Dragendorff	90
4.6. Uji antioksidan dengan pereaksi semprot DPPH pada ekstrak diklorometan	91
4.7. Uji antioksidan pada fraksi alkaloid hasil kolom pertama dengan pereaksi semprot DPPH	92
4.8. Absorbansi DPPH pada panjang gelombang optimum (516 nm) dengan pelarut metanol.....	93
4.9.a Kurva regresi uji aktivitas antioksidan standar dan fraksi A-5 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm	94
4.9.b Kurva regresi uji aktivitas antioksidan fraksi A-6 dan A-8 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm	95
4.9.c Kurva regresi uji aktivitas antioksidan fraksi A-8 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm ..	96
4.10 Uji antioksidan pada fraksi alkaloid hasil kolom kedua (B-4) dengan pereaksi semprot DPPH.....	97
4.11. Uji alkaloid pada isolat PD2 dengan pereaksi semprot Dragendorff melalui metode KLT	98
4.12 Hasil KLT 2D pada isolat PD2.....	99
4.13 Spektrum UV- <i>Vis</i> blanko metanol dan isolat PD2 dalam pelarut metanol	100
4.14 Spektrum infra merah isolat PD2 dalam pelarut metanol.....	101

4.15	Spektrum ^1H -NMR isolat PD2 diukur pada 400 MHz dengan pelarut CDCl_3	102
4.16	Spektrum ^{13}C -NMR isolat PD2 diukur pada 600 MHz dengan pelarut CDCl_3	103
4.17	Data DEPT isolat PD2 diukur pada 600 MHz dengan pelarut CDCl_3	104
4.18	Struktur boldin	68

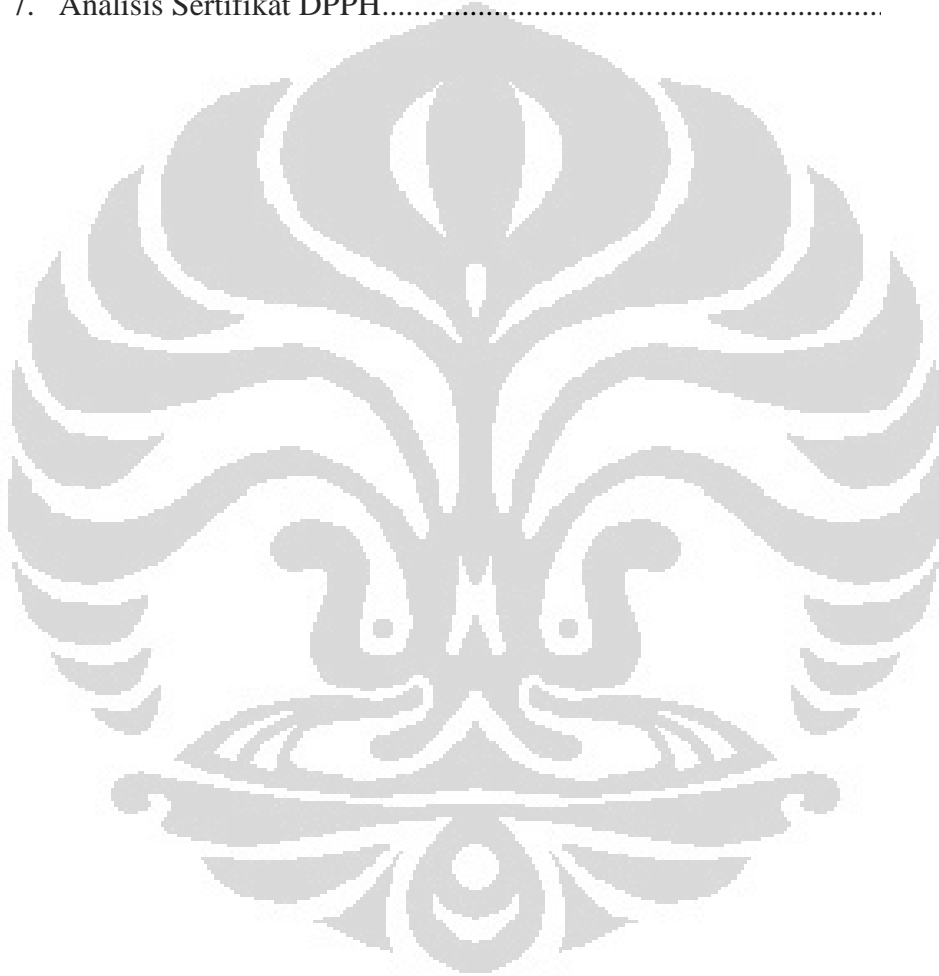


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Beberapa pelarut untuk ekstraksi dan titik didihnya	11
4.1. Hasil penapisan fitokimia alkaloid simplisia <i>Phoebe declinata</i> Nees	106
4.2. Data rendemen ekstrak kulit batang <i>Phoebe declinata</i> Nees	107
4.3. Hasil penapisan fitokimia alkaloid ekstrak diklorometan	108
4.4. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi (A-5, A-6, A-8, A-9) dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm	109
4.5. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat PD2 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm	110
4.6. Bilangan gelombang spektrum infra merah isolat PD2 dengan menggunakan pelarut CDCl_3	111
4.7. Pergeseran kimia 1D NMR (^1H dan ^{13}C) isolat PD2 dikur pada ^1H -NMR 400 MHz dan ^{13}C -NMR 600 MHz dengan menggunakan pelarut CDCl_3	112

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Ekstraksi	113
2. Skema Fraksinasi dan Uji Aktivitas Antioksidan	114
3. Skema Pembuatan Konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g/mL}$...	115
4. Skema Pembuatan Konsentrasi 5, 6, 8, 9, dan 10 $\mu\text{g/mL}$	116
5. Surat Determinasi Kulit Batang <i>Phoebe declinata</i> Nees	117
6. Analisis Sertifikat Boldin	118
7. Analisis Sertifikat DPPH.....	119



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara yang memiliki keanekaragaman sumber daya alam terbesar kedua setelah Brazilia. Kekayaan flora Indonesia ini mencakup 30.000 jenis tumbuhan dari total 40.000 jenis tumbuhan di dunia dengan 9.600 jenis diantaranya merupakan tumbuhan berkhasiat obat (Kotranas, 2007). Jumlah tumbuhan obat tersebut diketahui merupakan 90% dari jumlah tumbuhan obat di kawasan Asia (Nugroho, 2010). Namun demikian, dari sekian banyak jenis tanaman obat yang ada, Badan POM memperkirakan hanya sekitar 1.000 hingga 1.200 jenis yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dan hanya sekitar 300 jenis yang telah digunakan secara rutin dalam industri obat tradisional (Departemen Kesehatan, 2007). Minimnya pengembangan dan pengolahan kekayaan sumber daya hayati berkhasiat obat di Indonesia ini menawarkan banyak peluang baru untuk meneliti dan mengeksplorasi lebih jauh mengenai tumbuhan-tumbuhan potensial yang belum terjamah.

Pengembangan dan pemanfaatan tumbuhan potensial dalam dunia pengobatan dapat turut membantu mengatasi permasalahan suatu penyakit. Hal ini mengingat bahwa penggunaan obat tradisional secara tepat dapat menunjukkan efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada obat sintetik, sehingga secara umum dinilai lebih aman dari pada penggunaan obat sintetik (Sari, 2006).

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional di Indonesia telah dilakukan oleh nenek moyang sejak berabad-abad yang lalu (Sari, 2006). Menurut WHO, negara-negara di Afrika, Asia, dan Amerika Latin telah menggunakan obat herbal sebagai pelengkap pengobatan primer. Bahkan di Afrika, sebanyak 80% populasi telah menggunakan obat herbal untuk pengobatan primer (WHO, 2008). Salah satu faktor pendorong tingginya penggunaan obat herbal di negara maju adalah adanya harapan usia hidup yang lebih panjang terhadap peningkatan prevalensi penyakit kronik tertentu terutama pada kegagalan terapi konvensional (Sukandar, 2006). Salah satu penyakit dengan prevalensi cukup besar di dunia

terutama di Indonesia adalah penyakit yang terkait perusakan radikal bebas (Kusumadewi, 2009; Prince, 2008; Tjindarbuni & Mangunkusumo, 2002).

Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar (Defeng & Arthur, 2003). Radikal bebas bersifat tidak stabil dan dapat menyerang molekul, atom-atom maupun elektron disekitarnya untuk mencapai kondisi yang lebih stabil. Proses ini merupakan proses yang destruktif dan bila menyerang molekul biologis seperti lipid, protein, serta DNA, mampu memicu timbulnya berbagai macam penyakit (Sarma, Mallick, & Ghosh, 2010). Davies dan Pryor (2005) menyebutkan bahwa radikal bebas merupakan etiologi penyakit degeneratif seperti penyakit jantung koroner, alzheimer, aterosklerosis, kanker, dan diabetes (Sterbauer, Gebick, Puhl, & Jürgens, 1992; Moussa, 2008). Untuk mengatasi hal tersebut, dibutuhkan substansi yang dapat mencegah kerusakan akibat serangan radikal bebas. Substansi ini disebut sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan substansi yang dapat mencegah oksidasi oleh radikal bebas. Beberapa antioksidan alami dan sintetik yang banyak digunakan saat ini adalah vitamin E, vitamin C, beta karoten, BHT (*butylated hydroxyanisole*), BHA (*butylated hydroxytoluene*), dan TBHQ (*tert-butylhydroquinone*) (Shahidi & Zhong, 2005). Namun demikian, diketahui bahwa beberapa antioksidan sintetik yang ada justru menunjukkan efek toksik dan mutagenik (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, & De, 2010). Dalam hal ini, Gharavi dan El-Kadi (2005) melaporkan bahwa TBHQ secara langsung dapat menginduksi ekspresi gen sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) pada AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) yang bertanggung jawab terhadap mekanisme karsinogenesis. Oleh karena itu, Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, dan De (2010) berpendapat bahwa kebutuhan antioksidan alami akan meningkat dibanding antioksidan sintetik (Nagulendran, Velavan, Mahesh, & Begum, 2007).

Antioksidan alami dapat ditemukan pada berbagai senyawa aktif dalam tanaman obat. Senyawa aktif tersebut dapat berupa alkaloid, karoten, antosianin, isoflavon, flavon, kumarin, lignin, tanin, dan lain sebagainya (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, & De, 2010). Beberapa suku tumbuhan yang dilaporkan memiliki senyawa dengan aktivitas antioksidan diantaranya adalah suku euphorbiaceae,

malvaceae, lauraceae, dan balsaminaceae (Shahwar, Shafiq-ur-Rehman, Ahmad, Ullah, & Raza, 2010).

Suku lauraceae merupakan tanaman tropis yang terdistribusi luas di seluruh Indonesia. Suku tanaman tropis ini terdiri dari 55 marga dan 2.500-3.000 jenis tanaman yang dikenal dengan nama medang (Kostermans, 1957; Chaverri, 2011; Van der Werff, 2003). Penyelidikan ilmiah pada suku lauraceae membuktikan bahwa suku ini memiliki beragam aktifitas farmakologis, seperti aktivitas antioksidan, antifungi, antimikroba, antitumor, dan antidiabetes (Chaverri, Díaz, & Ciccío 2011; Ayinde, Omogbai, & Ikpefan, 2011; Kumanan, Manimaran, Saleemulla, Dhanabal, & Nanjan, 2010; Gomez-Flores *et al.*, 2008; Shahwar, Shafiq-ur-Rehman, Ahmad, Ullah, & Raza, 2010; Haryono, 2007). Terkait hal tersebut, lauraceae merupakan sumber alami yang kaya akan senyawa-senyawa aktif. Sebagian besar penyelidikan terhadap tumbuhan ini berhubungan dengan senyawa-senyawa berjenis alkaloid, monoterpen, sesquiterpen, dan lignin (Plazzo, Agius, Wright, Haber, Moriarity, & Setzer, 2009; Yoosu, Namseok, & Minoru, 2009; D.K Semwal, rawat, Bamola, & R. Semwal, 2009). Menurut Achmad, Hakim, Makmur, Rizal, dan Zamri (1990), lauraceae dikenal sebagai salah satu suku tanaman kaya alkaloid yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis (Hegnauer, 1966; Saidi, Hadi, Awang, & Mukhtar, 2009).

Para peneliti baru-baru ini mulai menggali kandungan senyawa aktif berjenis alkaloid beserta aksi farmakologisnya pada salah satu marga dalam suku lauraceae, yaitu marga phoebe. Hal tersebut dikarenakan marga phoebe belum banyak diteliti kandungan maupun aktivitas farmakologisnya. Padahal, tanaman pada marga ini telah digunakan sebagai obat tradisional di India, contohnya yaitu *Phoebe lanceolata* dalam D.K Semwal, Rawat, Bamola, dan R. Semwal (2009) yang secara tradisional dimanfaatkan untuk penyembuhan luka (Gaur, 1999). Pada beberapa penelitian diketahui pula bahwa alkaloid dari marga ini dapat memperlihatkan berbagai macam aktivitas farmakologis. Yeh-Siang, Subramaniam, Hadi, Murugan, dan Mustafa (2011) melaporkan bahwa alkaloid boldin dan norboldin dari *Phoebe grandis* menunjukkan aktivitas antiinflamasi, antikanker, antidiabetes, dan aktivitas antioksidan yang poten (O'Brien, Carrasco-Pozo, & Speisky, 2006; Mukhtar *et al.*, 2009). Di Indonesia tanaman bermarga

phoebe cukup terdistribusi secara luas, terutama di kawasan Sumatra, sehingga dapat membuka peluang besar untuk dikembangkan lebih jauh sebagai upaya dalam memperkaya sumber tanaman obat Indonesia (Priyadi, Takao, Rahmawati, Supriyanto, Nursal, & Rahman, 2010; Arbain, 1987).

Phoebe declinata Nees (marga: phoebe; suku: lauraceae) merupakan salah satu jenis tanaman yang belum terjamah oleh para peneliti hingga saat ini. Padahal, tanaman yang dikenal dengan nama kayu helah ini dimungkinkan memiliki aktivitas farmakologis yang tidak kalah potensial seperti pada marga phoebe lainnya, terutama terhadap aktivitas antioksidannya. Begitu pula dengan penelitian terhadap senyawa kimia yang terkandung di dalamnya, dimana *Phoebe declinata* Nees juga berpeluang memiliki kandungan senyawa kimia aktif seperti halnya alkaloid yang telah diteliti pada marga Phoebe. Oleh karena itu, penelitian mengenai senyawa kimia dan aktivitas farmakologis tanaman ini menjadi penting untuk dilakukan.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan uji aktivitas antioksidan isolat alkaloid dari ekstrak kulit batang tanaman *Phoebe declinata* Nees. Alkaloid yang berhasil diisolasi selanjutnya dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer inframerah, spektrofotometer UV-Vis, ^1H dan ^{13}C -NMR serta diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

1.2 Tujuan

- a. Mendapatkan isolat dan karakterisasi senyawa alkaloid yang diisolasi dari kulit batang *Phoebe declinata* Nees.
- b. Memperoleh aktivitas antioksidan isolat alkaloid dari kulit batang *Phoebe declinata* Nees.

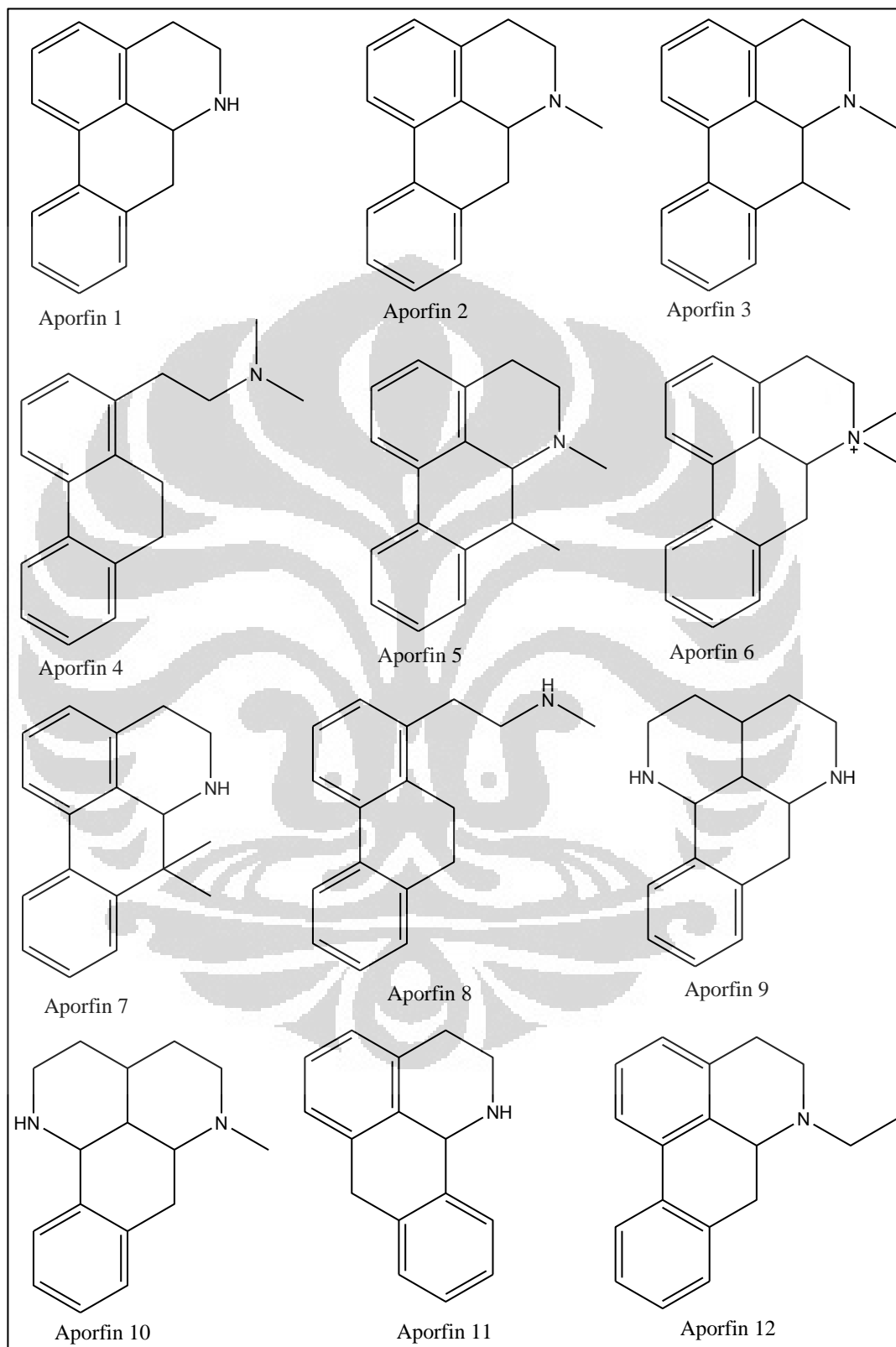
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Marga *Phoebe*

Phoebe merupakan marga dari jenis tanaman yang termasuk suku lauraceae. Jenis tanaman yang dimilikinya berjumlah kurang lebih 100 jenis yang tersebar pada daerah tropis dan subtropis di kawasan Asia. Tanaman pada marga ini dapat berupa pepohonan ataupun semak yang menghijau dengan pergantian daun pada selang periode tertentu. Bunga berwarna putih, kecil, berbau, dan tersusun di bagian terminal tangkai dengan enam buah mahkota yang rata-rata berukuran sama. Bunganya memiliki sembilan buah benang sari yang dibagi menjadi dua golongan berdasar kepala sari. Pada golongan pertama, kepala sari tidak memiliki kelenjar dan sedikit ke dalam. Sedangkan pada golongan kedua, kepala sari memiliki dua kelenjar dan terletak di sebelah luar. Bakal buah pada bunga berbentuk oval atau bulat. Sedangkan putik berbentuk mangkuk. Buahnya berbentuk oval hingga bulat yang dibungkus oleh daun buah yang lebar (Fa'nan & Werff, 1836).

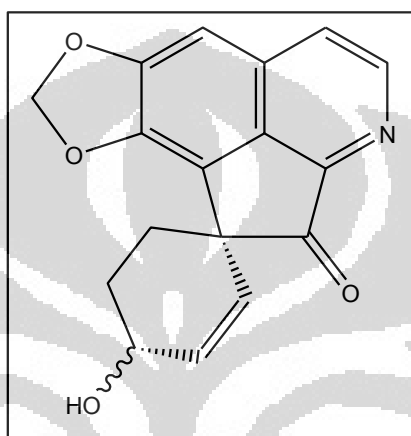
Kandungan utama pada jenis tanaman marga *phoebe* diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, terpenoid, glikosida, dan steroid (Joshi, Padalia, Bisht, & Mathela, 2009; D.K. Semwal, Rawat, Bamla, & R. Semwal, 2009). Alkaloid yang terkandung dalam marga ini kebanyakan merupakan golongan aporfin (Gambar 2.1) yang merupakan turunan dari golongan alkaloid isoquinolin (Rufino, Brant, Santos, Ferreira, & Emerenciano, 2005; Stévigny, Bailly, & Leclercq, 2005). Hal ini telah dibuktikan melalui suatu penelitian oleh Semwal, Rawat, dan Singh (2008) pada jenis *Phoebe lanceolata*. Pada penelitian lain, Mukhtar *et al.* (1997) mengemukakan bahwa senyawa alkaloid aporfin seperti boldin, norboldin, laurotetanin, dan lindekarpin terkandung pada kulit batang *Phoebe grandis*. Selain itu, penemuan alkaloid tipe ini juga dilaporkan pada jenis *Phoebe tavoyana* yang berhasil mengisolasi senyawa norboldin pada kulit batangnya (Omar, Elya, Nafiah, Awang, Mukhtar, & Hadi, 2010). Sedangkan jenis lain pada marga *phoebe* seperti *Phoebe pittieri*, *Phoebe formosana*, dan *Phoebe scortechinii* juga

diketahui memiliki kandungan alkaloid bertipe aporfin (Castro, Lopez, & Vergara, 1985; Chen, Huang, Lee, Ou, 1997; Mukhtar *et al.*, 2008).



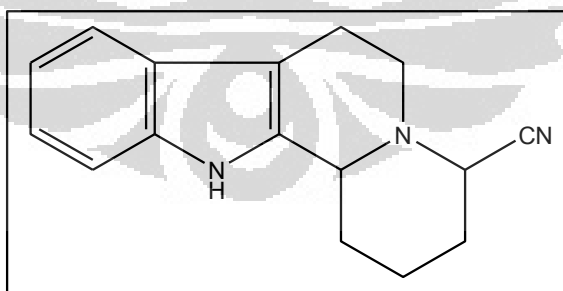
Gambar 2.1. Struktur inti alkaloid golongan aporfin

Golongan alkaloid derivat aporfin seperti oksoproaporfin dilaporkan oleh Mukhtar *et al.* (2009) pada salah satu jenis tanaman dalam marga phoebe. Adapun alkaloid golongan oksoproaporfin tersebut dikarakterisasi dari kulit batang *Phoebe grandis* sebagai grandin A (Gambar 2.2) (Mukhtar *et al.*, 2005). Selain itu, derivat alkaloid aporfin lain, proaporfin, juga telah berhasil diisolasi dari kulit batang *Phoebe scortechinii*. Senyawa tersebut adalah (+)-scortechiniin A dan (+)-scortechiniin B (Mukhtar *et al.*, 2008).



Gambar 2.2. Struktur grandin A

Pada salah satu penelitian lain oleh Awang, Mukhtar, Hadi, Litaudon, Latip, dan Abdullah (2006) dilaporkan pula adanya alkaloid jenis Indol, phoebegrandin, dalam *Phoebe grandis* (Gambar 2.3). Penelitian tersebut merupakan penemuan pertama alkaloid indol pada marga *Phoebe* (Awang, Mukhtar, Hadi, Litaudon, Latip, & Abdullah, 2006).



Gambar 2.3. Struktur phoebegrandin

Tanaman jenis phoebe memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam dunia pengobatan. Menurut Omar, Elya, Nafiah, Awang, Mukhtar, dan Hadi (2010) tanaman pada marga ini telah digunakan dalam pengobatan beberapa penyakit di Indonesia, China, Jepang, Filipina dan Malaysia (Perry & Metzgr, 1980). Pada

beberapa penelitian dibuktikan pula bahwa alkaloid dari marga ini dapat memperlihatkan berbagai macam aktivitas farmakologis. Yeh-Siang, Subramaniam, Hadi, Murugan, dan Mustafa (2011) mengemukakan bahwa alkaloid boldin dan norboldin pada *Phoebe grandis* dapat menunjukkan aktivitas antiinflamasi, antikanker, antidiabetes, dan antioksidan (Mukhtar *et al.*, 2009). Dalam hal ini, dilaporkan bahwa alkaloid boldin merupakan antioksidan yang poten dan dapat mencegah stres oksidatif dengan nilai IC_{50} berkisar antara 5×10^{-6} – 15×10^{-6} M (Speisky, Cassels, Lissi, & Videla, 1991; O'Brien, Carrasco-Pozo, & Speisky, 2006; Lau, Machha, Achike, Murugan, & Mustafa, 2011).

2.2 Tanaman *Phoebe declinata* Nees

Phoebe declinata Nees merupakan tanaman tahunan yang tumbuh di daerah tropis. Di Indonesia, tanaman dengan nama daerah pohon bedagai atau huru hejo ini tersebar di kawasan Sumatra dan Jawa (Suwena, 2006). Tanaman ini berupa pohon yang tinggi batangnya dapat mencapai 20–50 m dan berusia hingga 50 tahun. *Phoebe declinata* Nees termasuk tumbuhan dikotil yang memiliki perakaran tunggang dan percabangan pada batangnya. Pohon bedagai (Gambar 2.4) mempunyai ciri-ciri daun berminyak dan dapat mengeluarkan aroma saat diremas. Secara fisik daunnya berbentuk lanset, memiliki panjang 9 hingga 13 cm dengan tangkai daun kurang lebih berukuran 1,5 cm, berwarna hijau muda ketika muda, dan kuning hingga coklat ketika tua serta memiliki urat daun berjumlah 10-12 buah. Buahnya seperti buah melinjo dan bunganya kecil berwarna kuning muda. Sedangkan kayunya berwarna putih dengan serat sedikit halus yang membuat kayu terasa liat dan keras. Kulit batangnya berwarna coklat kehitaman dengan ukuran diameter batang rata-rata 15 cm. Batang dan kulit batang tanaman ini memberikan aroma khas walaupun telah dikeringkan.



[Sumber: koleksi penulis]

Gambar 2.4. *Phoebe declinata* Nees

Tumbuhan *Phoebe declinata* Nees secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Stang, 2012):

- Kerajaan : Plantae
- Subkerajaan : Viridaplantae
- Devisi : Magnoliophyta
- Subdevisi : Euphyllophytina
- Kelas : Magnoliopsida (dicotyledoneae)
- Subkelas : Magnoliidae
- Bangsa : Laurales
- Subbangsa : Laurineae
- Suku : Lauraceae
- Marga : Phoebe
- Jenis : *Phoebe declinata* Nees
- Sinonim : *Octea declinata* Blume
Persea declinata (Blume) Kosterm.

Phoebe declinata Nees merupakan salah satu jenis marga phoebe yang belum diteliti secara ilmiah baik pada efek farmakologis maupun kandungan kimianya. Sampai saat ini masyarakat pun belum banyak mengenal tanaman ini. Namun begitu, jenis tanaman phoebe yang lain diketahui mengandung senyawa tertentu yang mampu menunjukkan aktivitas farmakologis, yaitu khususnya alkaloid yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

2.3 Simplisia

Bentuk sajian tanaman obat atau simplisia merupakan bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang dikeringkan. Simplisia dapat digolongkan menjadi tiga kategori, yakni simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia pelikan (mineral). Dalam hal ini, simplisia nabati dapat berupa tanaman utuh, bagian tanaman ataupun eksudat tanaman (Depkes, 1995b; Utami, 2005).

2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi

2.4.1 Ekstraksi

Definisi ekstraksi adalah suatu proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari komponen lain yang tidak dapat larut pada suatu pelarut cair tertentu (Depkes, 2000). Hasil yang dapat diperoleh dari proses ekstraksi ini adalah ekstrak. Dalam hal ini, ekstrak dapat diartikan sebagai sediaan kental hasil dari proses penyarian senyawa aktif baik dari simplisia nabati maupun simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, dimana semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa selanjutnya diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes, 1995a).

Pada dasarnya proses ekstraksi suatu simplisia bahan alam mengarah pada penarikan komponen kimia yang diinginkan melalui suatu sistem kesesuaian pelarut pada komponen tersebut. Dengan kata lain, pelarut yang dipergunakan dalam proses ekstraksi ini adalah pelarut yang bersifat optimal untuk menarik senyawa yang dimaksud sehingga dapat dipisahkan dari kandungan senyawa

lainnya dan dapat menghasilkan ekstrak yang hanya mengandung sebagian besar senyawa yang diinginkan (Depkes, 2000).

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang sesuai dapat dikategorikan secara garis besar menjadi dua macam, yaitu cara dingin dan cara panas. Ekstraksi cara dingin meliputi metode maserasi dan perkolasi. Sedangkan cara panas, yaitu refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekok (Depkes, 2000).

2.4.1.1 Cara Dingin (Depkes, 2000)

a. Maserasi

Asal mula kata maserasi berasal dari bahasa Latin *macerare* yang berarti merendam. Dalam proses maserasi, simplisia yang akan diekstraksi mula-mula ditempatkan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar dan ditutup rapat (Ansel, 1989). Proses ekstraksi simplisia secara maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai disertai 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

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

2.4.1.2 Cara Panas (Depkes, 2000)

a. Refluks

Ekstraksi refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya (Tabel 2.1) selama waktu tertentu dengan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan akibat adanya pendingin balik. Pengulangan yang dilakukan pada

residu pertama umumnya 3-5 kali proses refluks. Oleh karena itu, proses ekstraksi dengan refluks ini tergolong dalam proses ekstraksi yang sempurna.

Tabel 2.1. :Beberapa pelarut untuk ekstraksi dan titik didihnya.

Pelarut	Titik Didih (°C)
Heksana	69 (Rao, & Sunkada, 2007)
Diklorometan	39,75 (Department of Health and Human Services, 2011)
Etil asetat	77,1 (Methanex Corporation, 2006)
Metanol	64,6 (Methanex Corporation, 2006)

b. Soxhlet

Ekstraksi soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru dan umumnya menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan akibat adanya pendingin balik.

c. Digesti

Ekstraksi digesti adalah maserasi kinetik dengan pengadukan kontinu yang dilakukan pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (suhu kamar), yaitu umumnya dilakukan pada temperatur 40-50°C.

d. Infus

Ekstraksi infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air dengan bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih. Temperatur yang digunakan pada metode ini adalah 96-98°C selama 15-20 menit.

e. Dekok

Ekstraksi dekok merupakan ekstraksi infus pada waktu yang lebih lama (30 menit) dan dilakukan pada temperatur hingga titik didih air.

2.4.2 Fraksinasi

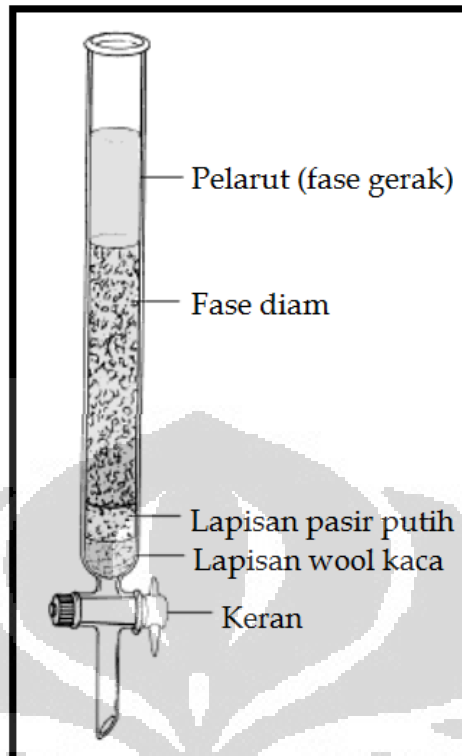
Definisi fraksinasi adalah proses penarikan atau pemisahan senyawa pada ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak bercampur. Proses pemisahan komponen yang diinginkan dengan komponen lain ini didasarkan pada prinsip kepolaran senyawa dan pelarut. Dimana, senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar (Harborne, 1987).

Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi adalah pelarut dengan kepolaran berbeda, yakni seperti *n*-heksan, diklorometan, etil asetat, dan metanol. Dalam hal ini, untuk menarik lemak dan senyawa non polar dapat digunakan *n*-heksan, untuk menarik senyawa non polar juga dapat digunakan diklorometan, untuk menarik senyawa semi polar seperti alkaloid dapat digunakan etil asetat atau kombinasi diklorometan dengan metanol, sedangkan untuk menarik senyawa-senyawa polar dapat digunakan metanol (Nurmillah, 2009; Hossain, El-Sayed, Mohamed, Sheded, & Aoshima, 2010; Oloyede, Onocha, Soyinka, Oguntokun, & Thonda, 2010; Ndie, Nnamani, & Oselebe, 2010; Rocha *et al.*, 2011; Lebreton *et al.*, 2011).

Metode yang dapat digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa umumnya berupa metode kromatografi, yakni kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis.

2.4.2.1 Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi kolom adalah salah satu metode yang digunakan untuk pemisahan senyawa dalam jumlah besar (lebih besar dari KLT) (Chik, Amid, & Jamal, 2010). Metode ini digunakan untuk memisahkan berbagai komponen organik dalam sampel, seperti flavonoid, tanin, asam fenolat, steroid, kuinon hingga alkaloid (Dai & Mumper, 2010; Paitz, Bowden, & Casto, 2011; Lin *et al.* 2012; Islam, Sohrab, & Jabar, 2012). Pada kromatografi kolom sampel yang akan dipisahkan komponen yang terkandung di dalamnya ditempatkan pada bagian atas kaca silinder setelah fase diamnya yang dipisahkan dengan kertas saring. Pada bagian bawah kaca silinder ditempatkan wool kaca dan pasir putih. Sebelum sampel ditempatkan pada kaca silinder, fase diam terlebih dahulu dibilas dengan pelarut secara kontinu dengan urutan komponen kolom seperti penjelasan di atas (Gambar 2.5) dan fase diam dibiarkan memadat (Pavia, Lampman, Kriz, & Engel, 2005). Hal ini dilakukan untuk menyeragamkan kepadatan absorbent. Adapun pengisian kolom yang tidak seragam dapat menghasilkan rongga-rongga ditengah kolom yang akan mengganggu proses pemisahan dalam kolom (Adnan, 1997).



[Sumber : Pavia, Lampman, Kriz, & Engel, 2005, telah diolah kembali]

Gambar 2.5. Kromatografi kolom

Fase diam (fase stasioner) yang sering digunakan pada kromatografi kolom adalah silika gel, selulosa, dan alumina (Ma, Xu, Jensen, Roth, Chen, & Lee, 2008; Krasteva & Nikolov, 2008; Jozwiak & Hajnos, 2007). Sedangkan fase geraknya dapat berupa pelarut tunggal maupun kombinasi dua pelarut dengan kepolaran berbeda pada perbandingan tertentu. Aplikasi penggunaan pelarut saat melangsungkan kromatografi kolom, yaitu dimulai dari pelarut dengan kepolaran rendah menuju pelarut dengan kepolaran yang lebih tinggi melalui tahap peningkatan kepolaran secara bertahap (Umthong, Phuwapraisirisan, Puthong, & Chanchao, 2011).

Pemisahan dengan kromatografi kolom akan memberikan fraksi-fraksi yang mengandung komponen tertentu sesuai kepolaran pelarut yang memisahkannya. Untuk menyederhanakan fraksi yang diperoleh berdasar kemiripan, mula-mula masing-masing fraksi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi mirip yang diperoleh selanjutnya digabung dan pelarutnya diuapkan dengan penguap putar pada suhu kurang dari 50°C atau sekitar 40°C

(Mahendra, Murthy, Narasimha, Bala, & Machiraju, 2011; Umthong, Phuwapraisirisan, Puthong, & Chanchao, 2011).

2.4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah bagian dari kromatografi cair. Dimana fase gerak pada metode ini berupa cairan dan fase diamnya dilekatkan pada lapisan tipis dengan permukaan yang rata atau berupa padatan absorben (Fried & Sherma, 2005).

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi atau gabungannya (Harmita, 2006). Metode ini merupakan salah satu metode pemisahan untuk tujuan kualitatif yang telah banyak digunakan. Kelebihan yang dimilikinya adalah penggunaan yang mudah, pemisahan yang cepat, sensitifitas yang tinggi, dan dapat digunakan untuk berbagai macam sampel dengan biaya yang relatif murah. Komponen-komponen yang dapat dipisahkan dengan metode KLT misalnya seperti asam amino dalam protein, komponen alkaloid pada tanaman, steroid dalam urin, morfin dalam plasma darah, hingga pestisida dalam tanah (Touchstone, 1992).

KLT dapat memberikan pemisahan hingga satuan miligram, mikrogram, nanogram, dan pikrogram. Komponen yang dipisahkan tersebut selanjutnya dapat dikarakterisasi dengan teknik mikroanalisis lain seperti kromatografi gas, KCKT, UV, IR, NMR, dan spektrofotometer massa (Touchstone, 1992).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam KLT adalah:

a. Fase Diam

Penjerap atau fase diam merupakan fase padat (*adsorbent*) yang dilekatkan pada penyangga padat untuk mendapatkan lapisan tipis stabil dan homogen dengan ketebalan kurang lebih 0,1–0,25 mm atau disesuaikan dengan maksud percobaan (Touchstone & Dobbins, 1983; Wall, 2005; Harmita, 2006).

Penyangga yang digunakan dapat berupa lempeng tipis yang terbuat dari bahan gelas, plastik, dan aluminium dengan ukuran standar 20 x 20 cm dan 20 x 5 cm. Lempeng dengan ukuran lain yakni 10 x 20 cm dan 20 x 40 cm atau disesuaikan dengan jenis percobaan. Untuk pekerjaan dengan skala kecil dapat digunakan lempeng mikro yang terbuat dari gelas obyek mikroskop (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991; Sastrohamidjojo, 2000; Harmita, 2006)

Penjerap yang dilekatkan dalam penyangga dapat berupa penjerap tunggal maupun campuran penjerap dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Penjerap dalam KLT dapat berupa alumina, karkoal, dan florisol sebagai penjerap paling kuat serta silika gel sebagai penjerap paling lemah. Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel dan alumina (Touchstone, 1992; Shrivastav, Sindhu, S. Kumar, & P. Kumar., 2009). Ukuran partikel dan kepadatan penjerap sangat menentukan laju perambatan, dimana semakin halus ukuran partikel maka akan semakin lambat perambatannya. Dalam hal ini, ukuran partikel penjerap dapat berkisar antara 0,1–40 μm (Harmita, 2006).

b. Indikator fluoresensi

Penampakan bercak dalam KLT dapat dibantu dengan penambahan indikator fluoresensi pada lapisan tipis. Pada panjang gelombang yang sesuai, lapisan yang mengandung indikator fluoresensi tersebut dapat menampakan pendar dengan warna tertentu. Jika senyawa mengandung ikatan rangkap terkonjugasi seperti cincin aromatik, maka sinar UV yang masuk tidak akan mencapai indikator fluoresensi pada bercak senyawa tersebut sehingga hasil yang tampak adalah berupa bercak gelap dengan latar belakang berfluoresensi. Konsentrasi indikator yang terkandung pada penjerap umumnya yakni sebesar 1%. Dalam hal ini, indikator yang dapat digunakan untuk alkaloid umumnya adalah reagen Dragendorf (1,7% bismut nitrat dalam 20% asam asetat dan 40 gram kalsium iodida dalam 100 mL air). Pendar yang dihasilkan dari indikator ini bersama senyawa alkaloid adalah pendar berwarna jingga (Gritter, Bobbit, & Schwarting, 1991).

c. Fase Gerak

Pemisahan yang optimal sangat ditentukan oleh pasangan fase diam dan fase gerak yang cocok untuk campuran yang dipisahkan (Harmita, 2006). Sifat dan komposisi kimia fase gerak disesuaikan dengan jenis zat yang dipisahkan dan jenis penjerap yang digunakan dalam pemisahan. Komposisi fase gerak ini dapat berupa pelarut murni maupun campuran dari beberapa macam pelarut (Touchstone & Dobbins, 1983). Pelarut yang digunakan harus memiliki selektifitas yang baik untuk memisahkan komponen yang diinginkan. Prinsipnya, suatu komponen yang relatif larut dalam pelarut tertentu akan terelusi lebih cepat

dibanding komponen lainnya. Pada penggunaan pelarut, hal yang perlu diperhatikan adalah kemurnian pelarut, penggunaan campuran pelarut yang hanya dapat digunakan maksimal dua sampai tiga kali, perubahan komposisi campuran pelarut akibat penyerapan atau penguapan, dan reaksi antar komponen campuran pelarut (Harmita, 2006).

d. Penyiapan Sampel

Tahap penyiapan sampel dilakukan dalam upaya untuk membuat sampel sesuai dan siap untuk dianalisis secara kromatografi (Touchstone & Dobbins, 1983). Tahap persiapan ini diawali dengan pelarutan sampel pada pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Sampel yang telah dilarutkan selanjutnya ditotolkan pada garis mula berupa titik. Penotolan ini sebaiknya memiliki diameter 2–5 mm dengan konsentrasi umumnya antara 0,1 sampai 1 % sebanyak 1 hingga 20 μL (Stahl, 1969).

e. Proses Elusi

Ujung lempeng yang telah ditotolkan sampel dibenamkan dalam fase gerak dengan titik totolan sampel tetap berada di atas cairan. Proses elusi akan terjadi bila fase gerak bermigrasi melewati media (fase diam) pada lempeng melalui gaya kapiler. Proses tersebut dilakukan dalam bejana dengan ukuran sesuai yang terlebih dahulu telah dijenuhkan dengan pelarut yang digunakan. Jika migrasi fase gerak hampir mencapai ujung lempeng lainnya, maka lempeng dipindahkan dan dikeringkan untuk selanjutnya bercak yang timbul dideteksi dengan metode yang sesuai (Touchstone & Dobbins, 1983).

f. Deteksi

Bercak yang timbul pada lempeng dapat dianalisis melalui beberapa metode. Secara garis besar, metode itu dapat berupa metode kimia dan metode fisika. Masing-masing dari metode tersebut dapat bersifat destruktif (memberikan perubahan permanen dari zat yang diidentifikasi) dan non destruktif (tidak memberikan perubahan permanen pada zat yang diidentifikasi). Dalam hal ini, metode yang paling umum digunakan adalah metode fisika, yaitu dengan melakukan pengamatan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 atau 366 nm dengan bantuan penampak noda seperti larutan iod, FeCl_3 dan H_2SO_4 10% dalam metanol. Pada kebanyakan senyawa metode ini bersifat non destruktif,

kecuali pada beberapa steroid dan vitamin yang diketahui dapat bersifat destruktif (Touchstone & Dobbins, 1983).

Posisi dari bercak yang teramati pada lempeng kromatogram dinyatakan dengan derajat retensi (Rf). Derajat retensi (Persamaan 2.1) merupakan hasil bagi antara jarak yang ditempuh bercak sampel dari garis mula dengan jarak yang ditempuh pelarut dari garis mula (Stahl, 1969).

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

Faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam kromatografi lapis tipis dan juga mempengaruhi harga Rf yakni struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan, sifat dari penjerap dan derajat aktifitasnya, tebal kerapataan dari lapisan penjerap, kemurnian pelarut, derajat kejenuhan dari uap, serta jumlah cuplikan yang digunakan (Sastrohamidjojo, 2001).

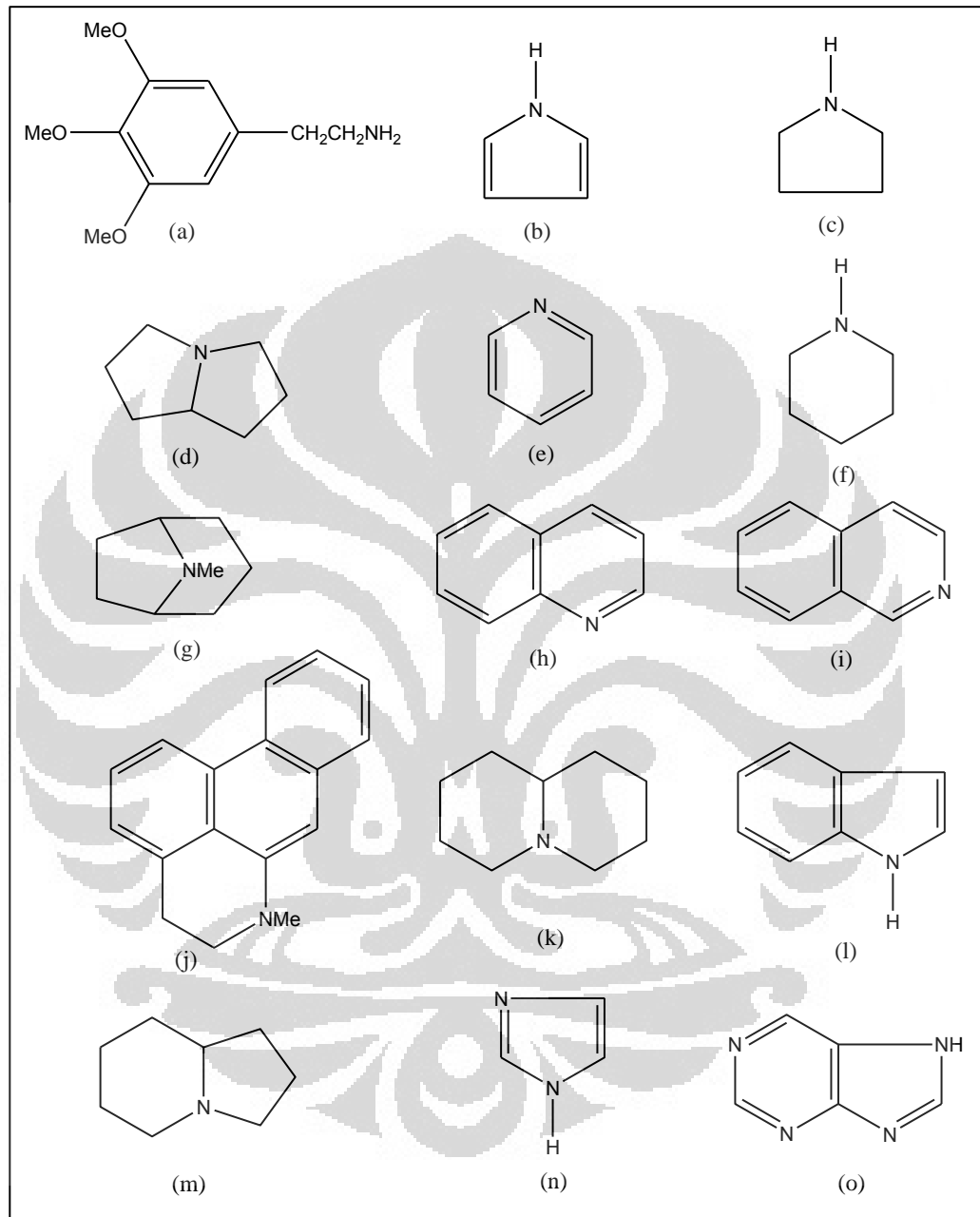
2.5 Penapisan Fitokimia Alkaloid

2.5.1 Golongan Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa dengan satu atau lebih atom nitrogen yang umumnya berada dalam bentuk gabungan sistem siklik. Golongan senyawa ini biasanya memiliki aktivitas farmakologis pada manusia dan hewan. Ciri-ciri alkaloid umumnya berbentuk padat (kristal), walaupun ada yang cair dalam suhu kamar (contohnya nikotin), memutar bidang polarisasi, berasa pahit, larut air dalam bentuk garam dan larut dalam pelarut organik (tidak larut dalam air) dalam bentuk bebas atau basanya (Harborn, 1987).

Alkaloid secara umum dapat digolongkan berdasar strukturnya menjadi alkaloid heterosiklik dan alkaloid non heterosiklik. Atom N pada alkaloid non heterosiklik dapat berupa atom N primer (meskalin), sekunder (efedrin), tersier (atropin), atau kuarternar (tubokurarin). Sedangkan alkaloid heterosiklik dapat diklasifikasikan lagi berdasarkan struktur cincin yang dimilikinya (Gambar 2.6), yakni pirol atau pirolidin (higrin), pirolizidin (seneklonin), piridin dan piperidin (piperin, lobelin), tropan (kokain), kuinolin (kuinin, kuinidin), aporfin (boldin),

kuinolizidin (spartein), indol atau benzopirrol (ergometrin), indolizidin (swainsonin), imidazol (pilocarpin), purin (kafein), steroidal (solanidin), dan terpenoid (akonitin) (Evans, 1996).



Keterangan : a. Meskalin; b. Pirol; c. Pirolidin; d. Pirolizidin; e. Piridin; f. Piperidin; g. Tropan; h. Kuinolin; i. Isokuinolin; j. Aporfin; k. Kuinolizidin; l. Indol; m. Indolizidin; n. Imidazol; o. Purin.

Gambar 2.6. Struktur cincin alkaloid heterosiklik.

2.5.2 Penapisan Fitokimia

Proses penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan ditujukan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki manfaat terapeutik, seperti alkaloid, flavonoid, glikosida, terpen, tannin, saponin, antrakuinon, dan kuinon (Harborn, 1987).

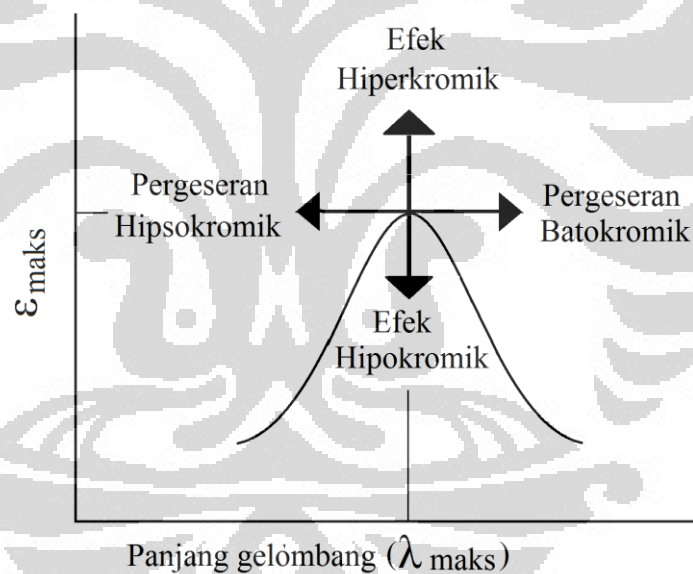
Alkaloid dapat diketahui secara kualitatif dengan pereaksi alkaloid, yaitu dengan mengujinya dengan reagen Mayer, Dragendorff dan Bouchardart. Reagen Mayer mengandung garam logam berat berupa Kalium Raksa Iodida yang bereaksi dengan nitrogen alkaloid membentuk endapan. Reagen Dragendorff mengandung Bismuth-Kalium Iodida yang bereaksi dengan nitrogen alkaloid membentuk endapan, sedangkan reagen Bouchardart terdiri dari Iodium-Kalium Iodida yang bereaksi dengan alkaloid membentuk garam kompleks berwarna yang sukar larut dalam air (Roth & Blaschke, 1988).

2.6 Karakterisasi Senyawa

3.2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis

Data spektrofotometer UV-Vis diperlukan dalam elusidasi struktur suatu senyawa. Kegunaan spektrofotometer elektronik ini terletak pada kemampuannya mengukur jumlah ikatan rangkap atau konjugasi aromatik dalam suatu molekul (Supratman, 2010). Menurut Harmita (2007), informasi yang dapat diperoleh dari alat ini yakni salah satunya berupa panjang gelombang maksimum suatu senyawa. Panjang gelombang cahaya ultraviolet adalah terentang antara 200-400 nm sedangkan tampak berjangka 400 nm (ungu) ke 750 nm (merah) (Supratman, 2010). Oleh karena itu, hanya senyawa yang membentuk spektrum di rentang panjang gelombang tersebut yang dapat diperiksa dengan spektrofotometer UV-Vis. Istilah-istilah terkait senyawa yang mampu memberikan serapan di daerah UV-Vis yaitu dikenal dengan kromofor dan auksokrom. Kromofor (*chromophore*) adalah suatu gugus kovalen tak jenuh yang bertanggung jawab terhadap serapan elektronik (gugus fungsi yang menyerap radiasi pada daerah ultraviolet). Struktur kromofor ini memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, seperti benzen, diena, dan dienon. Auksokrom (*auxochrome*) adalah gugus jenuh yang bila terikat suatu

kromofor akan mempengaruhi panjang gelombang (λ) dan intensitas serapan maksimum, yakni seperti $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, dan $-\text{Cl}$ (Kosela, 2010). Jenis pergeseran dalam spektrofotometer UV-Vis dapat dibedakan menjadi pergeseran batokromik, hipsokromik, hiperkromik, dan hipokromik (Gambar 2.7). Pergeseran batokromik (*bathochromic shift*) atau pergeseran merah adalah pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih besar akibat pengaruh pelarut atau substituen. Pergeseran hipsokromik (*hypsochromic shift*) atau pergeseran biru adalah pergeseran serapan maksimum ke panjang gelombang yang lebih pendek akibat pelarut atau substituen. Efek hiperkromik (*hyperchromic shift*) adalah efek yang mengakibatkan kenaikan intensitas serapan dikarenakan oleh pekatnya konsentrasi zat terlarut. Efek hipokromik (*hypochromic shift*) adalah efek yang menyebabkan penurunan intensitas serapan, diakibatkan oleh rendahnya konsentrasi zat terlarut (Kosela, 2010; Supratman, 2010).



[Sumber: Supratman, 2010, telah diolah kembali]

Gambar 2.7. Terminologi pergeseran posisi pita serapan

Pelarut yang digunakan dalam pengukuran spektrum UV-Vis harus pelarut yang tidak memberikan serapan pada panjang gelombang pengukuran. Pelarut yang umumnya digunakan adalah metanol, etanol, air, pentana, heksana, dan sikloheksana (Supratman, 2010).

2.6.2 Spektrofotometer Inframerah

Salah satu instrumen yang dapat digunakan untuk menentukan spektrum absorpsi pada suatu komponen adalah spektrofotometer inframerah. Pada karakterisasi senyawa organik umumnya instrumen ini terbagi menjadi dua buah tipe, yaitu tipe dispersif dan transformasi Fourier (*Fourier transform* atau *FT*). Kedua tipe instrumen ini akan memberikan spektrum pada rentang 4.000 hingga 400 cm^{-1} . Perbedaan dari kedua instrumen ini adalah pada kecepatannya dalam pembentukan spektrum, dimana spektrofotometer inframerah tipe *FT* akan memberikan spektrum inframerah yang lebih cepat dibanding tipe dispersif (Pavia, 2009).

Spektrum inframerah adalah bagian dari spektrum elektromagnetik yang memiliki frekuensi di bawah cahaya tampak. Daerah spektrum inframerah elektromagnetik merupakan daerah cahaya dengan panjang gelombang 2,5-15 μm , dimana penyerapan cahaya di daerah ini dapat menyebabkan perubahan energi getaran molekul pada keadaan dasarnya. Transisi getaran tersebut akan terkait pada putaran atom di sekitar ikatan kimia. Hal ini analog dengan transisi elektronik pada penyerapan energi ultraviolet yang juga menghasilkan transisi getaran dan putaran (Cairns, 2004).

Kurva spektrum inframerah yang dihasilkan terdiri dari absis berupa bilangan gelombang dan ordinat berupa intensitas serapan. Hal yang perlu diperhatikan dalam menganalisis kurva spektrum ini adalah bilangan gelombang, bentuk puncak serapan (sempit, tajam atau melebar), dan intensitas puncak serapan (kuat, sedang atau lemah) (Kosela, 2010).

Masing-masing puncak pada spektrum inframerah tersebut dapat diterjemahkan sebagai suatu ikatan atau gugus fungsi tertentu di dalam molekul. Dengan kata lain, spektrum inframerah adalah kompleks yang memungkinkan terdapat 20 hingga 30 puncak yang berada dalam satu spektrum. Akan tetapi, karakterisasi pada senyawa kimia yang belum diketahui dapat ditentukan dengan lebih mudah karena beberapa gugus fungsi selalu tampak pada daerah spektrum inframerah yang sama. Sebagai contoh ikatan-ikatan tunggal seperti O–H, N–H, dan C–H akan menyerap pada bagian spektrum berfrekuensi tinggi (kira-kira 4.000-2.100 cm^{-1}). Hal ini disebabkan oleh rendahnya massa atom hidrogen yang

menyebabkan getaran terjadi pada frekuensi tinggi. Ikatan rangkap tiga seperti $CN\bar{}$ menyerap pada frekuensi kira-kira $2.100-1.900\text{ cm}^{-1}$, sementara ikatan rangkap dua seperti $C=O$ dan $C=C$ menyerap pada frekuensi kira-kira $1.900-1.500\text{ cm}^{-1}$ (Cairns, 2004). Dengan kata lain, besarnya bilangan gelombang bergantung pada kekuatan ikatan dan massa atom pada suatu ikatan kimia. Oleh karena itu, spektrofotometer inframerah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul (Supratman, 2010).

Daerah spektrum inframerah yang memiliki bilangan gelombang kira-kira kurang dari 1.500 cm^{-1} akibat peregangan molekul secara keseluruhan akan menghasilkan puncak yang lebih sulit diterjemahkan secara akurat. Daerah spektrum ini disebut daerah sidik jari, karena pola puncak yang terjadi pada daerah ini khas bagi tiap senyawa dan tidak ada senyawa lain yang memilikinya. Sifat-sifat ini digunakan untuk menyatakan kesamaan dari senyawa yang diujikan. Dimana, dua buah sampel akan dikatakan sama jika spektrum inframerah yang diperoleh pada kondisi yang sama serupa secara keseluruhan, yaitu puncak yang sama dan berada pada posisi serta intensitas yang sama (Cairns, 2004).

2.6.3 Spektrofotometri Resonansi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$)

Sesuai dengan namanya, spektrofotometri resonansi magnet inti berhubungan dengan sifat magnet dari inti atom (Sudjadi, 1985). Terkait hal ini, spektrofotometri resonansi magnetik inti proton berawal dari ditemukannya inti-inti atom seperti ^1H , ^{13}C , ^{19}F , dan ^{31}P yang dapat berperan sebagai magnet batang kecil. Dalam hal ini, inti atom hidrogen sebagai atom yang sering dijumpai pada senyawa organik menjadi dasar adanya spektrofotometri magnetik inti proton. Atom hidrogen ini memiliki beberapa isotop, yakni ^2H (Deuterium) dan ^3H (Tritium). Namun, di alam ^1H ditemukan dalam jumlah kelimpahan terbesar yaitu sebanyak 99,985% (Kosela, 2010).

Spektrofotometri resonansi magnetik inti proton merupakan instrumen yang berguna dalam karakterisasi struktur molekul organik. Teknik ini menyajikan data berbagai jenis atom hidrogen dalam molekul yang dianalisis. Selain itu, spektrum $^1\text{H-NMR}$ juga memberikan informasi mengenai lingkungan kimia atom hidrogen, jumlah atom hidrogen dalam setiap lingkungan, dan struktur

gugusan yang berdekatan dengan setiap atom hidrogen (Cresswell, 1982). Data yang diberikan dalam spektrum $^1\text{H-NMR}$ yakni berupa jumlah sinyal, kedudukan sinyal, intensitas sinyal, dan pemecahan puncak. Dalam hal ini, jumlah sinyal pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi mengenai banyaknya jenis atom hidrogen. Kedudukan sinyal menandakan jenis lingkungan kimia tempat atom hidrogen tersebut berada. Intensitas sinyal adalah gambaran dari jumlah atom hidrogen pada lingkungan kimia tertentu. Sementara itu, pemecahan puncak (*splitting*) menerangkan tentang lingkungan kimia dari atom hidrogen lainnya yakni atom hidrogen yang berdekatan (tetangga) (Silverstein, Basseler & Morrill, 1991).

Penentuan struktur senyawa organik melalui spektrofotometer resonansi magnetik inti proton pada dasarnya merupakan pengukuran momen magnet atom hidrogen dalam senyawa tersebut. Pada sebagian besar senyawa, atom hidrogen dapat terikat pada gugus yang berbeda, yaitu seperti $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{CHOH}$ -, dan $-\text{NH}_2$. Dalam hal ini, spektrum yang dihasilkannya merupakan gambaran sejumlah atom hidrogen yang berada dalam keadaan lingkungan atau kedudukan yang berlainan (Harbone, 1987). Sinyal-sinyal yang terjadi akibat perbedaan kedudukan atom hidrogen dalam suatu lingkungan kimia tersebut akan memberikan frekuensi resonansi yang berbeda. Dimana, perbedaan kedudukan pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ ini dikenal sebagai geseran kimia. Geseran kimia merupakan perbandingan antara kekuatan perlindungan terhadap inti dengan medan terapan yang digunakan. Semakin kecil frekuensi resonansinya, maka kerapatan elektronnya makin besar, sementara itu, pergeseran kimia protonnya akan semakin kecil, begitu pula sebaliknya. Faktor-faktor yang mempengaruhi pergeseran kimia ini diantaranya adalah faktor induktif, faktor anisotropik, faktor sterik, ikatan hidrogen, dan pelarut yang digunakan (Silverstein, Basseler & Morrill, 1991).

Pelarut yang digunakan merupakan pelarut dengan viskositas rendah. Selain itu, pelarut juga harus dapat melarutkan cuplikan dan tidak memberikan sinyal. Pelarut organik yang umumnya digunakan, yaitu seperti CCl_4 , CS_2 , CDCl_3 , D_2O , C_6D_6 , dan $(\text{CCl}_3)_2\text{COO}$ (Silverstein, Bassler, & Morrill, 1986).

2.6.3 Spektrofotometri Resonansi Magnetik Inti Karbon (^{13}C -NMR)

Kelimpahan ^{13}C di alam sangat kecil yaitu kira-kira 1,1% dibandingkan dengan ^1H (99,98). Oleh karena itu, perkembangan ^{13}C -NMR lebih lambat dibandingkan ^1H -NMR. Namun, senyawa yang mengandung atom karbon dapat diukur dengan ^{13}C -NMR dan data spektrumnya sangat membantu data ^1H -NMR dalam menentukan struktur senyawa kimia. Hal ini karena melalui instrumen ini dapat diketahui informasi mengenai jumlah sinyal karbon dalam senyawa organik, pemecahan sinyal karbon yang tergantung dari jumlah atom hidrogen terikat, jenis karbon, serta lingkungan elektronik yang mempengaruhi pergeseran kimia dari masing-masing atom karbon pada molekul senyawa organik (Supratman, 2010).

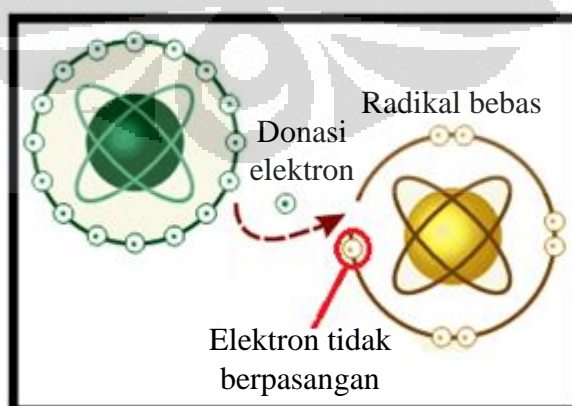
Spektrum utama dalam ^{13}C -NMR dapat digolongkan menjadi dua jenis, yaitu spektrum yang menunjukkan pola pemisahan spin-spin ^{13}C - ^1H dan spektrum yang tidak menunjukkan pola tersebut. Pada kedua tipe spektrum tersebut, digunakan TMS sebagai standar internal, dan pergeseran kimia diukur pada medan lemah dari sinyal TMS. Pergeseran kimia (δ) pada spektrum ^{13}C -NMR jauh lebih besar dari pada pergeseran kimia pada spektrum ^1H -NMR. Kebanyakan proton dalam senyawa organik menunjukkan serapan pada medan lemah terhadap TMS pada harga δ_{H} 0-10 ppm. Hanya beberapa proton seperti aldehid, karboksil, dan enol yang menunjukkan posisi pergeseran kimia di luar jarak tersebut. Serapan karbon-13 diamati pada medan lemah terhadap TMS pada jarak δ_{C} 0-230 ppm, sehingga spektrum yang muncul kurang tumpang tindih dibanding dengan spektrum ^1H -NMR. Pergeseran kimia pada spektrofotometri ^{13}C -NMR mirip dengan spektrofotometri ^1H -NMR, TMS menyerap pada medan kuat, sementara karbon, aldehid, dan karboksil menyerap pada medan lemah (Kosela, 2010; Supratman, 2010). Pergeseran kimia spektrofotometri ^{13}C -NMR dapat dipengaruhi oleh elektronegativitas gugus pengganti (substituen), efek pelarut, dan hibridisasi (Harmita, 2007). Dalam hal ini, atom C sp^3 menyerap pada medan paling kuat diikuti oleh C sp dan akhirnya atom C sp^2 yang menyerap pada medan yang paling lemah (Kosela, 2010).

2.6 Radikal Bebas dan Antioksidan

2.7.1 Radikal Bebas

2.7.1.1 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas menurut Fang, Yang, dan Wu (2002) adalah suatu atom, gugus atom, atau molekul dengan elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya (Gilbert, 2000; Defeng & Arthur, 2003). Adanya molekul dengan elektron yang tidak berpasangan ini membuat radikal bebas bersifat sangat reaktif. Reaktif artinya mempunyai spesifisitas yang rendah sehingga mampu bereaksi dengan molekul-molekul yang berada disekitarnya. Molekul-molekul tersebut termasuk protein, lipid, karbohidrat, dan DNA. Reaktif juga berarti tidak bertahan lama dalam bentuknya karena untuk mempertahankan kestabilan molekul maka radikal bebas harus mengambil satu elektron dari molekul yang lain (Gambar 2.8). Artinya, radikal bebas menyerang molekul stabil yang berada di dekatnya dan mengambil elektron dari molekul tersebut. Molekul yang diambil elektronnya kemudian juga menjadi radikal bebas dan mengambil elektron dari molekul lain, begitulah seterusnya sampai terjadi kerusakan sel (Wu & Cederbaum, 2003; V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005). Molekul-molekul yang sangat reaktif ini sebagian besar berasal dari oksigen maka secara umum molekul-molekul tersebut disebut *reactive oxygen species* (ROS), misalnya berupa radikal superoksida, hidroksil, peroksil (RO_2^\bullet), alkoksil (RO^\bullet), dan hidroperoksil (HO_2^\bullet). Sedangkan nitrit oksida (NO^\bullet) dan nitrogen dioksida (NO_2^\bullet) merupakan contoh dari radikal nitrogen yang dikenal dengan *reactive nitrogen species* (RNS) (Lima, 2004).



[Sumber: Teo, 2011, telah diolah kembali]

Gambar 2.8. Mekanisme radikal bebas dalam memperoleh keadaan stabil.

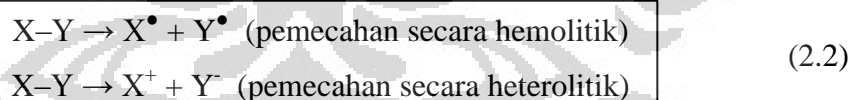
2.7.1.2 Asal Radikal Bebas

Radikal bebas dapat bermuatan positif, negatif atau netral. Elektron yang tidak berpasangan dapat menambah molekul yang bersifat netral sehingga molekul tersebut menjadi bermuatan negatif. Molekul bermuatan negatif juga dapat terbentuk dari molekul bermuatan positif yang kehilangan elektron. Molekul yang asalnya tidak netral dengan penambahan atau pengurangan elektron dapat menjadi netral (Lima, 2004).

Radikal bebas dapat ditimbulkan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dengan mekanisme sebagai berikut (V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005; Kumar, 2011):

a. Pemecahan ikatan kovalen dari molekul atau atom normal

Pemecahan ikatan kovalen dapat terjadi melalui dua cara, yakni secara homolitik dan heterolitik (Persamaan 2.2). Pemecahan secara homolitik terjadi jika kedua atom fragmen masing-masing membawa satu buah elektron akibat pemecahan ikatan secara simetris. Hasil dari pemecahan tersebut adalah berupa radikal bebas. Cara ini tidak lazim pada sistem biologi karena memerlukan energi yang tinggi, seperti sinar ultra violet atau radiasi ion. Sementara itu, pemecahan heterolitik terjadi jika salah satu atom fragmen membawa kedua elektron bonding sementara atom fragmen yang lain tidak membawa elektron. Hasil dari pemecahan dengan cara tersebut adalah berupa ion.



b. Transfer elektron dari suatu molekul.

Sebagian besar radikal bebas terbentuk di dalam sel melalui transfer elektron di mitokondria dan retikulum endoplasmik. Transfer elektron tersebut dapat diperantarai secara enzimatik atau non enzimatik. Mekanisme ini terdiri dari dua reaksi, yaitu reaksi oksidasi yaitu kehilangan satu elektron pada molekul normal dan reaksi reduksi yaitu penambahan satu elektron pada molekul yang normal.

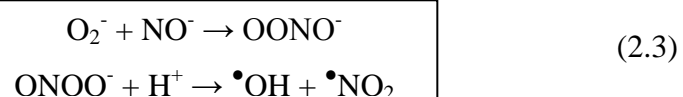
2.7.1.3 Tipe Radikal Bebas

Radikal bebas yang paling umum di dalam tubuh adalah radikal yang berasal dari oksigen. Di dalam tubuh oksigen terlibat dalam transfer berbagai macam substansi baik ditujukan untuk mensuplai energi maupun detoksifikasi xenobiotik. Pada proses ini oksigen berperan sebagai akseptor elektron terminal yang secara cepat dikonversi oleh sistem sitokrom oksidase di mitokondria menjadi air (H_2O). Reaksi reduksi pada satu molekul oksigen pada proses tersebut membutuhkan 4 elektron yang dikenal dengan sebutan reduksi transvalen. Namun demikian, pada kondisi tertentu reaksi reduksi dapat terjadi secara univalen dan berpotensi menghasilkan radikal bebas yang disebut *reactive oxygen species* (ROS) (V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005). Radikal bebas oksigen dapat berupa radikal superoksida ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil ($\bullet OH$), hidroperoksil (HOO^{\bullet}), peroksil (LOO^{\bullet}), dan alkoksil (LO^{\bullet}). Radikal bebas ini dapat dikonversi menjadi senyawa non radikal yang reaktif, yakni seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), alkil hidroperoksida ($LOOH$), singlet oksigen (1O_2), dan ozon (O_3) (Fang, Yang, & Wu, 2002; Lima, 2004). Sedangkan tipe radikal bebas lainnya adalah *reactive nitrogen species* (RNS), termasuk nitrit oksida dan peroksi nitrit.

a. Radikal bebas anion Superoksida ($\bullet O_2^-$)

Anion superoksida terbentuk jika oksigen direduksi melalui transfer satu elektron (Lee, Koo, & Min, 2004). Secara *in vivo*, menurut Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, dan Telser (2007) sumber utama superoksida berasal dari rantai transport elektron pada mitokondria (Cadenas & Sies, 1998). Sumber utama lainnya adalah melalui aktivasi enzim NADPH oksidase yang terdapat pada monosit atau makrofag (Cathcart, 2004).

Lee, Koo, dan Min (2004) melaporkan bahwa anion superoksida dapat bereaksi dengan nitrit oksida (NO^-) dan membentuk peroksi nitrit ($ONOO^-$) yang dapat menyebabkan timbulnya radikal hidroksil ($\bullet OH$) dan nitrit dioksida ($\bullet NO_2$) yang toksik (Halliwell, 1997) (Persamaan 2.3).



b. Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

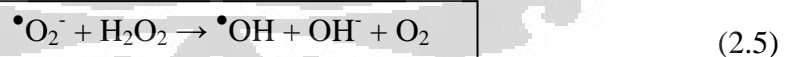
Hidrogen peroksida merupakan agen pengoksidasi yang dapat membentuk radikal hidroksil melalui reaksi Fenton dengan ion metal transisi (terutama Fe²⁺ dan Cu⁺) serta dengan superoksida melalui reaksi Haber-Weiss (Lee, Koo, & Min, 2004; Storey, 2004; Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007). Bentuk radikal hidroksil ini dapat melintasi membran dan menyebabkan kerusakan DNA (V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005). Pada sistem biologi, hidrogen peroksida terbentuk dari superoksida. Pada Persamaan 2.4 dua molekul superoksida dapat bereaksi membentuk hidrogen peroksida dan oksigen (Lima, 2004).



c. Radikal Hidroksil (•OH)

Radikal hidroksil adalah radikal yang sangat reaktif. Radikal ini dapat bereaksi dengan hampir seluruh biomolekul. Kecepatan reaksi dalam proses tersebut tergolong konstan yaitu berkisar antara 10⁷ hingga 10¹⁰ Ms⁻¹. Reaksi ini berlangsung sangat cepat dan sangat tergantung pada kecepatan difusi •OH pada target didekatnya. Dalam hal ini, radikal hidroksil terlibat dalam proses inisiasi peroksidasi lipid pada membran biologis yang dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan protein, DNA, mitokondria, karbohidrat, dan RNA (Lima, 2004).

Pada tahun 1933 Fritz Haber dan Joseph Weiss menemukan bahwa radikal bebas hidroksil terbentuk dari reaksi superoksida dan hidrogen peroksida (reaksi Haber-Weiss) (Kehrer, 2000) (Persamaan 2.5).



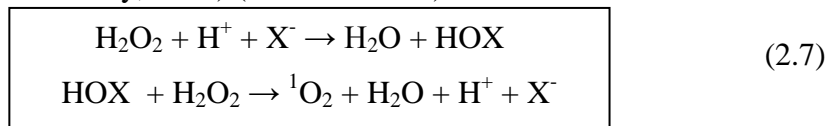
Henty Fenton mengemukakan bahwa radikal hidroksil dapat pula dibentuk dari hasil interaksi ion metal transisi (terutama Fe²⁺ dan Cu⁺) dengan hidrogen peroksida (Reaksi Fenton) (Lima, 2004) (Persamaan 2.6).



d. Singlet Oksigen (¹O₂)

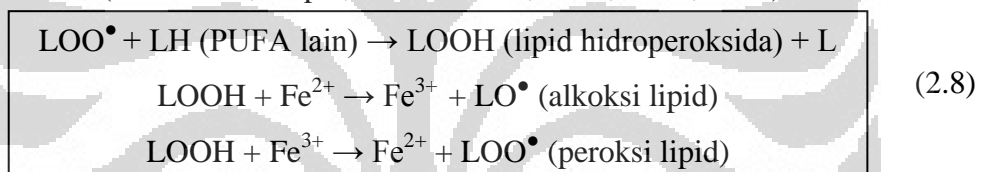
Singlet oksigen merupakan agen pengoksidasi yang sangat kuat yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan, termasuk pada asam lemak tidak jenuh (*poly unsaturated fatty acid*/ PUFA), residu asam amino protein, DNA, dan karotenoid (Lima, 2004). Singlet oksigen dapat terbentuk dari reaksi enzimatik, seperti

peroksidase pada reaksi hidrogen peroksida dengan halida (klorin dan bromin) (Kanofsky, 1988; Kanofsky, 2000) (Persamaan 2.7).



e. Lipida hidroperoksida (LOOH)

Lipida hidroperoksida merupakan senyawa non radikal reaktif yang dihasilkan melalui serangkaian proses peroksidasi lipida. Dimana, LOOH yang merupakan hasil reaksi antara radikal peroksida (LOO^\bullet) dengan PUFA, dapat melangsungkan reaksi lebih lanjut untuk membentuk radikal reaktif lainnya, seperti peroksi lipida, alkoksi lipida, dan aldehid (MDA atau malondialdehid) (Persamaan 2.8). Produk yang dihasilkan dari proses ini dapat menyebabkan destruksi langsung pada struktur membran dan destruksi tidak langsung dengan merusak struktur sel, DNA, RNA, sintesis protein, dan enzim terutama aldehid seperti MDA (V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005; Lima, 2004).



f. Nitrit Oksida (NO^\bullet)

Nitrit oksida merupakan radikal bebas dalam bentuk gas. Radikal ini telah dikenal sejak tahun 1980 sebagai faktor perelaksasi endotelium. Sel endotelium vaskuler menghasilkan nitrit oksida dari arginin dengan katalisator enzim nitrit oksida sintetase (NOS). Reaksi ini dapat distimulasi oleh sitokin melalui regulasi mRNA dalam transkripsi NOS (Lima, 2004).

Nitrit oksida yang berlebihan dalam tubuh dapat menyebabkan perubahan struktur protein dan mengganggu fungsi normalnya (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

g. Peroksi Nitrit (ONOO^\bullet)

Peroksi nitrit terbentuk dari hasil reaksi nitrit oksida dengan superoksida pada sel imun selama proses inflamasi. Radikal bebas ini merupakan agen pengoksidasi poten yang mampu menyebabkan fragmentasi DNA dan oksidasi lipid (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007).

2.7.1.4 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat bersumber dari tiga tempat, yaitu endogen, eksogen, dan faktor fisiologis (Kumar, 2011).

a. Sumber Endogen (Kumar, 2011)

Sumber endogen radikal adalah suatu proses yang melibatkan adanya reaksi enzimatik. Proses ini mencakup rantai respirasi, fagositosis, sintesis prostaglandin, dan sistem sitokrom P450. Sumber-sumber endogen yang berperan dalam produksi radikal bebas adalah mitokondria, xantin oksidase, fagosit, peroksisom, jalur arakhidonat, iskemia atau perfusi, inflamasi, reaksi biologis yang melibatkan logam besi dan logam transisi lainnya.

b. Sumber Eksogen (Kumar, 2011)

Sumber eksogen radikal bebas tidak melibatkan reaksi enzimatik, melainkan berupa reaksi non enzimatik oksigen dengan komponen organik. Sumber-sumber eksogen radikal bebas yaitu dapat berupa asap rokok, polutan, radiasi, sinar ultraviolet, ozon, obat-obatan tertentu, anestetik, dan pelarut di industri.

c. Faktor Fisiologis (Kumar, 2011)

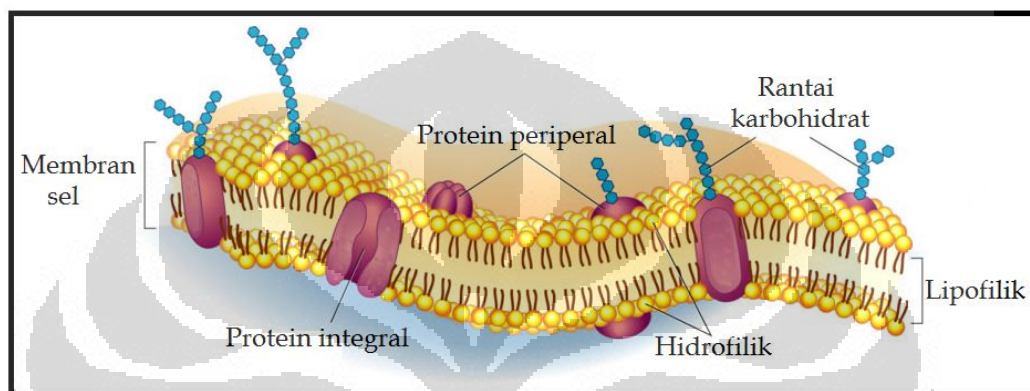
Faktor fisiologis radikal bebas terkait erat dengan keadaan mental seseorang termasuk stres, emosi, dan kondisi sakit.

2.7.1.5 Patofisiologi Radikal Bebas

Dalam keadaan normal radikal bebas yang terbentuk dapat dinetralkan oleh antioksidan tubuh, tetapi bila kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) yang toksik melebihi pertahanan tubuh untuk menetralkan dan mengeliminasinya maka akan terjadi suatu keadaan yang disebut stres oksidatif dan stres nitrosatif (Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006; Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telser, 2007). Pada tahap ini kelebihan radikal bebas dapat bereaksi dengan lipida, karbohidrat, protein, dan asam nukleat, sehingga menyebabkan kerusakan lokal bahkan dapat sampai terjadi disfungsi organ (Kumar, 2011). Dalam hal ini, lemak adalah molekul yang paling rentan untuk diserang radikal bebas.

a. Peroksidasi Lipida

Membran sel terdiri dari 2 lapisan yang kaya akan sumber asam lemak tak jenuh ganda (*Poly Unsaturated Fatty Acid* atau PUFA). Pada lapisan luar membran sel bersifat hidrofilik sedangkan lapisan dalam bersifat lipofilik (Gambar 2.9). Dibagian dalam membran sel terdapat protein yang merupakan bagian yang paling penting dari sel. Protein tersebut berfungsi mengontrol pergerakan ion atau berfungsi sebagai reseptor sel.



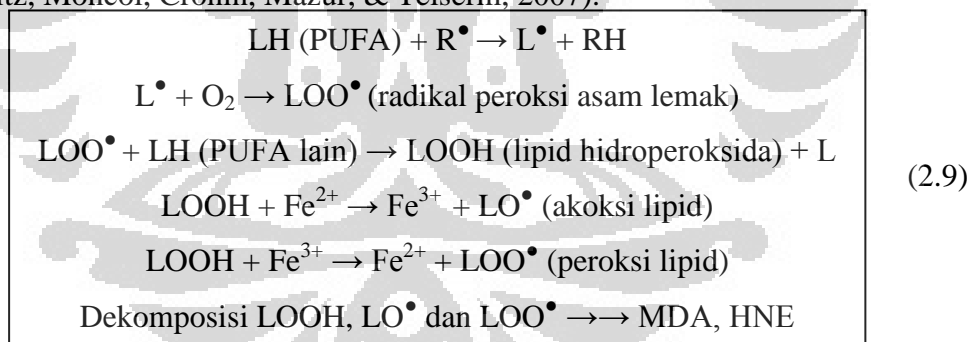
[Sumber: Kryk, n.d, telah diolah kembali]

Gambar 2.9. Membran protein

Peroksidasi lipida secara umum melibatkan suatu reaksi berantai yang difasilitasi oleh serangan radikal bebas. Dalam hal ini, radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) mengambil elektron dari lipida yang berada di membran sel. Sasaran ROS ini adalah karbon-karbon dengan ikatan ganda dari molekul PUFA. Adanya ikatan ganda ini menyebabkan ikatan antara karbon dan hidrogen menjadi lemah dan mudah terdisosiasi menjadi radikal bebas. Radikal bebas akan mengambil satu elektron dari hidrogen yang berikatan ganda dengan karbon. Molekul yang terbentuk kemudian bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil. Radikal peroksil kemudian mengambil satu elektron dari molekul lipid yang lain. Proses ini berlanjut sedemikian sehingga disebut sebagai reaksi berantai (Raju & Madala, 2005).

Reaksi berantai pada peroksidasi lipid diawali dengan serangan radikal bebas pada (LH) dari asam lemak tidak jenuh (PUFA). PUFA yang teroksidasi membebaskan radikal asam lemak (L^{\bullet}) dan secara cepat menangkap oksigen untuk membentuk radikal peroksida (LOO^{\bullet}). LOO^{\bullet} yang dihasilkan terlibat dalam reaksi berantai yang selanjutnya dapat mengoksidasi PUFA lain untuk

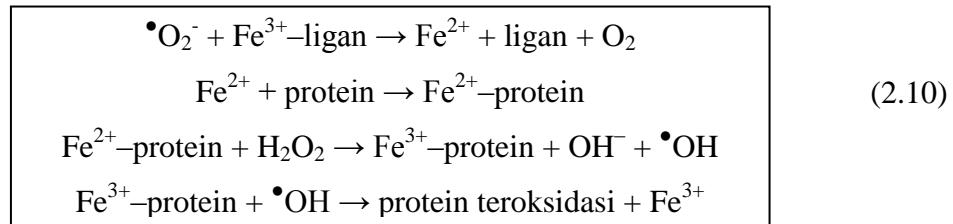
memproduksi LOOH (lipida hidroperoksida). LOOH tersebut mampu mencetuskan pembentukan radikal reaktif peroksi lipida dan alkoksi lipida yang dapat merusak membran sel serta menyebabkan terbentuknya produk toksik peroksidasi seperti aldehid (MDA atau malondialdehid) (V. Tandon, Gupta, & R. Tandon, 2005; Lima, 2004) (Persamaan 2.9). Menurut Storney (2004) metabolit dialdehid tersebut dapat bertaut silang dan beragregasi dengan protein. Dalam hal ini, residu valin pada hemoglobin bersifat sangat reaktif dengan MDA dan mampu membentuk produk yang stabil dengan waktu paruh selama beberapa hari. MDA ini juga mampu berinteraksi dengan DNA membentuk MDA-deoksiganosin. Pada sistem biologis, interaksi tersebut dapat menyebabkan timbulnya sitotoksisitas, mutagenisitas, dan karsinogenisitas (Lima, 2004). Pada penelitian lain, Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telserm (2007) melaporkan bahwa keberadaan MDA terkait erat dengan timbulnya beberapa penyakit yakni seperti atherosklerosis, alzheimer, dan diabetes melitus. Selain MDA, peroksidasi lipid ini juga menghasilkan produk aldehid toksik lainnya yaitu 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Beberapa penyakit yang diketahui berhubungan dengan HNE ini adalah penyakit jantung, parkinson, alzheimer, dan artherosklerosis (Valko, Leibfritz, Moncol, Cronin, Mazur, & Telserm, 2007).



b. Kerusakan Protein

Protein dapat dirusak oleh berbagai macam sumber radikal bebas, termasuk radiasi, produk peroksidasi lipid, dan oksidasi terkatalisasi logam. Proses perusakan ini dapat terjadi melalui mekanisme inaktivasi enzim akonitase, enzim pada siklus kreb, oleh radikal superoksida atau alkil peroksida. Proses inaktivasi ini berlangsung dengan cara mereduksi ion Fe^{3+} pada molekul enzim untuk membebaskan ion Fe^{2+} . Ion Fe^{2+} selanjutnya berikatan dengan protein dan dengan adanya H_2O_2 mampu memicu terbentuknya radikal OH. Dimana, radikal

OH yang terbentuk tersebut akan bereaksi dengan kompleks ferri-protein membentuk protein yang teroksidasi (Lima, 2004) (Persamaan 2.10).



Menurut Kumar (2011) oksidasi pada protein dapat mengakibatkan terjadinya modifikasi pada asam amino, fragmentasi rantai peptida, agregasi produk tautan silang, perubahan muatan elektrik, dan meningkatkan proteolisis (Farr & Kagoma, 1991). Kerusakan yang ditimbulkan ini dapat berefek pada fungsi enzim, reseptor membran, dan struktur protein (Lima, 2004).

c. Kerusakan DNA

Kromatin dapat melindungi DNA dari proses oksidasi oleh radikal bebas. Tetapi jumlah radikal bebas yang melebihi pertahanan ini dapat menyebabkan mutasi gen (Ljungman dan Hanawalt, 1992). Adanya paparan yang lama dari stres oksidatif dapat menimbulkan proses karsinogenesis. Menurut Lima (2005) dan Barja (2004) kerusakan pada mitokondria DNA juga diketahui menjadi faktor utama penyebab timbulnya penuaan dini (*aging*) dan beberapa penyakit degeneratif.

Kemampuan radikal bebas untuk menimbulkan mutasi dapat disebabkan oleh interaksi langsung radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) dengan semua komponen molekul DNA. Sementara itu, secara tidak langsung kerusakan DNA dapat dipicu oleh reaksi radikal superoksida atau H_2O_2 dengan ion logam. Interaksi dengan DNA secara langsung maupun tidak langsung tersebut selanjutnya dapat menyebabkan terjadinya kerusakan genetik. Kerusakan genetik yang disebabkan oleh radikal bebas dapat berupa modifikasi basa DNA, penambahan rantai, delesi, pemutusan rantai, pergantian rantai, pertukaran protein DNA atau penyusunan kembali kromosom (Lima, 2005).

2.7.2 Antioksidan

2.7.2.1 Definisi Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat secara signifikan mencegah atau menunda proses oksidasi senyawa lain yang mudah teroksidasi walaupun dengan konsentrasi rendah (Halliwell, 1995; Mandal, Satish, Sunita, & Nema, 2009). Disebut antioksidan karena zat tersebut dapat melawan proses oksidasi dari senyawa lain yang mudah teroksidasi. Senyawa yang mudah teroksidasi tersebut dapat berupa makanan maupun material biologis seperti karbohidrat, DNA, lemak, dan protein (Wanasundara & Shahidi, 2005).

2.7.2.2 Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan dibagi menjadi dua golongan besar, yaitu berdasarkan sumbernya dan berdasarkan mekanisme reaksinya (Shahidi & Zhong, 2005; Kumar, 2011). Antioksidan berdasarkan sumbernya dapat digolongkan menjadi antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Sedangkan antioksidan berdasarkan mekanisme reaksinya dapat digolongkan menjadi antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

a. Antioksidan Sintetis

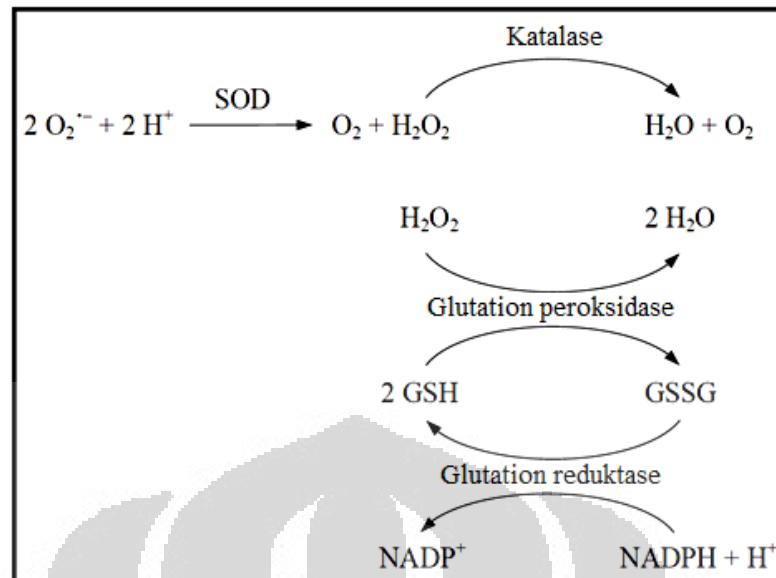
Penggunaan antioksidan sintetis saat ini kebanyakan adalah antioksidan dari golongan fenol seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *ter-butylhydroquinone* (TBHQ), dan ester dari asam galat seperti propil galat (PG). BHA, BHT, dan TBHQ digunakan sebagai antioksidan dalam industri makanan terutama pada bahan yang mengandung lemak atau minyak. Sementara PG digunakan sebagai antioksidan pada bahan lemak atau minyak lain yang tidak dapat ditambahkan antioksidan BHT, BHA atau TBHQ (Shahidi & Zhong, 2005; Wanasundara & Shahidi, 2005).

Antioksidan sintetis telah sepenuhnya diuji reaksi toksisitasnya, tapi beberapa dilaporkan memiliki efek mutagenik dan supresi imun setelah penggunaan dalam waktu lama. Data toksikologi antioksidan sintetis seperti BHA dan TBHQ menunjukkan beberapa peringatan dalam penggunaannya (Shahidi & Zhong, 2005; Wanasundara & Shahidi, 2005).

b. Antioksidan Alami

Antioksidan yang berasal dari bahan alam disebut sebagai antioksidan alami. Antioksidan alami ditemukan pada sebagian besar tanaman, mikroba, jamur, mikroalga, dan jaringan binatang (Shahidi & Zhong, 2005; Mendiola, Meizoso, Senorans, Reglero, Cifuentes, & Ibanez, 2008). Di alam antioksidan muncul dalam berbagai macam komposisi dan beragam karakteristik fisika kimia. Secara umum antioksidan alami dapat dikategorikan menjadi antioksidan enzim, mineral, vitamin, senyawa aktif tumbuhan, antioksidan dengan berat molekul tinggi, dan antioksidan dengan berat molekul rendah (Gupta & Sharma, 2006).

Antioksidan pada golongan enzim meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase. Antioksidan enzim ini banyak tersebar dalam plasma darah dan memiliki kemampuan untuk mengubah oksidan melalui proses katalitik serta mentransformasi ROS ataupun RNS menjadi komponen yang lebih stabil (Gupta & Sharma, 2006). Menurut Hanukoglu (2006) superoksida dismutase (SOD) mengkatalisis reaksi pembentukan hidrogen peroksida (H_2O_2) dari superoksida ($O_2^{\bullet-}$). Enzim katalase kemudian mengkatalisis proses dekomposisi hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air tanpa memproduksi radikal. Sementara itu, enzim glutathion peroksidase juga mengkatalisis reaksi reduksi hidrogen peroksida menggunakan glutathion (GSH) sebagai sumber ekuivalensi reduksi. Produk dari reaksi reduksi ini, glutathion teroksidasi (GSSG), akan dikonversi kembali membentuk glutathion melalui katalisis enzim glutathion reduktase dengan menggunakan NADPH sebagai sumber ekuivalensi reduksi (Gambar 2.10).



[Sumber : Hanukoglu, 2006, telah diolah kembali]

Gambar 2.10. Aktivitas antioksidan enzim.

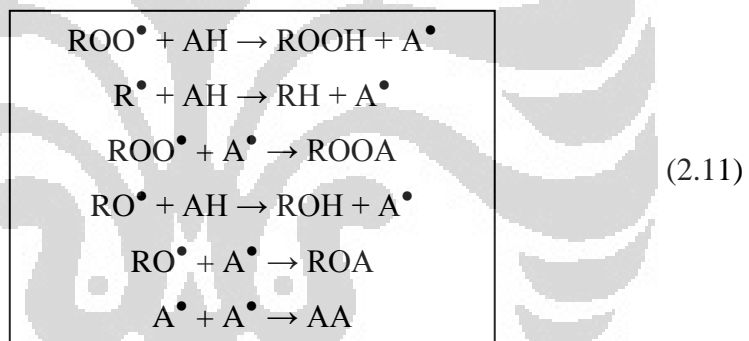
Protein merupakan antioksidan dengan berat molekul tinggi, contohnya adalah albumin, transferin, dan seruplasmin. Dalam hal ini, albumin dapat menangkal serangan radikal bebas dengan mengorbankan dirinya untuk teroksidasi oleh radikal. Antioksidan dengan berat molekul rendah dapat dibedakan menjadi dua jenis, yaitu antioksidan larut air dan antioksidan larut lemak. Antioksidan larut lemak adalah antioksidan yang mampu menangkal proses oksidasi terkait lemak seperti peroksidasi lipid, contohnya yaitu tokoferol, kuinin, bilirubin, dan beberapa polifenol. Sementara itu, antioksidan larut air dapat berupa asam askorbat, asam urat, dan beberapa polifenol larut air. Mineral yang diketahui dapat bertindak sebagai antioksidan adalah selenium, tembaga, mangan, zink, dan baru-baru ini kromium. Aktivitas antioksidan pada vitamin terdapat pada vitamin A, C, dan E. Dalam hal ini vitamin tersebut memiliki peran yang krusial dalam mencegah kerusakan sel akibat peroksidasi pada sistem biologis (Gupta & Sharma, 2006).

Tumbuhan sebagai sumber antioksidan diketahui melalui berbagai macam uji aktivitas baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Gupta & Sharma, 2006). Golongan senyawa pada tumbuhan yang dilaporkan dapat berpotensi sebagai antioksidan adalah alkaloid, karoten, antosianin, isoflavon, flavon, flavonol, kumarin, lignin, dan tanin (Sen, Chakraborty, Sridhar, Reddy, & De, 2010).

c. Antioksidan Primer

Definisi dari antioksidan primer adalah antioksidan kelas pertama yang berperan sebagai pemutus reaksi berantai pada proses oksidasi radikal bebas melalui donasi hidrogen dan pembentukan senyawa yang lebih stabil atau tidak reaktif (Shahidi & Zhong, 2005).

Antioksidan primer terlibat dalam mekanisme pemutusan reaksi berantai pada proses peroksidasi lipid. Pada mekanisme ini antioksidan primer (AH) bereaksi dengan radikal peroksi (ROO^\bullet) dan mengubahnya kedalam bentuk non radikal yang lebih stabil (ROOH). Antioksidan (AH) juga mampu mendonasikan atom hidrogennya pada radikal lipid (R^\bullet) dan membentuk radikal antioksidan (A^\bullet) yang lebih stabil. Antioksidan radikal selanjutnya dapat beraksi dengan radikal peroksi (ROO^\bullet), alkoksi (RO^\bullet), atau antioksidan (A^\bullet) untuk menghilangkan radikal bebas dalam sistem (Wanasundara & Shahidi, 2005) (Persamaan 2.11).



Contoh senyawa yang berperan sebagai antioksidan primer adalah karotenoid, flavonoid, asam fenolat, tokoferol, tokotrienol, BHA, BHT, PG, dan TBHQ (Wanasundara & Shahidi, 2005).

d. Antioksidan Sekunder

Antioksidan kelas kedua atau antioksidan sekunder merupakan fungsi preventif antioksidan yang berperan dalam memperlambat reaksi oksidasi radikal bebas melalui beberapa mekanisme, termasuk kelasi ion logam, regenerasi antioksidan primer, dekomposisi hidroperoksida menjadi molekul non radikal, deaktivasi singlet oksigen, absorpsi radiasi UV, penangkap (*scavenger*) oksigen, dan meningkatkan aktivitas antioksidan primer (Shahidi & Zhong, 2005). Perbedaannya dengan antioksidan primer, antioksidan sekunder tidak dapat mengubah radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil. Contoh antioksidan

jenis ini adalah asam askorbat dan askorbil palmitat sebagai penangkap oksigen, karotenoid sebagai pendeaktivasi singlet oksigen, serta asam tartat, asam malat, dan asam sitrat sebagai pengkelat ion logam (Wanasundara & Shahidi, 2005).

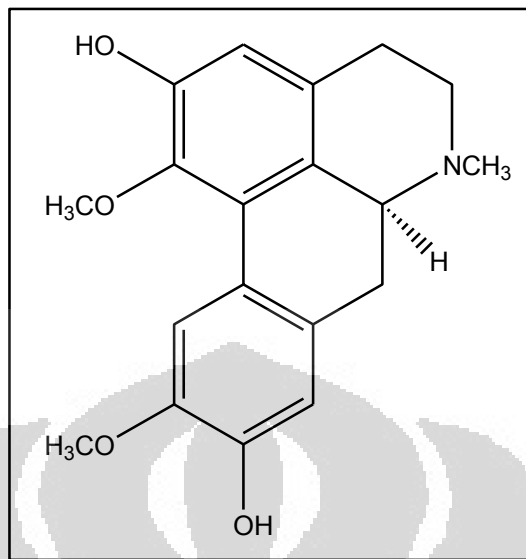
2.7.2.3 Fisiologi Antioksidan

Tubuh manusia mempunyai beberapa sistem antioksidan untuk menangkal radikal bebas yang merusak. Sistem perlindungan ini melibatkan aktivitas antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen terdiri dari enzim-enzim dan berbagai senyawa yang disintesis oleh tubuh, sedangkan antioksidan eksogen diperoleh dari bahan makanan baik yang bersifat nutrien seperti vitamin maupun mononutrien termasuk senyawa fitokimia (Asikin, 2001). Antioksidan bekerja melindungi molekul, sel, dan jaringan sasaran dalam 4 cara yaitu (Kumar, 2011):

- a. Memutuskan reaksi berantai,
- b. Mengurangi konsentrasi ROS,
- c. Penangkapan (*scavenging*) radikal bebas baik secara enzimatik maupun dengan reaksi kimia langsung, dan
- d. Mengikat ion-ion logam yang terlibat dalam pembentukan senyawa radikal yang reaktif.

Tubuh manusia menggunakan semua mekanisme di atas pada sistem perlindungan tubuh terhadap serangan radikal bebas (Gutteridge, Halliwell, 1994; Wanasundara & Shahidi, 2005).

2.7 Boldin (Standar Antioksidan)



Gambar 2.11. Struktur boldin

Boldin atau (S)-2,9-dihidroksi-1,10-dimetoksi-aporfin (Gambar 2.11) merupakan senyawa kelompok alkaloid golongan aporfin (O'Brien, Carrasco-Pozo, & Speisky, 2006; Srivastava, Tandon, Ayala, & Jain, 2011; Mollataghi, Hadi, Awang, Mohamad, Litaudon, & Mukhtar, 2011). Boldin adalah antioksidan poten yang berperan penting dalam beberapa aktivitas farmakologis seperti aktivitas antiatherogenik, sitotoksik, antidiabet, dan antiinflamasi. Pada konsentrasi kurang dari 5 μM boldin memperlihatkan kemampuannya dalam mengatasi peroksidasi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang terkait terjadinya atherogenesis (Konrath, Santin, Nassif, Latini, Henriques, & Salbego, 2008; Yu, Cook, & Santanam, 2009; Grassi, Desideri, & Ferri, 2010). Sementara itu, menurut Thomet, Pinol, Villena, dan Reveco (2011), sebagai agen antitumor boldin mampu menunjukkan aktivitas sitotoksik pada sel kanker manusia dan beraktivitas sebagai antiproliferatif pada *glioma cell line* (Garbarino, Troncoso, Frasca, Cardile, & Russo, 2008; Gerhardt *et al.*, 2009). Pada pengujian aktivitas antidiabetik, dilaporkan bahwa boldin mampu menghambat kerusakan oksidatif jaringan akibat induksi streptozosin dengan mengubah aktivitas enzim antioksidan melalui dekomposisi ROS dan inhibisi produksi nitrit oksida serta dengan mereduksi proses peroksidasi akibat radikal tersebut (Jang, Song, Shin, Han, & Lee, 2000). Dengan kata lain, kemampuan boldin dalam melindungi tubuh dari

beberapa penyakit degeneratif tersebut terkait erat dengan aktivitas antioksidannya, yaitu secara umum melalui mekanisme penghambatan terjadinya stres oksidatif. Aktivitas antioksidan boldin ini ditunjukkan dari nilai IC_{50} yang berkisar antara 5×10^{-6} – 15×10^{-6} M (Speisky, Cassels, Lissi, & Videla, 1991; O'Brien, Carrasco-Pozo, & Speisky, 2006; Lau, Machha, Achike, Murugan, & Mustafa, 2011).

2.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diuji dengan beberapa metode. Secara umum metode-metode uji aktivitas antioksidan digolongkan menjadi uji *in vivo* dan uji *in vitro*. Uji *in vitro* adalah uji antioksidan berdasar atas reaksi kimia di luar organisme hidup, sedangkan uji *in vivo* adalah uji antioksidan menggunakan hewan atau manusia atau didalam sistem organisme hidup.

2.9.1 Metode Uji Antioksidan secara *In vivo*

Uji aktivitas antioksidan secara *in vivo* berdasar atas pemberian senyawa uji berupa antioksidan dalam berbagai variasi konsentrasi pada hewan coba yang telah diinduksi oleh senyawa toksik, misalnya CCl_4 sebagai agen penginduksi kerusakan hati. Hewan coba yang digunakan mula-mula dibagi menjadi beberapa kelompok untuk diberikan perlakuan yang berbeda sesuai kelompoknya, misalnya kelompok hewan coba untuk kontrol positif, kontrol negatif, dan sampel uji. Aktivitas antioksidan dari senyawa uji ditentukan dengan mengukur parameter biologis yang telah ditetapkan, seperti SGOT (*serum glutamic pyruvic oxaloacetic*), SGPT (*serum glutamic pyruvic transaminase*), ALP (*alkaline phosphatase*), total bilirubin, dan total protein (Venkateshwarlu, Raghuram, Goverdhan, Swapna, & Jayapal, 2011). Adapun kerusakan hati yang disebabkan oleh agen penginduksi kerusakan hati seperti CCl_4 dapat menyebabkan enzim-enzim hepar intrasel masuk ke dalam pembuluh darah dan menimbulkan peningkatan kadar SGOT, SGPT, dan ALP dalam serum (Pramushinta, 2008). Sementara itu, total bilirubin juga akan meningkat akibat terjadinya kebocoran bilirubin dari sel-sel hati. Sebaliknya, adanya kerusakan sel-sel hati dapat menurunkan kemampuannya dalam mensintesis protein sehingga dapat

Universitas Indonesia

mengurangi jumlah normal total protein dalam serum. Dalam hal ini, pemberian senyawa antioksidan pada hewan coba dapat menghambat peroksidasi lipid dan mengurangi kerusakan sel yang ditandai dengan kembalinya kadar parameter-parameter biologis tersebut pada keadaan normal (Panjaitan, Handharyani, Chairul, Masriani, Zakiah, & Manalu, 2007).

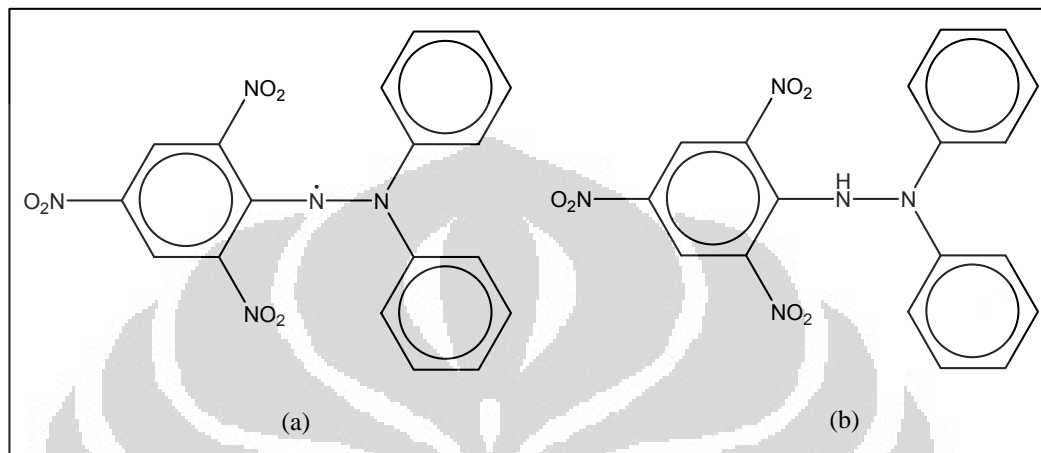
2.9.2 Metode Uji Antioksidan secara In vitro

2.9.2.1 Metode Peredaman Radikal DPPH

Senyawa yang digunakan sebagai model dalam mengukur daya penangkap radikal bebas adalah DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Menurut Rohman, Riyanto, Dahliyanti, dan Pratomo (2009) kemampuan suatu senyawa atau sampel uji untuk menangkap radikal DPPH merupakan suatu indikasi bahwa senyawa atau sampel uji tersebut beraktivitas sebagai antioksidan.

Metode peredaman radikal dengan menggunakan DPPH merupakan metode yang mudah, cepat, memiliki sensitifitas tinggi, dan paling sering digunakan untuk skrining aktivitas antioksidan (Kim, Lee K.W., Lee H.J., & Lee C.Y., 2002; Koleva, van Beek, Linssen, de Groot, & Evstatieva, 2002). Prinsip yang digunakan pada metode ini adalah reduksi larutan metanol radikal DPPH yang berwarna akibat donasi proton oleh penghambat radikal (antioksidan). Dengan kata lain, adanya donor proton dari penghambat radikal (antioksidan) menyebabkan radikal DPPH (berwarna ungu) menjadi senyawa non radikal DPPH (Persamaan 2.12 dan Gambar 2.12) yang berwarna kuning pucat atau tidak berwarna dengan absorbansi yang berkurang dari sebelumnya (Molyneux, 2004; Mun'im, Azizahwati, & Trastiana, 2008). Dengan demikian aktivitas penangkapan radikal dapat dihitung dari peluruhan radikal DPPH. Pada jangka waktu tertentu DPPH yang tersisa tersebut diukur serapannya secara spektrofotometri pada panjang gelombang optimum. Dalam hal ini, menurut Marxen, Vanselow, Lippemeier, Hintze, Ruser, dan Hansen (2007) DPPH radikal dapat memberikan serapan pada kisaran panjang gelombang 515-520 nm (Bandoniene, Murkovic, Pfannhauser, Venskutonis, & Gruzdiene, 2002; Pavlov, Kovatcheva, Georgiev, Koleva, & Ilieva, 2002; Molyneux, 2004; Gazi, Yasuda, & Kato, 2004). Aktivitas antioksidan tersebut selanjutnya dinyatakan sebagai *Effective Concentration 50*

(EC₅₀) atau IC₅₀ (Molyneux, 2004). IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel (µg/mL) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Dimana, semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan.



Keterangan : a. Radikal bebas DPPH; b. Non radikal DPPH

Gambar 2.12. Struktur radikal bebas dan non radikal DPPH

2.9.2.2 Metode TBA (Asam tiobarbiturat)

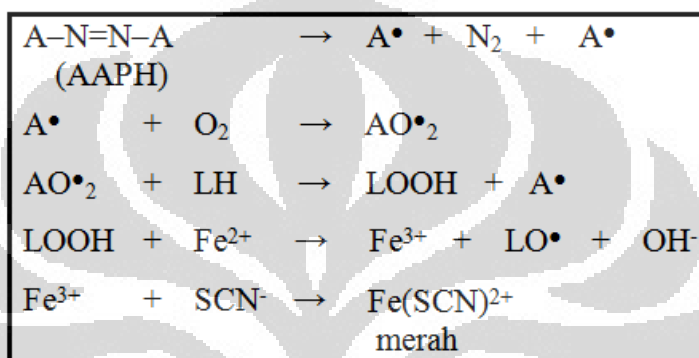
Pada metode TBA pengukuran dilakukan secara spektrofotometri terhadap warna merah muda yang terjadi akibat reaksi asam tiobarbiturat (TBA) dengan malondialdehid (MDA) dibawah temperatur tinggi dan kondisi asam. Dalam hal ini, MDA adalah produk samping dari oksida lipid dan produk lipid peroksida sekunder lainnya yang merupakan penanda biologis terhadap adanya peroksidasi lipid pada sel. Pengukuran dalam metode ini dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 532 nm dan hasilnya dapat mengindikasikan adanya degradasi lipid (Williamson, Hensley, & Floyd, 2003; Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005).

2.9.2.3 Metode Tiosianat

Dasar dari metode tiosianat adalah kemampuan antioksidan untuk mengikat radikal bebas sehingga peroksidasi asam linoleat dan kerusakan lipid dapat dicegah. Jumlah peroksida yang terbentuk tersebut diukur secara tidak langsung dengan pembentukan kompleks ferri tiosianat (berwarna merah).

Universitas Indonesia

Senyawa AAPH yang merupakan senyawa larut air yang digunakan sebagai penginisiasi radikal melalui pemanasan. Radikal bebas tersebut akan menyerang asam lemak dan menyebabkan terjadinya peroksidasi asam linoleat. Peroksida yang terbentuk ini kemudian direaksikan dengan besi (II) klorida dan ammonium tiosianat untuk membentuk kompleks ferri tiosianat yang berwarna merah melalui reaksi oksidasi ion ferro menjadi ferri (Gambar 2.13). Banyaknya kompleks yang terbentuk tersebut diukur absorbansinya secara spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm (Mun'im, Azizahwati, & Trastiana, 2008).



[Sumber: Mun'im, Azizahwati & Trastiana, 2008, telah diolah kembali]

Gambar 2.13. Pembentukan radikal dan peroksidasi asam linoleat

2.9.2.4 Metode ABTS

Metode ABTS (2,2'-azobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat) pada uji aktivitas antioksidan berdasar atas reaksi antioksidan dengan kation radikal $ABTS^+$ yang berwarna khas dan dapat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 645, 734, dan 815 nm (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005). Yang mana, radikal ABTS yang bereaksi dengan antioksidan tersebut diperoleh dengan mereaksikan ABTS dengan kalium persulfat yang didiamkan semalam pada kondisi gelap dengan temperatur ruang selama 12-16 jam sebelum digunakan. Reaksi yang terjadi antara radikal ABTS dengan antioksidan ini menunjukkan adanya penghilangan warna. Hilangnya warna tersebut menggambarkan kemampuan suatu antioksidan untuk memberikan elektron atau atom hidrogen kepada radikal bebas (Asghar, Khan, Zia, Ahmad, & Qureshi, 2008).

2.9.2.5 Aktivitas Penangkap Radikal Superoksida

Prinsip uji aktivitas antioksidan penangkap radikal superoksida adalah pembentukan radikal superoksida dari reaksi autooksidasi riboflavin akibat adanya paparan cahaya. Radikal superoksida tersebut selanjutnya akan mereduksi NTB (Nitro Blue Tetrasolium). NBT yang tereduksi membentuk formazon yang berwarna biru dan diukur absorbansinya secara spektrofotometri pada panjang gelombang 560 nm. Parameter aktivitas antioksidan dinyatakan dengan konsentrasi sampel yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50% (EC_{50} atau IC_{50}) (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar, & Laksman, 2005).

2.9.2.6 Aktivitas Penangkap Radikal Hidroksil

Metode uji aktivitas penangkap radikal hidroksil merupakan metode yang melibatkan pembentukan radikal hidroksil dengan menggunakan Fe^{3+} , askorbat, EDTA, H_2O_2 dalam reaksi fenton. Radikal hidroksil yang terbentuk kemudian direaksikan dengan DMSO (dimetil sulfoksida) untuk membentuk formaldehid yang berwarna kuning intensif pada pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M, asam asetat 0,05 M, dan 0,02 M asetil aseton dalam air terdestilasi). Warna kuning tersebut diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 412 nm dan dibandingkan dengan blanko reagen. Aktivitas antioksidan dalam metode ini selanjutnya dinyatakan sebagai persen penangkapan radikal hidroksil (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005).

2.9.2.7 Metode DMPD

Prinsip metode uji DMPD (N,N-dimetil-p-fenilen diamin dihidroklorida) adalah reduksi DMPD yang berwarna dalam buffer asetat dan ferri klorida. Dimana, adanya proses penangkapan radikal oleh antioksidan akan menyebabkan penurunan absorbansi DMPD. Aktivitas antioksidan tersebut selanjutnya dinyatakan sebagai persentase reduksi DMPD dan diukur pada panjang gelombang 505 nm (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005; Joseph, Monika, S. Alok, M. Alok, & Shruti, 2009).

2.9.2.8 Metode Uji ORAQ

ORAQ (*Oxygen radical Absorbance Capacity*) atau kapasitas serapan radikal oksigen merupakan metode analisis yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dari berbagai substansi kimia. Uji ini menggunakan β -*phycoerythin* (β -PE) sebagai sel target radikal bebas, AAPH sebagai penghasil radikal peroksi, dan *trolox* sebagai standar. Prinsip reaksinya adalah pembentukan radikal oleh AAPH (2,2-azobis-2-amidinopropan dihidroklorida) dan penurunan fluoresensi akibat adanya penangkapan radikal bebas oleh antioksidan. Aktivitas antioksidan pada metode ini diekspresikan sebagai TE. Dalam hal ini, *trolox* atau analog vitamin E yang larut dalam air digunakan untuk menentukan *trolox* ekuivalen (TE). Selanjutnya, nilai ORAQ diukur dari nilai TE. Dimana, semakin tinggi nilai ORAQ, semakin besar pula kekuatan antioksidannya (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005).

2.9.2.9 Metode β -karoten linoleat

Metode uji antioksidan dengan menggunakan β -karoten linoleat merupakan metode uji antioksidan yang cepat dalam skrining aktivitas antioksidan. Prinsip dari metode ini adalah asam linoleat, asam lemak tidak jenuh, dapat teroksidasi oleh ROS (*reactive oxygen species*) yang dihasilkan dari air yang teroksidasi. Produk yang terbentuk tersebut dapat mengakibatkan oksidasi β -karoten dan menyebabkan hilangnya warna. Dalam hal ini, adanya antioksidan pada reaksi ini dapat menyebabkan penurunan tingkat penghilangan warna. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan dapat ditentukan melalui pengukuran secara spektrofotometri pada panjang gelombang 434 nm (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005; Joseph, Monika, S. Alok, M. Alok, & Shruti, 2009).

2.9.2.10 Metode Konjugasi Diena

Prinsip metode konjugasi diena adalah metode kuantitatif untuk mengukur konjugasi diena akibat dari proses oksidasi PUFA (*poly unsaturated fatty acid*). Absorbansi yang dihasilkannya diukur pada panjang gelombang 234 nm. Dalam hal ini, selama proses oksidasi PUFA ikatan rangkap diubah menjadi ikatan rangkap terkonjugasi. Ikatan rangkap terkonjugasi yang dihasilkan kemudian

dianalisis absorbansinya pada panjang gelombang 234 nm. Aktivitas antioksidan diekspresikan dengan konsentrasi penghambatan (*inhibitory concentration*) IC₅₀ (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005).

2.9.2.11 Metode Fosfo Molibdat

Uji antioksidan dengan metode fosfo molibdat adalah cara spektroskopi untuk menentukan kemampuan antioksidan melalui prinsip reaksi reduksi dalam pembentukan kompleks fosfomolibdat. Uji ini berdasarkan reduksi Mo (VI) menjadi Mo (V) pada sampel uji dan kemampuan pembentukan kompleks fosfat Mo (V) yang berwarna hijau pada pH asam (Prieto, Pineda, & Aguilar, 1999).

2.9.2.12 Metode Xantin Oksidase

Metode uji antioksidan xantin oksidase adalah metode untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan prinsip pengukuran kemampuan inhibisi pembentukan asam urat oleh xantin oksidase dengan adanya antioksidan. Enzim xantin oksidase ini bersama dengan radikal superoksida dapat mengkatalisis pembentukan asam urat dari xantin. Jumlah asam urat tersebut diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 292 nm (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005; Joseph, Monika, S. Alok, M. Alok, & Shruti, 2009).

2.9.2.13 Metode TRAP

Metode uji Antioksidan TRAP merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan dengan mengukur penangkapan radikal total oleh antioksidan. Prinsip metodenya yaitu penghilangan fluoresensi *R-phycoerythin* oleh ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropan) hidroklorida) sebagai penghasil radikal. Reaksi penghilangan warna yang terjadi ini dapat dijadikan indikator untuk mengukur adanya aktivitas antioksidan. Dalam hal ini, aktivitas antioksidan diketahui dengan mengukur penundaan penghilangan warna (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005; Joseph, Monika, S. Alok, M. Alok, & Shruti, 2009).

2.9.2.14 Metode FRAP

Aktivitas antioksidan pada metode FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) diketahui dengan mengukur peningkatan absorbansi yang disebabkan oleh pembentukan ion ferro dari reagen FRAP yang mengandung TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Dalam hal ini, antioksidan menyebabkan terjadinya reaksi reduksi ion ferri menjadi ion ferro. Ion Ferro yang dihasilkan akan membentuk kompleks Fe^{2+} -TPTZ yang berwarna biru intensif pada pH optimumnya (pH 3,6). Absorbansi pada kompleks tersebut selanjutnya diukur dengan spektrofotometri *UV-Vis* pada panjang gelombang 593 nm (Chanda & Dave, 2009).

2.9.2.15 Metode *Reducing Power*

Uji aktivitas antioksidan dengan metode *Reducing power* berdasar atas pembentukan kompleks berwarna oleh antioksidan terhadap kalium ferrisianida, asam trikloro asetat, dan besi (III) klorida. Serapan yang ditimbulkan selanjutnya diukur pada panjang gelombang 700 nm. Dalam hal ini, adanya peningkatan serapan campuran reaksi sebanding dengan kekuatan mereduksi dari antioksidan (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar & Laksman, 2005).

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Mikrobiologi Fakultas Farmasi Depok Indonesia, serta laboratorium Fitokimia *Central Natural Product* Universitas Malaya Malaysia yang dimulai pada bulan Januari hingga Juni tahun 2012.

3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *blender* (Waring), peralatan refluks, alat-alat gelas, penguap putar vakum (Buchi, Hanshin, dan Kunkel IKA), labu ukur, pipet volum, pipet mikro (Eppendorf), timbangan analitik (Accu-Lab), lemari pendingin (Panasonic), *water bath* (Imperial), kromatografi kolom ukuran 6 x 52 cm dan 2,5 x 32 cm (fase diam silika gel 60 (70-230 mesh, E. Merck 1.07734)), botol penampung dalam berbagai ukuran, alat ukur titik leleh (Stuart, Scientific), inkubator (Mettler), spektrofotometer UV-Vis (T80+, PG Instruments Ltd), spektrofotometri UV-Vis (UV-1650PC, Shimadzu), spektrofotometer inframerah (FT-IR, Spectrum RX I, PerkinElmer), ¹H-NMR (FT-NMR, JNM Lambda 400 MHz, Jeol), dan ¹³C-NMR (Ultrashield 600 MHz Plus, Bruker).

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan Uji

Tanaman yang diteliti adalah *Phoebe declinata* Nees yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah diidentifikasi di Pusat Konservasi Tumbuhan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor, Indonesia. Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang *Phoebe declinata* Nees.

3.3.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah heksana, diklorometan, etil asetat, metanol teknis yang telah didestilasi; NH_4OH 58%; metanol p.a (Merck); kloroform (Merck); CDCl_3 (Merck); lempeng KLT (Merck, 05554); kertas whatman (3CHR, 3003917); reagen penyemprot Dragendorff (Merck); asam klorida p.a (Merck); Mayer LP; Dragendorff LP; Bouchardat LP; dan DPPH (Sigma-Aldrich).

3.3. Bahan Pemanding

Boldin (Sigma-Aldrich).

3.4 Cara Kerja

Metode kerja yang dilakukan meliputi penyiapan simplisia, penapisan fitokimia simplisia, pembuatan ekstrak, penapisan fitokimia ekstrak diklorometan, uji antioksidan kulitatif ekstrak diklorometan, kromatografi kolom ekstrak diklorometan, uji antioksidan kualitatif dan kuantitatif fraksi kolom pertama, kromatografi kolom fraksi aktif alkaloid, uji antioksidan kualitatif fraksi kolom kedua, penentuan kemurnian dan karakterisasi senyawa, serta uji aktivitas antioksidan isolat. Secara umum, langkah kerja tersebut digambarkan pada skema kerja (Lampiran 1 dan 2).

3.4.1 Penyiapan Simplisia

Penyiapan simplisia dilakukan dengan pengumpulan bagian kulit batang tanaman *Phoebe declinata* Nees, perajangan, dan sortasi awal untuk memisahkan simplisia dari kotoran dan bahan-bahan organik lainnya. Proses pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan sistem AC (*air conditioner*) selama 15 hari di bulan November 2011. Simplisia kering dari kulit batang *Phoebe declinata* Nees yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor adalah sebanyak 1,4 kg. Sebelum dilakukan proses penghalusan, simplisia disortasi kembali untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing yang masih tertinggal sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Kulit batang yang telah disortir dihaluskan dengan blender dan serbuk yang diperoleh diayak

dengan ayakan B30 kemudian disimpan dalam wadah bersih, kering, serta terlindung dari cahaya.

3.4.2 Penapisan Fitokimia Alkaloid Simplisia (Depkes, 1995b)

Larutan uji dibuat dengan cara 200 mg serbuk simplisia, dilembabkan dengan amoniak 58%, dikeringkan selama 2 jam. Serbuk simplisia yang telah kering kemudian ditambahkan 1 mL HCl 4N dan 9 mL metanol, dipanaskan di penangas air selama 15 menit, didinginkan, dan selanjutnya disaring. Filtrat yang diperoleh ditampung dan digunakan sebagai larutan uji dalam percobaan selanjutnya.

- a. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Bouchardat ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan uji. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat sampai dengan hitam.
- b. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Mayer ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan uji. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol.
- c. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Dragendorff ditambahkan 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan uji. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai dengan coklat.

Pembanding yang digunakan adalah boldin. Persiapannya yakni 1 mg boldin dilarutkan dalam 1 mL metanol. Larutan boldin kemudian dilakukan seperti prosedur pada larutan uji.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak

Sejumlah 1,4 kg serbuk simplisia mula-mula diekstraksi secara refluks menggunakan pelarut heksana yang telah didestilasi. Ekstraksi dilakukan selama 30 menit pada suhu kurang lebih 70°C sebanyak enam kali hingga filtrat yang dihasilkan jernih. Hasil refluks disaring dan filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan penguap putar vakum pada suhu kurang lebih 50°C dan dilanjutkan

dengan *water bath* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental heksana. Ampas heksana dilembabkan dengan amoniak 58% selama semalam. Ampas heksana yang telah dilembabkan tersebut selanjutnya dikeringkan dan dilakukan proses ekstraksi kembali dengan pelarut diklorometan menggunakan refluks pada suhu 40°C selama 30 menit sebanyak dua puluh kali hingga diperoleh filtrat jernih yang negatif terhadap pereaksi alkaloid. Hasil ekstraksi tersebut disaring, kemudian filtrat yang memberikan hasil positif terhadap pereaksi alkaloid ditampung dan dikumpulkan untuk selanjutnya diuapkan dengan penguap putar dan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental diklorometan. Selanjutnya ekstrak kental ini ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap berat simplisia awal.

3.4.4 Penapisan Fitokimia Alkaloid Ekstrak Diklorometan (Depkes, 1995b)

Identifikasi alkaloid pada ekstrak dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu melalui reaksi dengan reagen alkaloid langsung dan dengan pengamatan melalui KLT.

Identifikasi alkaloid secara langsung yakni dilakukan dengan penambahan reagen alkaloid (Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat) pada zat uji. Zat uji yang digunakan adalah berupa ekstrak kental diklorometan. Dalam pengujian ini, ekstrak kental diklorometan tersebut perlu dilarutkan terlebih dahulu, yakni 50 mg ekstrak kental diklorometan dilarutkan dalam metanol. Larutan uji selanjutnya digunakan untuk tahap identifikasi dengan reagen alkaloid, yaitu:

- a. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Bouchardat ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan uji. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat sampai dengan hitam.
- b. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Mayer ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan uji. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol.
- c. Larutan uji sebanyak kurang lebih 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Dragendorff ditambahkan 2 tetes ke dalam tabung reaksi yang berisi

larutan uji. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai dengan coklat.

Pembuatan zat uji yang digunakan pada metode KLT yaitu 1 mL diklorometan ditambahkan dalam ekstrak kental diklorometan. Zat uji yang telah dilarutkan selanjutnya ditotolkan pada lempeng KLT pada jarak tertentu. Lempeng KLT yang telah ditotolkan lalu dicelupkan ke dalam eluen dengan posisi totolan tidak tercelup fase gerak. Proses elusi tersebut dilakukan pada bejana yang telah dijenuhkan selama 30 menit dengan fase gerak 95:5 (diklorometan:metanol) serta uap amoniak 58%. Bercak hasil elusi diamati dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 254 dan 366 nm serta melalui pengamatan langsung dengan bantuan penyemprotan reagen Dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya bercak berwarna jingga.

Pembandingan yang digunakan adalah boldin. Tahap persiapan larutan pembandingan dilakukan seperti tahap persiapan pembandingan pada penapisan fitokimia alkaloid simplisia. Larutan boldin yang telah siap kemudian dilakukan seperti prosedur pada larutan uji.

3.4.5 Uji Antioksidan Kualitatif Ekstrak Diklorometan

Uji antioksidan pada ekstrak diklorometan adalah uji kualitatif, yaitu dengan menggunakan pereaksi semprot DPPH. Pengujian ini dilakukan dengan menotolkan ekstrak kental diklorometan yang telah dilarutkan ke dalam 1 mL diklorometan pada kertas whatman. Bercak yang telah ditotolkan tersebut selanjutnya disemprot dengan pereaksi semprot DPPH 100 ppm. Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya bercak kuning dengan latar belakang ungu pada kertas whatman. Pembandingan yang digunakan dalam pengujian ini yaitu boldin. Perlakuan awalnya yakni 1 mg boldin dilarutkan dalam 1 mL metanol. Larutan boldin tersebut selanjutnya diperlakukan sama seperti larutan uji.

3.4.6 Kromatografi Kolom Ekstrak Diklorometan

Kromatografi kolom dilakukan terhadap ekstrak diklorometan. Sebelum dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom, terlebih dahulu ditentukan perbandingan pelarut yang memberikan pemisahan paling baik pada bercak

alkaloid dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Perbandingan pelarut yang memberikan pemisahan bercak alkaloid yang baik pada lempeng KLT digunakan sebagai fase gerak untuk fraksinasi dengan kromatografi kolom.

Sebanyak 20 g ekstrak diklorometan kulit batang *Phoebe declinata* Nees difraksinasi dengan kromatografi kolom (6 x 52 cm) menggunakan fase diam 300 g silika gel 60 (70-230 mesh) dan fase gerak berupa campuran pelarut diklorometan dengan metanol dengan perbandingan 100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, dan 0:100, sehingga didapatkan fraksi-fraksi dengan gradien kepolaran yang berbeda-beda. Proses elusi dilakukan mulai dari campuran pelarut dengan kepolaran rendah hingga kepolaran tinggi. Setiap eluat yang diperoleh dari hasil tersebut ditampung dalam botol 100 mL dan diuapkan dengan penguap putar. Eluat yang didapat kemudian dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan penyemprotan reagen Dragendorff. Fraksi yang memiliki kemiripan pola kromatogram KLT digabung sehingga diperoleh fraksi-fraksi yang mengandung alkaloid.

3.4.7 Uji Antioksidan Kualitatif dan Kuantitatif Fraksi Kolom Pertama

Fraksi-fraksi hasil kolom pertama yang diketahui mengandung alkaloid diuji aktivitas antioksidannya secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan DPPH dengan pembanding boldin. Uji antioksidan secara kualitatif dilakukan seperti uji antioksidan kualitatif ekstrak. Fraksi alkaloid yang menunjukkan bercak kuning selanjutnya diuji secara kuantitatif. Pengukuran aktivitas antioksidan ini meliputi tahap pembuatan larutan DPPH, penentuan panjang gelombang DPPH, pembuatan larutan blanko, persiapan larutan uji, pembuatan larutan standar (Boldin), dan perhitungan IC_{50} .

3.4.7.1 Pembuatan Larutan DPPH

Sejumlah 10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi DPPH 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.7.2 Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 100 µg/mL diukur spektrum serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 515 nm hingga 520 nm, lalu ditentukan panjang gelombang optimumnya.

3.4.7.3 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 1,0 mL metanol p.a. Larutan ini dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL DPPH, ditambahkan 2,0 mL metanol dan dikocok hingga homogen. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit.

3.4.7.4 Persiapan Larutan Uji

a. Pembuatan Larutan Induk (konsentrasi 100 µg/mL)

Sejumlah 10 mg fraksi ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a hingga homogen.

b. Pembuatan Larutan Seri (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 µg/mL)

Pada larutan induk dipipet masing-masing 1; 2; 3; dan 4 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, dan kemudian dicukupkan dengan metanol p.a hingga 5 mL untuk mendapatkan konsentrasi berturut-turut 20, 40, 60, dan 80 µg/mL. Skema pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 3.

c. Pengujian

Uji Aktivitas antioksidan dilakukan pada larutan uji dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 µg/mL. Dari masing-masing larutan uji tersebut dipipet sebanyak 1,0 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1,0 mL DPPH 100 µg/mL dan 2,0 mL metanol. Larutan tersebut dikocok hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu, serapannya diukur pada panjang gelombang optimum.

3.4.7.5 Persiapan larutan Standar (Boldin)

a. Pembuatan Larutan Induk (konsentrasi 100 µg/mL)

Standar ditimbang 10 mg dan dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a hingga homogen.

b. Pembuatan Larutan Seri (konsentrasi 5, 6, 8, 9, dan 10 µg/mL)

Pada larutan induk dipipet masing-masing 0,5; 0,6; 0,8; 0,9; dan 1 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dan kemudian dicukupkan dengan metanol p.a hingga 10 mL untuk mendapatkan konsentrasi berturut-turut 5, 6, 8, 9, dan 10 µg/mL. Skema pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 4.

c. Pengujian

Dari masing-masing konsentrasi larutan uji (konsentrasi 5, 6, 8, 9, dan 10 µg/mL) dipipet 1,0 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL DPPH 100 µg/mL, dan ditambahkan 2,0 mL metanol. Kemudian larutan tersebut dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Serapannya diukur pada panjang gelombang optimum.

3.4.7.6 Perhitungan IC₅₀

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai *Inhibition Concentration* 50% (IC₅₀) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel, yakni:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Balnko}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan $y = a + bx$ dengan perhitungan secara regresi linear. Dalam hal ini, x adalah konsentrasi (µg/mL), sedangkan y adalah persentase inhibisi (%). Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti $y = 50$.

3.4.8 Kromatografi Kolom Fraksi Aktif Alkaloid

Fraksi yang memberikan aktivitas antioksidan tertinggi (775,53 mg) dilakukan kromatografi kolom kedua (2,5 x 32 cm) dengan fase gerak heksana

dan etil asetat serta fase diam 80 g silika gel 60 (70-230 mesh). Sebelumnya, dilakukan peninjauan dengan KLT terlebih dahulu untuk melihat perbandingan pelarut yang memberikan pola pemisahan yang baik pada senyawa alkaloid. Perbandingan pelarut heksana dan etil asetat yang digunakan pada kromatografi kolom berturut-turut yakni, 100:0, 95:5, 90:10, 85:15, dan 80:20. Masing-masing eluat yang diperoleh dari berbagai perbandingan pelarut tersebut ditampung sebanyak 20 mL dan digabung berdasar kemiripan pola pemisahannya melalui elusi dengan KLT dan disertai penyemprotan Dragendorff pada kromatogramnya.

3.4.9 Uji Antioksidan Kualitatif Fraksi Alkaloid Kolom Kedua

Fraksi hasil kolom kedua yang diketahui mengandung alkaloid diuji aktivitas antioksidannya secara kualitatif menggunakan DPPH dengan pembanding boldin. Prosedur uji antioksidan secara kualitatif dilakukan seperti uji antioksidan kualitatif ekstrak dan fraksi kolom pertama.

3.4.10 Kemurnian dan Karakterisasi Isolat

Pada fraksi hasil kolom kedua yang mengandung alkaloid dan beraktivitas antioksidan selanjutnya dilakukan proses pemurnian dengan rekristalisasi untuk mendapatkan isolat. Isolat yang didapatkan kemudian dikarakterisasi dan dilakukan uji aktivitas antioksidan. Isolat yang diperoleh ditentukan kemurniannya dengan KLT dan *Fisher-Jhon Melting Point apparatus* serta diidentifikasi struktur molekulnya dengan spektrofotometri *UV-Visible*, IR, LC-MS, spektrofotometri resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$), spektrofotometri resonansi magnetik inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$).

3.4.10.1 Pemeriksaan secara Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

Fase gerak yang digunakan pada pengujian kemurnian isolat dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi berturut-turut adalah 95:5 (diklorometan-metanol) dan 5:95 (heksana-etilasetat). Mula-mula, bejana dijenuhkan dengan fase gerak pertama selama setengah jam. Pada lempeng KLT ditotolkan sampel uji menggunakan pipa kapiler pada jarak tertentu dan selanjutnya dimasukkan ke dalam bejana dengan posisi cairan pengelusi di bawah bercak penotolan. Dalam

keadaan bejana tertutup rapat, eluen dibiarkan merambat sampai mencapai batas plat yang telah ditandai. Bercak yang timbul diidentifikasi pada sinar UV dengan λ_{max} 254 dan 366 nm. Prosedur KLT dengan fase gerak kedua dilakukan sama seperti prosedur menggunakan fase gerak pertama. Bercak yang telah terelusi pada KLT pertama, dielusi kembali dengan posisi 90 derajat dari garis elusi pertama. Bercak hasil elusi kedua dilihat kembali di UV disertai penyemprotan dengan reagen Dragendorff, dan ditentukan Rf-nya.

3.4.10.2 Pemeriksaan Sifat Fisika Isolat

Sifat fisika isolat dapat ditentukan dengan pengujian titik lelehnya. Dalam hal ini, titik leleh isolat ditentukan menggunakan alat pengukur titik leleh, yaitu kristal atau serbuk diletakkan ke dalam pipa kapiler pada alat tersebut kemudian suhu pada alat tersebut dinaikkan pelahan-lahan. Umumnya suhu akan meningkat sebanyak 1°C tiap menit. Titik leleh ditandai dengan mulai meleburnya kristal sampai seluruhnya berubah wujud menjadi cair. Isolat yang dikatakan murni ditandai dengan jarak leleh yang tajam, yaitu $\pm 2^{\circ}$.

3.4.10.3 Pemeriksaan UV-Visible

Sejumlah 1 mg sampel ditimbang lalu dilarutkan dalam metanol. Larutan ditempatkan pada kuvet dan diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-600 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol.

3.4.10.4 Pemeriksaan Spektrum Inframerah

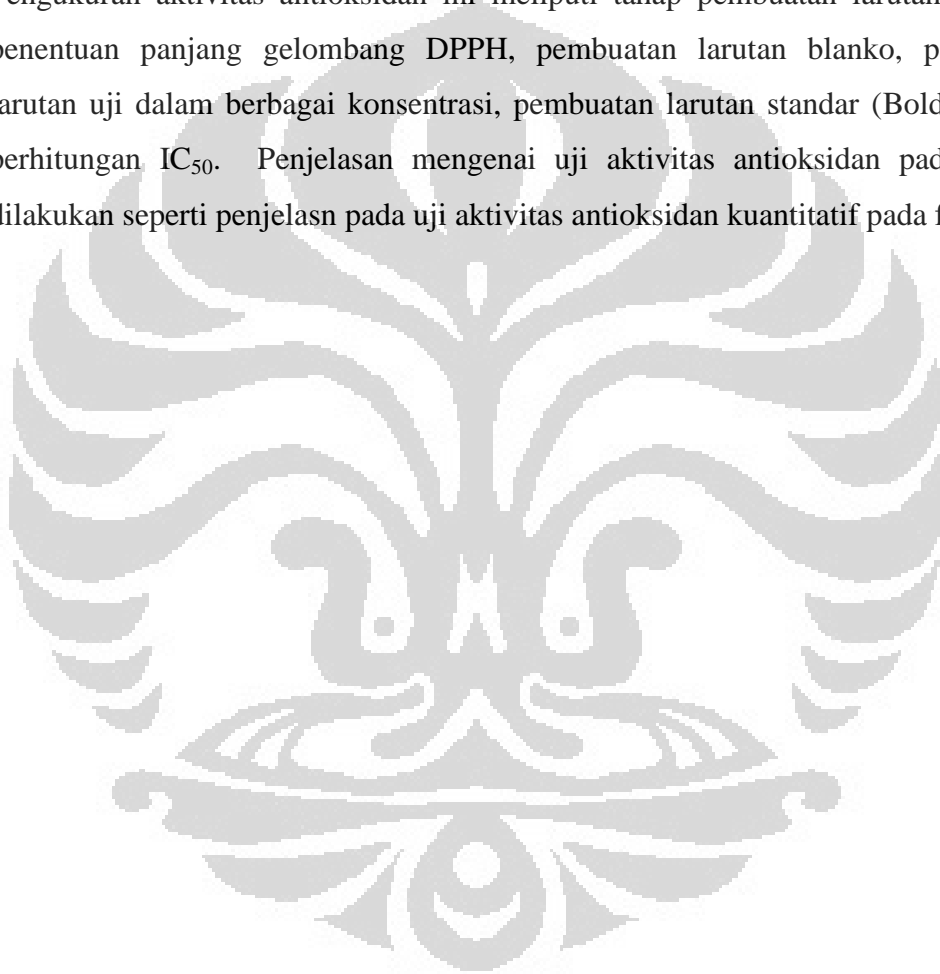
Pengujian spektrum Inframerah pada isolat dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer IR Spektrum RX I, PerkinElmer. Prosedurnya yaitu 1 mg sampel ditimbang dan dilarutkan ke dalam CHCl_3 . Larutan tersebut kemudian ditempatkan ke dalam pelet yang telah tersedia. Pelet yang telah siap tersebut selanjutnya diukur serapan infra merahnya.

3.4.10.5 Pemeriksaan Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$

Sebanyak 5 mg sampel dilarutkan dengan 1 mL CDCl_3 . Larutan tersebut dipipet ke dalam *tube* hingga tinggi 4 cm (± 2 mL). Lalu *tube* ditutup selanjutnya diukur dengan alat $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz dan $^{13}\text{C-NMR}$ 600 MHz.

3.4.11 Uji Antioksidan Kuantitatif Isolat

Pengujian aktivitas antioksidan pada isolat dilakukan secara kuantitatif. Pengukuran aktivitas antioksidan ini meliputi tahap pembuatan larutan DPPH, penentuan panjang gelombang DPPH, pembuatan larutan blanko, persiapan larutan uji dalam berbagai konsentrasi, pembuatan larutan standar (Boldin), dan perhitungan IC_{50} . Penjelasan mengenai uji aktivitas antioksidan pada isolat dilakukan seperti penjaslan pada uji aktivitas antioksidan kuantitatif pada fraksi.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan

Jenis tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Phoebe declinata* Nees. Sedangkan simplisia yang digunakan yakni bagian kulit batang dari tanaman tersebut. Gambar simplisia dapat dilihat pada Gambar 4.1. Alasan pemilihan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berdasar dari hasil penelusuran pustaka mengenai tanaman marga *Phoebe* (Jones & Kinghorn, 2005). *Phoebe declinata* Nees merupakan salah satu tanaman marga *Phoebe* asli Indonesia yang belum diteliti kandungan maupun efek antioksidannya. Sedangkan pada jenis *Phoebe* lain, seperti *Phoebe lanceolata*, *Phoebe grandis*, *Phoebe tavoyana*, *Phoebe pittieri*, *Phoebe formosana*, dan *Phoebe scorthechinii* diketahui mengandung senyawa alkaloid, contohnya alkaloid golongan aporfin dan indolkuinolisidin (Castro, Lopez, & Vergara, 1985; Chen, Huang, Lee, Ou, 1997; Awang, Mukhtar, Hadi, Litaudon, Latip, & Abdullah, 2006; Mukhtar et al., 2008; Omar, Elya, Nafiah, Awang, Mukhtar, & Hadi, 2010; Semwal, Rawat, & Singh, 2008). Berdasarkan penelitian Mukhtar, Aziz, Thomas, Hadi Litaudon, & Awang (2009) alkaloid golongan aporfin banyak ditemukan pada bagian kulit batang tanaman *Phoebe*. Alkaloid golongan ini dilaporkan pula memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, seperti boldin yang terkandung dalam kulit batang *Phoebe grandis* (Mukhtar, Aziz, Thomas, Hadi Litaudon, & Awang, 2009; Lau, Macha, Achike, Murugan, & Mustafa, 2011).

Kulit batang dari tanaman *Phoebe declinata* Nees diperoleh sebanyak 1,426 kg dalam bentuk simplisia kering . Determinasi tanaman *Phoebe declinata* Nees didapat dari Pusat Konservasi Tumbuhan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor (Lampiran 5). Kulit batang yang diambil adalah pada bagian cabang. Hal ini dimaksudkan agar pengambilan tidak mengganggu pertumbuhan tanaman. Selain itu, juga mempermudah dalam proses pengambilan simplisia itu sendiri. Untuk mempercepat proses pengeringan pada simplisia, bagian kulit batang yang telah dikumpulkan selanjutnya dirajang. Hasil rajangan disortasi dan

kemudian dilakukan proses pengeringan. Proses pengeringan bertujuan untuk mencegah adanya kerusakan simplisia. Menurut *World Health Organization* (2007) dengan adanya penurunan kadar air maka mutu simplisia lebih terjaga sehingga simplisia dapat disimpan dalam waktu lama. Pengeringan kulit batang *Phoebe declinata* Nees dilakukan dengan menggunakan sistem AC (*air conditioner*) selama 15 hari. Simplisia kering yang diperoleh adalah sebanyak 1,4 kg dari 3,8 kg simplisia basah. Setelah didapat simplisia kering, simplisia disortasi kembali untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing yang masih tertinggal. Kulit batang yang telah disortir kemudian dihaluskan dengan *blender* dan diayak dengan ayakan nomor B30. Dalam upaya mencegah adanya kerusakan ataupun penurunan kualitas simplisia, serbuk simplisia (Gambar 4.2) yang didapat disimpan dalam wadah bersih, kering, dan terlindung dari cahaya (*American Spice Trade Association*, 2011).

4.2 Penapisan Fitokimia Alkaloid Serbuk Simplisia

Penapisan fitokimia alkaloid pada serbuk simplisia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya alkaloid dalam simplisia sebelum dilakukan proses selanjutnya. Mula-mula, tahapan yang dilakukan adalah pembuatan larutan uji, yaitu 200 mg serbuk simplisia kulit batang *Phoebe declinata* Nees yang telah ditimbang, ditambahkan 5-7 tetes amoniak 58%, lalu didiamkan selama 2 jam. Penambahan amoniak dilakukan dengan tujuan untuk membasakan serbuk simplisia sehingga alkaloid yang bersifat basa akan mudah tertarik dalam pelarut yang digunakan (Akbar, Khan, Masood, & Iqbal, 2010). Sebelum dilakukan proses berikutnya, amoniak diuapkan selama 2 jam agar tidak mengganggu proses uji yang akan dilakukan. Serbuk simplisia kemudian ditambahkan 1 mL HCl 4N dan 9 mL metanol, dikocok, dipanaskan di penangas air selama 15 menit, didinginkan, dan disaring. Penambahan HCl 4N bertujuan untuk mengubah bentuk alkaloid yang bersifat basa menjadi bentuk garamnya, sehingga dapat larut dalam pelarut yang polar (Stephenson, 1921; Jones & Kinghorn, 2005). Sementara itu, digunakan metanol sebagai pelarutnya karena metanol adalah pelarut polar yang umumnya digunakan untuk ekstraksi senyawa organik, sehingga diharapkan mampu menarik senyawa alkaloid dari dalam

simplisia (Ghafour, Aziz, & Al Molla, 2010). Proses penyaringan dalam penapisan dilakukan untuk mendapat filtrat yang bening sehingga tidak mengganggu proses pengamatan saat menguji dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff). Filtrat yang diperoleh tersebut ditampung dan diuji dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff). Hal yang sama juga dilakukan pada pembanding. Pembanding yang digunakan dalam penapisan fitokimia ini adalah alkaloid yang umumnya ditemukan pada tanaman genus *Phoebe*, yakni boldin (Lampiran 6). Hasil dari penapisan fitokimia serbuk simplisia kulit batang *Phoebe declinata* Nees adalah positif terhadap pereaksi alkaloid (Tabel 4.1), yaitu ditandai dengan terbentuknya endapan (Gambar 4.3).

4.3 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan selama 30 menit pada 1,4 kg serbuk simplisia secara refluks. Metode ekstraksi secara refluks merupakan metode ekstraksi dengan bantuan panas, yaitu pada suhu titik didih pelarut (Depkes, 2000). Suhu tinggi akan berpengaruh langsung terhadap kecepatan kesetimbangan antara zat kimia terlarut dalam sel tanaman dan pelarutnya, dimana dengan adanya suhu tinggi maka kinetika dalam ekstraksi meningkat sehingga komponen kimia dapat lebih cepat larut dalam pelarutnya (Wang & Weller, 2006). Metode ekstraksi tersebut diharapkan mampu mengekstraksi simplisia secara sempurna sehingga mengoptimalkan penyarian senyawa yang akan diisolasi. Ekstraksi dilakukan berturut-turut menggunakan pelarut 5 L heksana hasil destilasi pada suhu ekstraksi kurang lebih 70°C sebanyak 6 kali dan 15 L diklorometan hasil destilasi pada suhu ekstraksi 40°C sebanyak dua puluh kali. Alasan pemilihan pelarut adalah didasarkan oleh polaritas pelarut. Heksana merupakan pelarut nonpolar sehingga berfungsi untuk menarik klorofil ataupun memisahkan senyawa-senyawa non polar lainnya sehingga tidak mengganggu pada proses isolasi (Monsálveza, Zapataa, Vargasa, Bertia, Bittnerb, & Hernández, 2010). Sedangkan diklorometan adalah pelarut yang tergolong lebih polar dari pada heksana. Oleh karena itu, dengan adanya peningkatan kepolaran tersebut diharapkan dapat memberikan hasil ekstraksi simplisia yang lebih baik dan lebih memudahkan untuk diisolasi (Ghasemzadeh, Jaafar, & Rahmat, 2011). Selain itu, pemilihan

diklorometan sebagai pelarut juga disebabkan oleh beberapa penelitian yang melaporkan bahwa senyawa alkaloid umumnya banyak ditemukan dalam ekstrak diklorometan (Mukhtar, Aziz, Thomas, Hadi, Litaudon, & Awang, 2009; Omar, Elya, Nafiah, Awang, Mukhtar, & Hadi, 2010). Untuk memberikan suasana basa, sebelum diekstraksi dengan diklorometan ampas perlu dilembabkan dengan 350 mL amoniak 58% sehingga alkaloid yang bersifat basa dapat mudah tersari melalui pelarut yang digunakan saat ekstraksi berlangsung. Hasil ekstraksi yang diperoleh dari tahapan tersebut disaring, filtrat ditampung, dan dikumpulkan serta diuapkan dengan penguap putar vakum dan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental heksana dan diklorometan. Berat ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan heksana dan diklorometan berturut-turut adalah 14,8 g dan 24,0 g (Tabel 4.2).

4.4 Penapisan Fitokimia Alkaloid Ekstrak Diklorometan

Penapisan fitokimia alkaloid pada ekstrak diklorometan dilakukan dengan menggunakan pereaksi alkaloid (Mayer, Dragendorff, Bouchardart) dan pereaksi semprot Dragendorff. Pada penapisan ini, pembanding yang digunakan adalah boldin. Hasil yang ditunjukkan dari penapisan fitokimia tersebut tercantum pada Tabel 4.3 serta Gambar 4.4 dan 4.5.

4.5 Uji Antioksidan Ekstrak Diklorometan

Metode uji antioksidan yang dilakukan untuk ekstrak diklorometan adalah metode DPPH. DPPH atau 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (Lampiran 7) merupakan radikal bebas yang digunakan sebagai model dalam pengukuran daya penangkapan radikal bebas. Metode peredaman menggunakan DPPH merupakan metode yang cepat, mudah, memiliki sensitifitas tinggi, memerlukan sedikit sampel, dan paling sering digunakan untuk skrining aktivitas antioksidan (Kim, Lee K.W., Lee H.J., & Lee C.Y., 2002; Koleva, Van Beek, Linssen, de Groot, & Evstatieva, 2002; Hanani, Mun'im, & Sekarini, 2005). Penggunaan DPPH dalam pengujian antioksidan dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Pengujian kuantitatif dilakukan dengan memanfaatkan alat spektrofotometer untuk menentukan IC_{50} (Molyneux, 2004). Sedangkan pengujian kualitatif merupakan

pengujian alkaloid pada kertas Whatman menggunakan pereaksi semprot Dragendorff (Abere, Ekoto, & Agoreyo, 2010).

Uji antioksidan pada ekstrak diklorometan adalah uji kualitatif, yaitu menggunakan pereaksi semprot DPPH. Hasil yang diperoleh dari uji antioksidan pada ekstrak diklorometan kulit batang *Phoebe declinata* Nees adalah positif, yakni ditunjukkan dengan terbentuknya warna bercak kuning dengan latar belakang ungu yang mirip seperti ditunjukkan oleh pembanding yang digunakan (boldin) (Gambar 4.6). Dengan kata lain, ekstrak diklorometan memiliki aktivitas antioksidan dan mengandung alkaloid, sehingga dapat diproses untuk tahap fraksinasi.

4.6 Fraksinasi dengan Kromatografi kolom dan Uji Antioksidan Fraksi

Ekstrak diklorometan yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan mengandung alkaloid dilakukan proses fraksinasi dengan kromatografi kolom. Ekstrak diklorometan yang digunakan dalam kromatografi kolom adalah 20 g. Kromatografi kolom pertama dilakukan dengan menggunakan fase gerak diklorometan-metanol yang ditingkatkan kepolarannya dan fase diam 300 g silika gel 60 (70-230 mesh). Hasil dari kromatografi kolom tersebut yakni berupa 12 fraksi gabungan yang didasarkan atas kemiripan pola pemisahan pada kromatogram KLT. Melalui uji alkaloid menggunakan pereaksi semprot Dragendorff pada kromatogram KLT diketahui bahwa sebanyak 6 fraksi (A-3, A-5, A-6, A-8, A-9, dan A-10) dari 12 fraksi mengandung alkaloid. Fraksi-fraksi yang mengandung alkaloid tersebut diuji aktivitas antioksidan secara kualitatif dan kuantitatif dengan standar boldin. Dari pengujian tersebut, diketahui bahwa dua dari keempat fraksi (A-3 dan A-10) tidak menunjukkan adanya bercak kuning (Gambar 4.7), sehingga hanya empat fraksi (A-5, A-6, A-8, dan A-9) yang dapat diuji secara kuantitatif menggunakan DPPH.

Aktivitas antioksidan secara kuantitatif diukur berdasarkan inhibisi pada konsentrasi tertentu yang mampu meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Metode ini didasarkan pada reduksi larutan metanol radikal DPPH yang berwarna ungu oleh adanya penghambat radikal bebas sehingga akan menyebabkan terjadinya peluruhan warna dari ungu ke kuning. Adanya peningkatan konsentrasi

penghambat radikal bebas tersebut akan sebanding dengan penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang optimalnya. Aktivitas antioksidan dengan metode ini, dinyatakan sebagai konsentrasi inhibisi (*Inhibitory Concentration*) atau konsentrasi efektif (*Effective Concentration*) 50%, yang disimbolkan dengan IC_{50} atau EC_{50} (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar, & Lakshman, 2005). Tahapan awal metode ini adalah dengan menentukan panjang gelombang optimum DPPH yang berkisar antara 515-520 nm. Setelah dilakukan optimasi, didapatkan bahwa DPPH memiliki panjang gelombang optimum sebesar 516 nm (Gambar 4.8). Oleh karena itu, pengukuran serapan selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang 516 nm. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif menunjukkan bahwa fraksi A-6 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dari ketiga fraksi lainnya, yakni sebesar 68,9 $\mu\text{g/mL}$. Dalam hal ini, IC_{50} fraksi A-5, A-8, dan A-9 yang diperoleh berturut-turut adalah 256,8; 92,2; dan 180,8 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, IC_{50} standar (boldin) yakni sebesar 5,8 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.4). Kurva regresi uji aktivitas antioksidan pada fraksi dan standar tersebut tercantum pada Gambar 4.9.a, 4.9.b, dan 4.9.c.

Berdasar data KLT, fraksi A-6 (775,53 mg) masih memiliki beberapa senyawa maka fraksi tersebut dikromatografi kolom kembali dengan fase gerak heksana-etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya dan fase diam 8 g silika gel 60 (70-230 mesh). Kromatografi kolom kedua menghasilkan 8 fraksi dengan 1 fraksi (B-4, 137 mg) mengandung alkaloid. Pada fraksi yang mengandung alkaloid diuji aktivitas antioksidan secara kualitatif dengan pembandingan boldin. Hasil dari uji aktivitas antioksidan kualitatif menunjukkan bahwa fraksi B-4 aktif (Gambar 4.10) sehingga fraksi tersebut selanjutnya diproses untuk mendapat senyawa murni.

4.7 Pemurnian Isolat

Proses pemurnian dilakukan melalui tahap rekristalisasi dan pencucian. Tahapan rekristalisasi meliputi penambahan pelarut yang tidak melarutkan kristal dan pelarut yang mampu melarutkan kristal. Kemudian campuran pelarut tersebut didiamkan dalam suhu ruang hingga terbentuk kristal dengan jumlah yang tetap. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan pelarut yang tidak melarutkan kristal,

yakni dengan memisahkan antara kristal dan pelarut tersebut secara hati-hati dengan menggunakan pipet. Kristal tersebut larut dalam etil asetat dan tidak larut dalam heksana. Oleh karena itu, pelarut yang digunakan dalam proses rekristalisasi adalah heksana dan etil asetat. Bobot kristal yang diperoleh dari proses kristalisasi adalah sebesar 61,6 mg yang selanjutnya disebut sebagai isolat PD2. Isolat ini diketahui positif merupakan alkaloid. Hal ini diketahui dari adanya bercak warna jingga (R_f : 0,22) hasil uji menggunakan pereaksi semprot Dragendorff yang telah dibandingkan dengan standar (R_f : 0,43) (Gambar 4.11).

Kemurnian isolat PD2 ditentukan dengan mengukur titik leleh kristal. Suatu senyawa dikatakan murni bila memiliki jarak leleh yang tajam, yakni $\pm 2^\circ$ (Stanford Research System, 2005). Pada pengujian ini diketahui titik leleh isolat PD2 yaitu 102-104 $^\circ\text{C}$, sehingga dapat diartikan bahwa isolat PD2 adalah murni. Hasil elusi dua dimensi dengan kromatografi lapis tipis dengan perbandingan eluen diklorometan- heksana (95:5) dan dilanjutkan dengan eluen etil asetat-heksana (95:5) berturut-turut menunjukkan pola bercak tunggal dengan nilai R_f 0,18 dan 0,70 (Gambar 4.12).

4.8 Karakterisasi Isolat

Isolat PD2 secara organoleptis adalah berupa kristal kotak tidak berwarna dengan titik leleh 102-104 $^\circ\text{C}$. Isolat PD2 ini ditemukan dari fraksi 100:0 (diklorometan-metanol) pada kolom pertama dan 85:15 (Heksan-etilasetat) pada kolom kedua.

Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat PD2 memiliki panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) sebesar 210, 232, dan 279 nm (Gambar 4.13) yang merupakan tipe absorpsi senyawa aromatis yang tersubstitusi gugus pendorong elektron. Menurut Nugroho, Yuniarti, Estyastono, Supardjan, Hakim (2006) gugus metoksi merupakan salah satu gugus pendorong elektron (Sun, You-Min, Zhang, Hong-Yu, Chen, De-Chan & Liu, 2002) yang dapat mempengaruhi panjang gelombang maksimum akibat dari pergeseran batokromik (Supratman, 2010). Informasi yang didapat dari data IR (Gambar 4.14) adalah berupa pita serapan pada bilangan gelombang 3000 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur =C-H aromatis serta 1592,13 dan 1516,26 cm^{-1}

yang merupakan vibrasi ulur C=C cincin. Bilangan gelombang $1028,20\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi ulur C–N dan untuk vibrasi ulur asimetris –C–O–C– terdapat pada bilangan gelombang $1235,18\text{ cm}^{-1}$. Vibrasi tekuk dari C–H metil terdapat pada bilangan gelombang $1463,84\text{ cm}^{-1}$. Gugus C–H metil (metoksi) terlihat pada bilangan gelombang $2956,66$ dan $2835,28\text{ cm}^{-1}$. Secara ringkas data bilangan gelombang isolat PD2 tercantum pada Tabel 4.6.

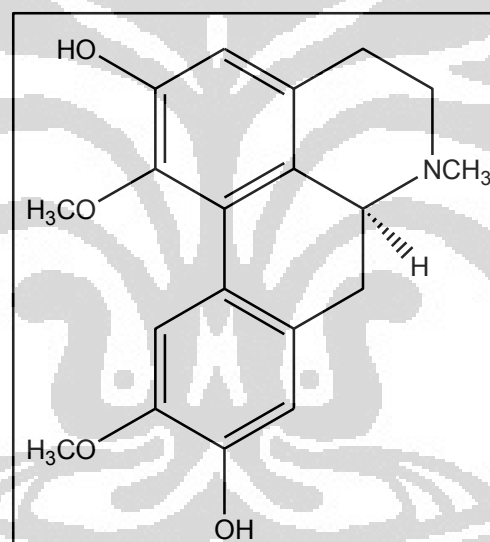
Pada pengujian $^1\text{H-NMR}$ diinformasikan bahwa isolat (senyawa PD2) yang diukur belum memiliki kemurnian yang baik untuk dianalisis jumlah protonnya. Oleh karena itu, hanya gugus-gugus spesifik yang dapat diketahui dari pengujian $^1\text{H-NMR}$. Sinyal proton terbentuk pada pergeseran kimia 0-7 ppm. Hal ini mengindikasikan isolat PD2 memiliki lingkungan proton aromatis (δ 6-8 ppm). Dalam spektrum $^1\text{H-NMR}$ terlihat adanya satu sinyal –NH pada pergeseran kimia 1,62 (1H, bs); beberapa sinyal –CH₃ pada 1,03-1,80 ppm (3H, s); sinyal –OCH₃ pada 3,86 (3H, s), 3,88 (3H, s), 3,89 (3H, s), dan 3,91 (3H, s); serta sinyal Ar–H pada pergeseran 6,88-0,07 ppm (1H, m). Pelarut yang digunakan pada pengujian $^1\text{H-NMR}$ yakni CDCl₃, muncul pada pergeseran kimia 7,27 ppm (Freichels, Velty, Lecomte, & Jerome, 2012). Pergeseran kimia proton senyawa PD2 hasil dari pengukuran dengan $^1\text{H-NMR}$ terdapat pada Gambar 4.15.

Data yang diperoleh dari spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (Gambar 4.16) menunjukkan bahwa sinyal metoksi berada pada pergeseran kimia 55,86 ppm; 55,88 ppm; 55,90 ppm; dan 55,95 ppm, sinyal metil dan metin ditunjukkan pada 9,48-119,22 ppm, serta sinyal karbon kuartener pada pergeseran kimia 133,26-148,99 ppm. Hasil tersebut didasarkan pada data DEPT yang menunjukkan bahwa senyawa PD2 memiliki gugus metin dan metil serta tidak memiliki gugus metilen (Gambar 4.17). Pada spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ ini, CDCl₃ muncul pada pergeseran kimia 77,03 ppm (Omar, 2006). Pergeseran kimia ^1H dan $^{13}\text{C-NMR}$ tercantum dalam Tabel 4.7.

Berdasar data spektrum UV-Vis, IR, DEPT, ^1H dan $^{13}\text{C-NMR}$ dapat disimpulkan bahwa isolat PD2 merupakan alkaloid yang memiliki inti aromatis dengan substitusi gugus metoksi. Oleh karena bobot molekul isolat belum diketahui maka isolat belum mampu dianalisis lebih lanjut untuk menentukan strukturnya.

4.9 Uji Antioksidan Kuantitatif Isolat

Aktivitas antioksidan isolat dan pembanding ditentukan melalui uji peredaman radikal DPPH secara kuantitatif. Berdasar dari uji aktivitas antioksidan yang dilakukan, diketahui bahwa isolat PD2 dan boldin memiliki IC_{50} berturut-turut sebesar 148,4 dan 5,8 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 4.5). Menurut Aliyu, H Ibrahim, Musa, MA Ibrahim, Oyewale, dan Amupitan (2010) rendahnya aktivitas antioksidan isolat PD2 dapat disebabkan oleh sedikitnya donor atom hidrogen yang mampu meredam radikal DPPH, yakni hanya berasal dari gugus $=\text{NH}$ (Vukovic, Sukdolak, Solujic, & Niciforovic, 2010). Sementara itu, boldin (Gambar 4.18) beraktivitas lebih kuat karena memiliki dua donor atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksil. Kurva regresi aktivitas antioksidan standar dan isolat terdapat pada Gambar 4.19.



Gambar 4.18. Struktur boldin

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

1. Hasil uji aktivitas antioksidan kualitatif dan uji alkaloid ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak diklorometan memiliki aktivitas antioksidan dan mengandung alkaloid.
2. Hasil fraksinasi kromatografi kolom pertama diperoleh 4 fraksi alkaloid yang beraktivitas antioksidan, yaitu dengan IC_{50} 256,8; 68,9; 92,2; dan 180,8 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi A-6 merupakan fraksi dengan aktivitas antioksidan tertinggi (68,9 $\mu\text{g/mL}$)
3. Hasil uji aktivitas antioksidan kualitatif pada 1 fraksi alkaloid (B-4) dari kromatografi kolom kedua menunjukkan bahwa fraksi B-4 beraktivitas antioksidan.
4. Isolat PD2 diperoleh dari fraksi B-4 yang merupakan hasil kolom kedua dari fraksi A-6 (68,8 $\mu\text{g/m}$). Isolat PD2 merupakan alkaloid yang memiliki gugus metoksi dan inti aromatis.
5. Hasil uji aktivitas antioksidan kuantitatif isolat PD2 yaitu dengan nilai IC_{50} 148,4 $\mu\text{g/mL}$ tergolong lemah dibanding boldin yang memiliki IC_{50} 5,8 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Saran

Pemurnian isolat PD2 perlu dilakukan kembali, yakni baik menggunakan metode HPLC maupun kristalisasi. Dalam upaya untuk mendapatkan struktur, isolat PD2 yang telah murni perlu dianalisis dengan HR-MS, IR, ^1H , dan ^{13}C -NMR. Untuk memastikan strukturnya dapat pula dilakukan pengujian dengan X-Ray pada kristal yang terbentuk. Oleh karena isolat PD pada penelitian ini hanya diuji aktivitas antioksidannya, maka perlu adanya penelitian mengenai uji aktivitas lain pada isolat. Selain itu, karena *Phoebe declinata* Nees adalah tanaman yang baru pertama kali diteliti, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan pada fraksi-fraksi lain serta ekstrak metanol dari kulit batang *Phoebe declinata* Nees.

DAFTAR ACUAN

- Achmad, A.S., Hakim, E.H., Makmur, L., Rizal, H., dan Zamri, A. (1990). Ilmu Kimia Tanaman lauraceae Indonesia: III. Isolasi Aktinodafnin dan Boldin dari *Lisea glutinosa*. *Proceedings ITB*, 23(1), 1-8.
- Ansel, H.C. (1989). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi* (Ed. ke-4). Jakarta: UI Press.
- Arbain, D. (1987). A Preliminary Investigation of The Alkaloid of *Phoebe lanceolata*. *Science Technologies Development*, 4(1), 41-44.
- Asghar M.N., Khan, I.U., Zia, I., Ahmad, M., dan Qureshi, F.A. (2008). Modified 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzo Thiazoline)-6-Sulphonic Acid Radical Cation Decolorization Assay for Antioxidant Activity of HUMAN Plasma and Extract of Traditional Medicinal Plants. *Acta Chimica Slovenica*, 55, 408-418.
- Asikin V. (2001). Antioksidan *endogen dan penilaian status antioksidan*. Dalam : Kursus penyegaran 2001. Radikal bebas dan antioksidan dalam kesehatan. Dasar, aplikasi, dan pemanfaatan bahan alam.
- Awang K., Mukhtar, M.R., Hadi, A.H.A., Litaudon, M., Latip, M., dan Abdullah, N.R. (2006). New Alkaloid from *Phoebe grandis* (Nees) Merr. *Natural Product Research*, 20(6), 567-572.
- Ayinde, B.A, Omogbai, E.K.I, dan Ikpefan, E.O. (2011). Comparative Cytotoxic and Antiproliferative Effect of *Persea americana* Mill. (Lauraceae) Leaf, Stem and Root Barks. *Nigerian Journal of Pharmaceutical Science*, 10 (1), 16-26.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan RI. *Kisereh*. Januari 5, 2012. <http://www.indonesianforest.com>
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan. *Kebun Tanaman Obat Badan POM RI*. Januari 5, 2012. <http://www.pom.go.id/public.pdf>.
- Bandoniene, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P.R., dan Gruzdiene, D. (2002) Detection and Activity Evaluation of Radical Scavenging Compounds by Using DPPH free radical and online HPLC-DPPH Methods. *Europe Food Research Technologies*, 214, 143–147.
- Barja, G. (2004). Free radicals and Aging. *TRENDS in Neurosciences*, 27(10), 595-560.

- Bentz, A.B. (2010). A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability. *Young Investigators*, 19(10), 1-14.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., dan Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanism of Antioxidant using the DPPH Free Radical Method. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologies*, 30, 609-615.
- Cadenas, E., dan Sies, H. (1998). The lag phase. *Free Radical Research*, 28, 601-609.
- Cairns, D. (2004). *Intisari Kimia Farmasi* (Ed. ke-2). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran, 164-165.
- Castro, C.O., Lopez, V.J, dan Vergara, G.A. (1985). Aporphine Alkaloid from *Phoebe pittieri*. *Phytochemistry*, 24(1), 203-204.
- Cathcart, M.K. (2004). Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/ Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. *American Thromb Vasc Biol*, 24, 23-28.
- Chanda, S. dan Dave, R. (2009). In Vitro for Antioxidant Activity Evaluation and Some Medicinal Plants Possessing Antioxidant Properties: An Overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981-996.
- Chaverri, C., Díaz, C., dan Cicció, F. (2011). Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. *Brazil Chemistry Society*, 22(4), 741-745 .
- Chen, C.C., Huang, Y.L., Lee, S.S., dan Ou, J.C. (1997). Laurodionine, a New Oxalyl-fused Aporphine Alkaloid from *Phoebe formosana*. *Natural Product*, 60(8), 826-827.
- Chik, W.D.W., Amid, A., dan Jamal, P. (2010). Purification and Cytotoxicity Assay of Tomato (*Lycopersicon esculen* Tum) Leaves Methanol Extract as Potential Anticancer Agent. *Applied Science*, 10(24), 3283-3288.
- Creswell, C.J. (1982). *Analisis Spektrum Senyawa Organik. Edisi ke-2. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung : ITB.
- D.K Semwal, Rawat, U., Bamola, A., dan R. Semwal. (2009). Antimicrobial Activity of *Phoebe lanceolata* and *Stephania glabra*: Preliminary Screening Studies. *Scientific Research*, 1 (3), 662-666.

- Dai, J. dan Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Davies, K.J. dan Pryor, W.A. (2005). The Evolution of Free Radical Biology & Medicine: A 20-year history. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1263-1290.
- Defeng WU, Ph.D., dan Arthur I. Cederbaum, Ph.D. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research and Health*, 27(4), 277-284.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia edisi keempat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal.1061.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Volume VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Department of Health and Human Services. (2011). *Report on Carcinogens* (Ed. ke-12). U.S: National Toxicology Program, hal. 148.
- D.K Semwal, Rawat, U., Bamola, A., dan R. Semwal. (2009). Antimicrobial Activity of *Phoebe Lanceolata* and *Stephania Glabra*: Preliminary Screening Studies. *Scientific Research*, 1 (3), 662-666.
- Dai, J. dan Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- Davies, K.J. dan Pryor, W.A. (2005). The Evolution of Free Radical Biology & Medicine: A 20-year history. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1263-1290.
- Defeng WU, Ph.D., dan Arthur I. Cederbaum, Ph.D. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research and Health*, 27(4), 277-284.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a). *Farmakope Indonesia edisi keempat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal.1061.
- Department of Health and Human Services. (2011). *Report on Carcinogens* (Ed. ke-12). U.S: National Toxicology Program, hal. 148.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Volume VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan, hal.1-12.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*. Jakarta : Departemen Kesehatan, hal.1-12.
- Departemen Kesehatan Republik ndonesia. (2007). *Kebijakan Obat Tradisional Tahun 2007*. Jakarta: Departemen Kesehatan, 14.
- Esterbauer, H., Gebick, J., Puhl, H., dan Jürgens, G. (1992). Review: The Role of Lipid Peroxidation and Antioxidants in Oxidative Modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 341-390.
- Evans, W.C. (1996). *Pharmacopoeial and related drugs of biological origin*. In: Trease and Evan's Pharmacognosy. London: WB Saunders Co, hal. 354-356.
- Fa'nan, W dan Werff, H.V.D. (2008). *Flora of China* (Vol. 7). Beijing: Science Press, hal. 189-200.
- Fang, Y.Z., Yang, S., dan Wu, G. (2002). Free Radical, Antioxidant, and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Freichels, H., Velty, R.A., Lecomte, P dan Jerome, C. (2012). Easy functionalization of amphiphilic poly(ethylene oxide)-b-poly(ϵ -caprolactone) copolymer micelles with unprotected sugar: synthesis and recognition by lectins. *Polymer Chemistry*, 6(3), 1436-1445.
- Fried, B. dan Sherma, J. (2005). *Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcel Dekker.
- Garbarino, J., Troncoso, N., Frasca, G., Cardile, V., dan Russo, A. (2008). Potential Anticancer Activity Against Human Epithelial Cancer Cells of *Peumus boldus* leaf Extract. *Natural Product Community*, 3, 2095-2098.
- Gaur, R.D. (1999). *Flora of the District Garhwal North West Himalaya* (1st ed.). Srinagar Garhwal: Trans-Media, 77, 59.
- Gazi, M.R., Kanda, K., Yasuda, M., dan Kato, F. (2004) Optimisation of Cultural Conditions and Some Properties of Radical Scavenging Substances from *Sporobolomyces Salmonicolor*. *Pakistan Journal of Biological Science*, 7, 1365–1370.
- Gerhardt, D. et al. (2009). Boldine: A Potential New Antiproliferative Drug Against Glioma Cell Lines. *Investigational New Drug*, 27, 517-525.

- Gharavi, N. dan El-Kadi, A.O.S. (2005). tert-Butylhydroquinone is a Novel Aryl Hydrocarbonyl Receptor Ligand. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 33(3), 365-372.
- Gilbert, DL. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 1-14.
- Gomez-Flore, R., et al.(2008). Antimicrobial Activity of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) and *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Asteraceae) Leaf Extracts and Active Fractions Against *Mycobacterium tuberculosis*. *American-Eurasian Journal of Science Research*, 3(2), 188-194.
- Grassi, D., Desideri, G., dan Ferri, C. (2010). Flavonoids: Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*, 2, 889-902.
- Gritter, R. J., J. M. Bobbitts, dan A. E. Schwarting. (1987). *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi)*, Edisi ke-2 (penerjemah: K. Padmawinata). Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Gupta, V.K. dan Sharma, S.K.(2006). Plants as Natural Antioxidant. *Natural Product Radiance*, 5(4), 326-334.
- Gutteridge, R, Halliwell, B. (1994). *Antioxidants nutrition and disease*. Oxford : Oxford University Press.
- Halliwell, B. (1995). How to Characterize an Antioxidant: an Update. *Biochemistry Society Symposium*, 61, 73-101.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition Reviews*, 55, S44-9.
- Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R. (2005). Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 127-133.
- Hanukoglu, S. (2006). Antioxidant Protective Mechanism Against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 System in Steroidogenic Cells. *Drug Metabolism Reviews*, 38, 171-196.
- Harborne, JB. (1997). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.

- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI, 205-211.
- Harmita. (2007). *Elusidasi Struktur*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, hal. 3-18.
- Haryono, B. (2007). *Secondary Metabolite from the stem Bark of Litsea javanica (Lauraceae)*. Bandung: JBPTITBPP.
- Hegnauer, R. (1966). *Chemotaxonomie der pflanzen* (vol. 4). Basel: Birkhauser Verlag.
- Hendayana, S. (1994). *Kimia Analitik Instrumen* (Ed. ke-1). Semarang: IKIP Semarang Press.
- Hilton, J.W. (1989). Antioxidant: Function, Type, and Necessity of Inclusion in Pet Food. *Canadian Veterinary Journal*, 30. 682-684.
- Hossain, S.J., El-Sayed, M.A., Mohamed, A.H.H., Sheded, M.G., dan Aoshima, H. (2010). Phenolic Content, Antioxidative, Anti- α -amylase and Anti- α -glucosidase Activitie of *Solanum diphyllum* L. *Bangladesh Journal of Botany*, 38(2), 139-143.
- Islam, M.K., Sohrab, M.H., dan Jabar, A. (2012). Caffeine and p-Anisaldehyde from The Fruits of *Enterolobium Saman* Prain. *Pharmaceutical Science and Research*, 3(1), 168-170.
- Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S., dan Lee, C.S. (2000). Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharmacology Research*, 42(4), 361-71.
- Joseph NM, Monika, S, Alok, S., Alok, M., dan Shruti, R. (2009). In-Vitro and In-Vivo Models for Antioxidant Activity Evaluation: A Review. *Pharmaceutical Sciece and Research*, 1(1), 1-10.
- Joshi, S.C., Padalia, R.C., Bisht, D.S., dan Mathela, C.S. (2009). Terpenoid Diversity in the leaf Essential Oils of Himalayan Lauraceae Species. *Chemistry & Biodiversity*, 6, 1364-1373.
- Jozwiak, G.W. dan Hajnos, M.W. (2007). Preparative-Layer Chromatography of An Extract of Alkaloids from *Fumaria officinalis*. *Acta Chromatographica*, 18, 207-218.

- Kanofsky, J.R. (1988). Singlet Oxygen Production from the Peroxidase-catalyzed Oxidation of Indole-3-acetic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(28), 14171-14175.
- Kanofsky, J.R. (2000). [6] Assay for Singlet-Oxygen Generation by Peroxidases Using 1270-nm Chemiluminescence. *Method in Enzymology*, 319, 59-67.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss Reaction and Mechanism of Toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50.
- Kim DK, Lee KW, Lee HJ, dan Lee CY. (2002). Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Phenolic Phytochemical. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50(13), 3713-7.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. (2002) Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemistry Analysis*. 2001, 13, 8–17.
- Konrath, E.L., Santin, K., Nassif, M., Latini, A., Henriques, A., dan Salbego, C. (2008). Antioxidant and Pro-oxidant Properties of Boldine on Hippocampal Slices Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation in Vitro. *Neuro Toxicology*, 29(6), 1136-1140.
- Kosela, S. (2010). *Cara mudah dan sederhana penentuan struktur molekul berdasarkan spektra data (NMR, Mass, IR, UV)*. Jakarta: Lembaga Penerbit FE UI.
- Kostermans, A.J.G.H. (1957). Lauraceae. *Reinwardtia*, 4, 193-256.
- Krasteva, I. dan Nikolov, S. (2008). Flavonoid in *Astragalus corniculants*. *Quimica Nova*, 31(1), 59-60.
- Kryk, J. *Citology*. (n.d.). Januari 22, 2012. <http://www.goldiesroom.org>.
- Kumanan, R., Manimaran, S., Saleemulla, K., Dhanabal, S.P., dan Nanjan, M.J. (2010). Screening of bark *Cinnamomum tamala* (Lauraceae) by using α -amylase Inhibition Assay for Anti-diabetic Activity. *Pharmaceutical and Biomedical Reserach*, 1(2), 69-72.
- Kumar, S. (2011). Free Radicals and Antioxidant: Human and Food System. *Advances in Applied Science Research*, 2(1), 129-135.

- Kusumadewi, S. (2009). *Aplikasi Informatika Medis untuk Penatalaksanaan Diabetes Melitus secara Terpadu*. Yogyakarta: Seminar Nasional Aplikasi Teknologi Informasi.
- Lau, Y.S., Machha, A., Achike, F.I., Murugan, D., dan Mustafa, M.R. (2011). The Aporphine Alkaloid Boldine Improves Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats. *Experimental Biology and Medicine*, 237 (1), 93-98.
- Lebreton, L. et al. (2011). Trophic Importance of Diatoms in An Intertidal *Zostera Noltii* Seagrass bed: Evidence from Stable Isotope and Fatty Acid Analyses. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(1), 140-153.
- Lee, J., Koo, N., dan Min, D.B. (2004). Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 3, 21-33.
- Lima, M.H. (2004). *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals*. Storey, K.B. (Ed). *Function Metabolism: Regulation and Adaptation*. New Jersey: John Wiley & Sons, 319-362.
- Lin, X., et al. (2012). A New Cytotoxic Sesquiterpene Quinone Produced by *Penicillium* sp. F00120 Isolated from a Deep Sea Sediment Sample. *Marine Drugs*, 10, 106-115.
- Ljungman, M. dan Hanawalt, P.C. (1992). Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Molecular Carcinogenesis*, 5(4), 264-269.
- Ma, Z.Z., Xu, W., Jensen, N.H., Roth, B.L., Chen, L.Y.L., dan Lee., D.Y.W. (2008). Isoquinoline Alkaloids Isolated from *Corydalis yanhusuo* and Their Binding Affinities at the Dopamine D1 Receptor. *Molecules*, 13, 2303-2312.
- Mahendra, K., Murthy, Y.L.N., Narasimha, R.C.V., Bala, M.K.K., dan Machiraju, P.V.S. (2011). Isolation of Polyprenols from Tobacco and Their Separation by Adopting New Chromatographic Techniques. *Natural Product Plant Research.*, 1(1), 125-133.
- Mandal, S., Satish Y., Sunita Y., dan Nema, R.K. Antioxidant: A Review. *Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104.
- Marxen, K., Vanselow, K.H, Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., dan Hansen, U.P. (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extract of some Microalgal Species by Linier Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors*, 7, 2080-2095.

- Mendiola, J.A., Meizoso, I.R., Senorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., dan Ibanez. (2008). Antioxidant in Plant Food and Microalgae Extracted Using Compressed Fluid. *EJEAFChe*, 7(8), 3301-3309.
- Methanex Corporation. (2006, September). *Technical Information & Safe Handling Guide for Methanol*. Juni 2, 2012. <http://www.methanol.org>.
- Mollataghi, A., Hadi, A.H.A., Awang, K., Mohamad, J., Litaudon M., dan Mukhtar, M.R. (2011). (+)-Kunstlerone, a New Antioxidant Neolignan from the Leaves of *Beilschmiedia kunstleri* Gamble. *Molecules*, 16-6582-6590.
- Molyneux, P. (2004). The Use of The Stable Free radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) dor Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science Technologies*, 26(2), 211-219.
- Moussa, S.A. (2008). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Romanian Journal of Biophysics*, 18(3), 225-236.
- Mukhtar, M.R et al. (2009). A New Proaporphine Alkaloid from The Bark of *Phoebe grandis*. *Molecules*, 14, 1227-1233.
- Mukhtar, M.R. et al. (2008). New Proaphorpinines from the Bark of *Phoebe scortechinii*. *Natural Product Research*, 221(11), 921-926.
- Mukhtar, M.R., et al. (1997). Phoebe grandis A and B, proaporphine-trytamine dimers, from *Phoebe grandis*. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 45(7), 1543-1546.
- Mun'im, A., Azizahwati, dan Trastiana. (2008). Aktivitas Antioksidan Cendawan Suku Pleurotaceae dan Polyporaceae dari Hutan UI. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(1), 36-41.
- Nagulendran K, Velavan S, Mahesh R, dan Begum VH. (2007). In vitro antioxidant activity and total polyphenolic content of *Cyperus rotundus* rhizomes. *E-Journal of Chemistry*, 4, 440-449.
- Ndie, E.C., Nnamani, C.V., dan Oselebe, H.O. (2010). Some Physicochemical Characteristics of Defatted Flours Derived from African Walnut (*Tetracarpidium conoforum*): An Underutilized Legume. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9), 909-9011.
- Nugroho, A.E., Yuniarti, N., Estyastono, E.P., Supardjan, dan Hakim, L. (2006). Penetapan aktivitas antioksidan dehidrozingeron melalui penangkapan radikal hidroksi dengan metode deoksiribosa. *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(3), 116-122.

- Nugroho, I.A. (2010). *Lokakarya Nasional Tanaman Obat Indonesia*. (Edisi ke-2). Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, 1.
- Nurmillah, O.Y. (2009). *Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang, dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., dan Speisky, H. (2006). Boldine and Its Antioxidant or Health Promoting Properties. *Chemico-Biological Interactions*, 159 (1): 1–17.
- Oloyede, G.K., Onocha, P.A., Soyinka, J., Oguntokun, O.W, dan Thonda, E. (2010). Phytochemical Screening, Antimicrobial and Antioxidant Activities of four Nigerian Medicinal Plants. *Annals of Biological Research*, 1(2), 114-120.
- Omar, H., Elya, B., Nafiah, M.A., Awang, K., Mukhtar, W.R., dan Hadi, A.H.A. (2010). Antiplasmodial from *Phoebe tavoyana*. *The Relationship Between Living Organism and Environment*, 191-202.
- Omar, H. (2009). *Alkaloid Isolated from Litsea Petiolata and Phoebe Tavoyana (Lauraceae)*. Kuala Lumpur: Departemen of Chemistry Faculty Science University of Malaya, hal. 102-103.
- Paitz, R.T., Bowden, R.M., dan casto, J.M. (2011). Embryonic Modulation of Maternal Steroids in European Starlings (*Sturnus vulgaris*). *The Royal Society*, 278, 99-106.
- Panjaitan, R.G.P., Handharyani, E., Chairul, Masriani, Zakiah, Z., dan Manalu, W. (2007). Pengaruh Pemberian Karbon Tetraklorida terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus. *Makara Kesehatan*, 11(1), 11-16.
- Pavia, D. L. (2009). *Introduction to Spectroscopy* (Ed. ke-6). Kanada: Cengage Learning, hal. 23.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., dan Engel, R.G. (2004). *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A Small-Scale Approach* (Ed. ke-2). USA: Cengage Learning, hal. 797.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., dan Ilieva, M. (2002) Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains during the Cultivation of Red beet (*Beta vulgaris*) Hairy Root Cultures. *Z Naturforsch*, 57c, 640–644.

- Perry, L.M. dan Metzgr, J. (1980). *Medicinal Plants East and Southeast Asia, Attribute Properties and Uses*. London: MIT Press, Cambridge, Mass, hal. 202-202.
- Plazzo, M.C., Agius, B.R., Wright, B.S., Haber, W.A., Moriarity, D.M., dan Setzer, W.N. (2009). Chemical Composition and Cytotoxic Activities of Leaf Essential Oils of Four Lauraceae Tree Species from Monteverde, Costa Rica. *Record of Natural Product*, 3(1), 32-37.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., dan Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant Activity, Phenol, and Flavonoid Contents of some Selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- Pramushinta, A. (2008). *Pengaruh Pemberian Teh Hijau terhadap Kadar Enzim Alkali Phospatase Serum Tikus Wistar yang diberi Kloramfenikol*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Prince, M. (2008). *The Prevalence of Dementia Worldwide*. London: Alzheimer's Disease International.
- Prieto, P., Pineda, M., dan Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analysis Biochemistry*, 269, 337-341.
- Priyadi, H., Takao, G., Rhmawati, I., Supriyanto, B., Nursal, W.I., dan Rahman, I. (2010). *Five hundred Plant species in Gunung Halimun Salak National Park, West Java*. Bogor: Center for International Research.
- Raju, S.M. dan Madala, B. (2005). *Illustrated Medical Biochemistry*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher.
- Rao, S.P., dan Sunkada, S. (2007). *Making Sense of Boiling Points and Melting Points*. Bombay: Resonansi, hal. 51.
- Rocha, O.P. et al. (2011). Chemical Profile and Biological Potential of Non-Polar Fractions from *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) Montagne (*Ceramiales, Rhodophyta*). *Molecules*, 16, 7105-7114.
- Rohman, A., Riyanto, S., Dahliyanti, R., dan Pratomo, D.B. (2009). Penangkapan Radikal 22-Difenil-1-Pikril Hidrazil oleh Ekstrak Buah *Psidium guajava* L. dan *Averrhoa carambola* L. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7(1), 1-5.
- Roth, H. J. dan Blaschke. (1988). *Analisis Farmasi*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.

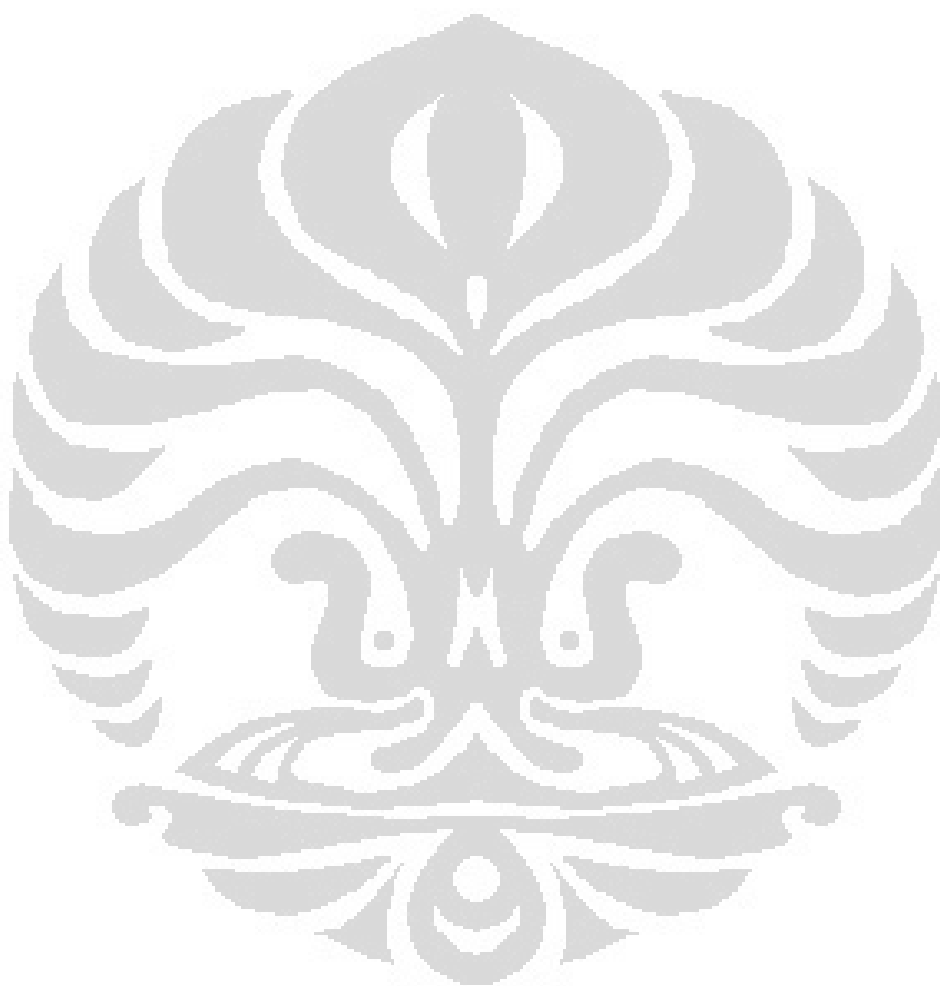
- Rufino, A.R., Brant, A.J.C., Santos, J.B.O., Ferreira, M.J.P., dan Emerenciano, V.P. (2005). Simple Method for Identification of Skeleton of Aporphine Alkaloid from ^{13}C NMR Data Using Artificial Neural Networks. *Chemistry Information Model*, 45, 645-651.
- Saidi, N., Hadi, A.H.A, Awang, K., dan Mukhtar, M.R. (2009). Aporphine Alkaloid from Bark of *Cryptocarya ferrea*. *Indonesia Journal of Chemistry*, 9(3), 461-465.
- Sari, L.O.R.K. (2006). Pemanfaatan Obat Tradisional dengan Pertimbangan Manfaat dan Keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 3(1), 1-7.
- Sarma, A.D., Mallick, A.R, dan Ghosh, A.K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Condition: An Overview. *International Journal of Pharma Science and Research*, 1(3), 185-192.
- Sastrohamidjojo, H. (2001). *Kromatografi*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Scott, G. (1988). Antioxidant. *The Chemical Society of Japan*, 61, 165-170.
- Semwal, D.K., Rawat, U., dan Singh, G.J.P. (2008). Further Aporphine Alkaloids from *Phoebe lanceolata*. *Molbank*, M581, 1-5.
- Semwal, D.K., Rawat, U., Bamola, A., dan Semwal, R. (2009). Antimicrobial Activity of *Phoebe Lanceolata* and *Stephania Glabra*: Preliminary Screening Studies. *Scientific Research*, 1 (3), 662-666.
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, Y.S.R., Reddy, dan De, B. (2010). Free Radicals, Antioxidants, Diseases, and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *Pharmaceutical Science Review and Research*, 3(1), 91-100 .
- Setiawan, B. (1997). *Ensiklopedi Nasional Indonesia* (Vol. 15). Jakarta: Delta Papyrus.
- Shahidi, F. dan Zhong, Y. (2005). Chapter 12. *Antioxidant: Regulatory Status*. In F. Shahidi (Ed). *Bailey's Industrial Oil and fat Products* (Ed. ke-6, vol. 6, pp. 491-509). New York: Wiley Interscience.
- Shahwar, D., Shafiq-ur-Rehman, Ahmad, N., Ullah, S., dan Raza, M.A. (2010). Antioxidant activities of the selected plants from the Family Euphorbiaceae, Lauraceae, Malvaceae, dan Balsaminaceae. *African Journal of Biotechnology*, 9(7), 1086-1096,

- Shivappasad, H. N., S. mohan, M.D. Kharya, M. R. Shiradkar, & K. Lakshman. (2005). In-Vitro models for antioxidant. *Pharmaceutical Reviews*, 3(4), 1-11.
- Shrivastav, S., Sindhu, R. K., S. Kumar, dan P. Kumar. (2009). Anti-Psoriatic and Phytochemical Evaluation of Populnea Bark Extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 1(1), 176-185.
- Silverstain, R. M., Bassler, G. C., dan Morrill, T. C. (1986). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (Ed. ke-4) (Hartono dkk, Penerjemah). Jakarta: Erlangga.
- Soumyanath, A., dan Sriyayanta, S. (2006). *Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants*. London: Taylor & Francis Group.
- Speisky, H., Cassels, B.K., Lissi, E.A., dan Videla, L.A. (1991) Antioxidant Properties of The Alkaloid Boldine in Systems Undergoing Lipid Peroxidation and Enzyme Inactivation. *Biochemistry Pharmacology*, 41, 1575–1581.
- Srivastava, A., Tandon, P., Ayala, A.P., dan Jain. (2011). Solid state Characterization of An Antioxidant Alkaloid Boldine using vibrational Spectroscopy and Quantum Chemical Calculations. *Vibrational Spectroscopy*, 5(1), 82-88.
- Stahl, E., (1969). *Apparatus and general techniques in TLC*. Dalam : Stahl, E.(ed). Thin layer Chromatography a laboratory handbook. Terj. Dari Dunnschicht chromatographie, oleh Ashworth, M.R.F. Berlin: Springer-Verlag, 61-77.
- Stang, D. (2012, Januari 22). *Phoebe declinata*. Januari 27, 2012. <http://zipcodezoo.com/Plants>.
- Stévigny, C., Bailly, C., dan Leclercq, J.Q. (2005). Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloid. *Curr. Med. Chemistry Anti-Cancer Agents*, 5, 173-182.
- Sudjadi. (1985). *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius
- Sukandar E. Y. *Tren dan Paradigma Dunia Farmasi, Industri-Klinik- Teknologi Kesehatan*, disampaikan dalam orasi ilmiah Dies Natalis ITB. Januari 6, 2012. http://itb.ac.id/focus/focus_file/orasi-ilmiah-dies-45.pdf.

- Sun, You-Min, Zhang, Hong-Yu, Chen, De-Chan dan Liu, Cheng-Bu. (2002). *Theoretical Elucidation on the Antioxidant Mechanism of Curcumin : A DFT Study*. Jinan: Shandong University.
- Supratman, U. (2010). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya padjajaran, hal 10-21.
- Suwena, M. (2006). *Bioprospek Tumbuhan Liar Edibel dalam Kehidupan Masyarakat di Sekitar Kawasan Hutan Gunung Salak*. Bogor: Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Tandon, V., Gupta, B.M., dan Tandon, R. (2005). Free Radicals/ Reactive Oxygen Species . *JK-Practitioner*, 12(3), 143-148.
- Teo, J. (2011, Oktober 7). *The Goodness of Antioxidant and How it Prevent Many Disease*. Januari 21, 2012. <http://www.platinumnetworkers.com>.
- Thomet, F.A., Pinol, P., dan Villena, J., dan Reveco, P.G. (2011). In Vitro Cytotoxic Evaluation of a Novel Phosphinyl Derivative of Boldine. *Molecules*, 16, 2253-2258.
- Tjindarbumi, D, dan Mangunkusumo, R. (2002). Cancer in Indonesia, Present and Future. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 32(1), S17-S21.
- Touchstone, J.C. (1992). *Practice of Thin Layer Chromatography* (Ed. ke-3). Canada: John Wiley & Sons.
- Touchstone, J.C., dan M.F. Dobbins. (1983). *Practice of thin layer chromatography*. Canada : John Wiley & Sons, 2-12.
- Trease, G.E dan Evans, W.C. (1978). *Pharmacognosy* (Ed. ke-11). London: Bailliere Tindall, hal. 584-585.
- Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., dan Chanchao, C. (2011). Jozwiak, G.W. dan Hajnos, M.W. (2007. In Vitro Antiproliferative Activites of Partially Purified Trigona Laeviceps Propolis from Thailand on Human Cancer Cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(37), 1-8.
- Utami, P dan Tim Lentera. (2005). *Tanman Obat untuk Mengatasi Diabetes Mellitus*. Jakarta: AgroMedia Pustaka, 27.
- Valko, M., Leibfritz, D, Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., dan Telser, J. (2007). Free radical and Antioxidant in Normal Physiological Function and Human Disease. *Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.

- Van der Werff, H. (2003). A Synopsis of The Genus *Bailschmiedia* (Lauraceae) in Madagascar. *Missouri Botanical Garden*, 25(1), 77-92.
- Venkateswarlu E., Raghuram R.A., Goverdhan, P., Swapna R.K., dan Jayapal R.G. (2011). In Vitro dan In Vivo Antioxidant Activit of Methenolic Extract of *Solena amplexicaulis* (Whole Plants). *Pharmacy and Biological Sciences*, 1(4), 522-533.
- Vukovic, N., Sukdolak, S., Solujic, S., dan Niciforovic, N. (2010). Subtituted Imino and Amino Derivatives of 4-hydroxycoumarins as Novel Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Agents: Synthesis and In vitro Assessments. *Food Chemistry*, 120, 1011-1018.
- Wang, M., Jin, Y., Li, J., Ho, C. (1999). Two Novel Beta Carboline Compound from the Maillard Reaction between Xylose and Tryptophan. *Agricultural of Food Chemistry*, 47, 48-50.
- Wall, P.E. (2005). *Thin-Layer Chromatography A Modern Practical Approach*. UK: The Royal Society of Chemistry, 1. (Wang, dan Weller. (200). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 300-312.
- Wanasundara, P.K.J.P.D. dan Shahidi, F. (2005). Chapter 11. *Antioxidant: Regulatory Status*. In F. Shahidi (Ed). *Bailey's Industrial Oil and fat Products* (Ed. ke-6, vol. 6, pp. 431-474). New York: Wiley Interscience.
- WHO. (2008). *Traditional medicine*. Januari 6, 2012. <http://www.who.int/mediacentre>.
- Williamson, K.S., Hensley, K., dan Floyd, R.A. (2003). Fluorometric and Colorimetric Assessment of Thiobarbituric Acid-Reactive Lipid Aldehydes in Biological Matrices. *Method in Pharmacology and Toxicology*, 1, 57-65.
- Wu, D. dan Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*, 27(4), 277-284.
- Yeh-Siang, L., Subramaniam, G., Hadi, A.H.A., Murugan, D., dan Mustafa, M.R. (2011). Reactive Oxygen Species-Induced Impairment of Endothelium-Dependent Relaxations in Rat Aortic Rings: Protection by Methanolic Extracts of *Phoebe grandis*. *Molecules*, 16, 2990-3000.
- Yoosu, S., Namseok, C., dan Minoru, T. (2009). Two New Isomeric Lignans from *Eusideroxylo zwageri*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(3), 356-359.

Yu, B., Cook, C., dan Santanam, N. (2009). The Aporphine Alkaloid Boldine Induces Adiponectin Expression and Regulation in 3T3-L1 Cells. *Medicinal Food*, 12(5), 1074-1083.





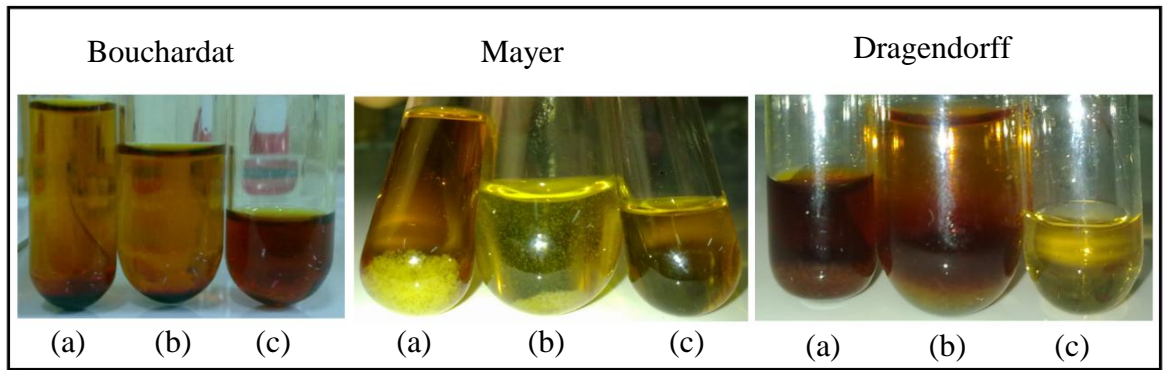
GAMBAR



Gambar 4.1 Batang *Phoebe declinata* Nees



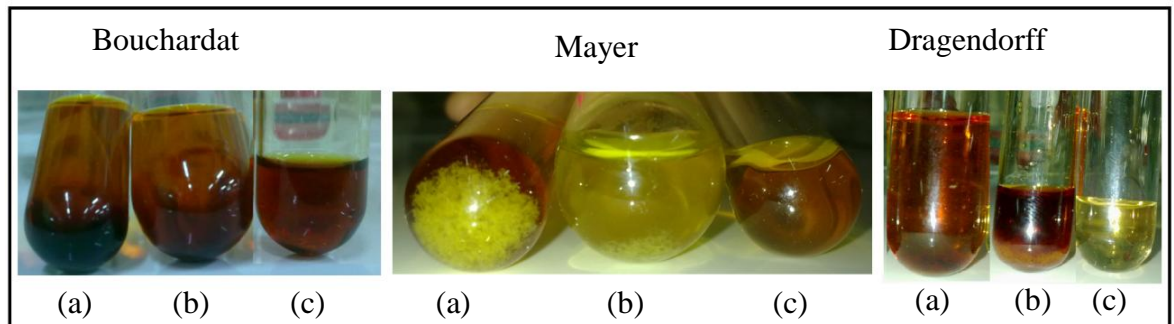
Gambar 4.2 Serbuk simplisia *Phoebe declinata* Nees.



Keterangan : a. Blanko positif (boldin); b. Zat Uji ; c. Blanko negatif (reagen)

Gambar 4.3 Uji alkaloid dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff) pada simplisia *Phoebe declinata* Nees.





Keterangan : a. Blanko positif (boldin); b. Zat Uji ; c. Blanko negatif (reagen)

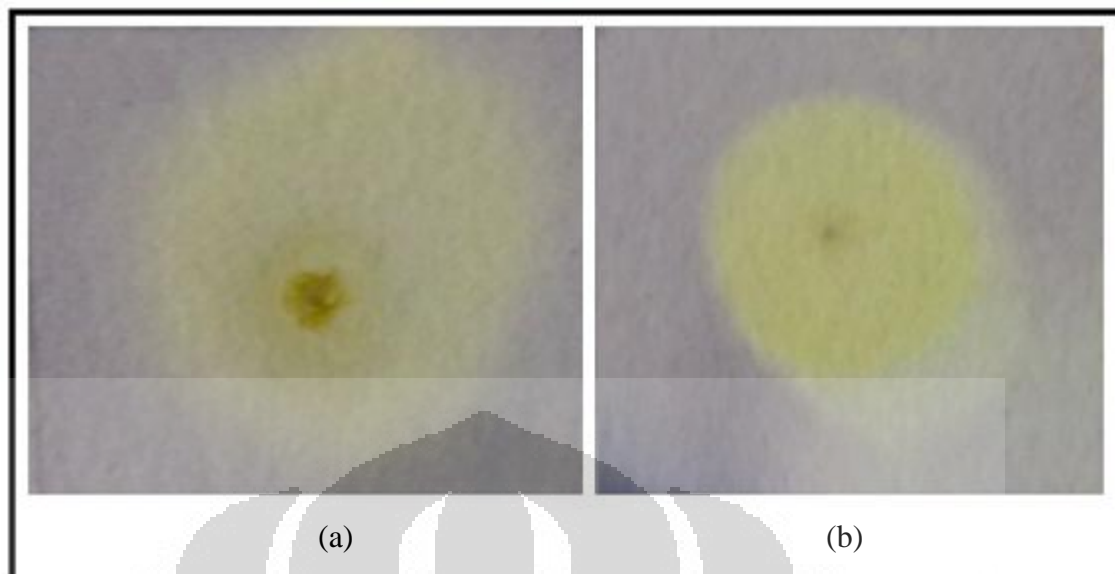
Gambar 4.4 Uji alkaloid dengan pereaksi alkaloid (Bouchardat, Mayer, Dragendorff) pada ekstrak diklorometan





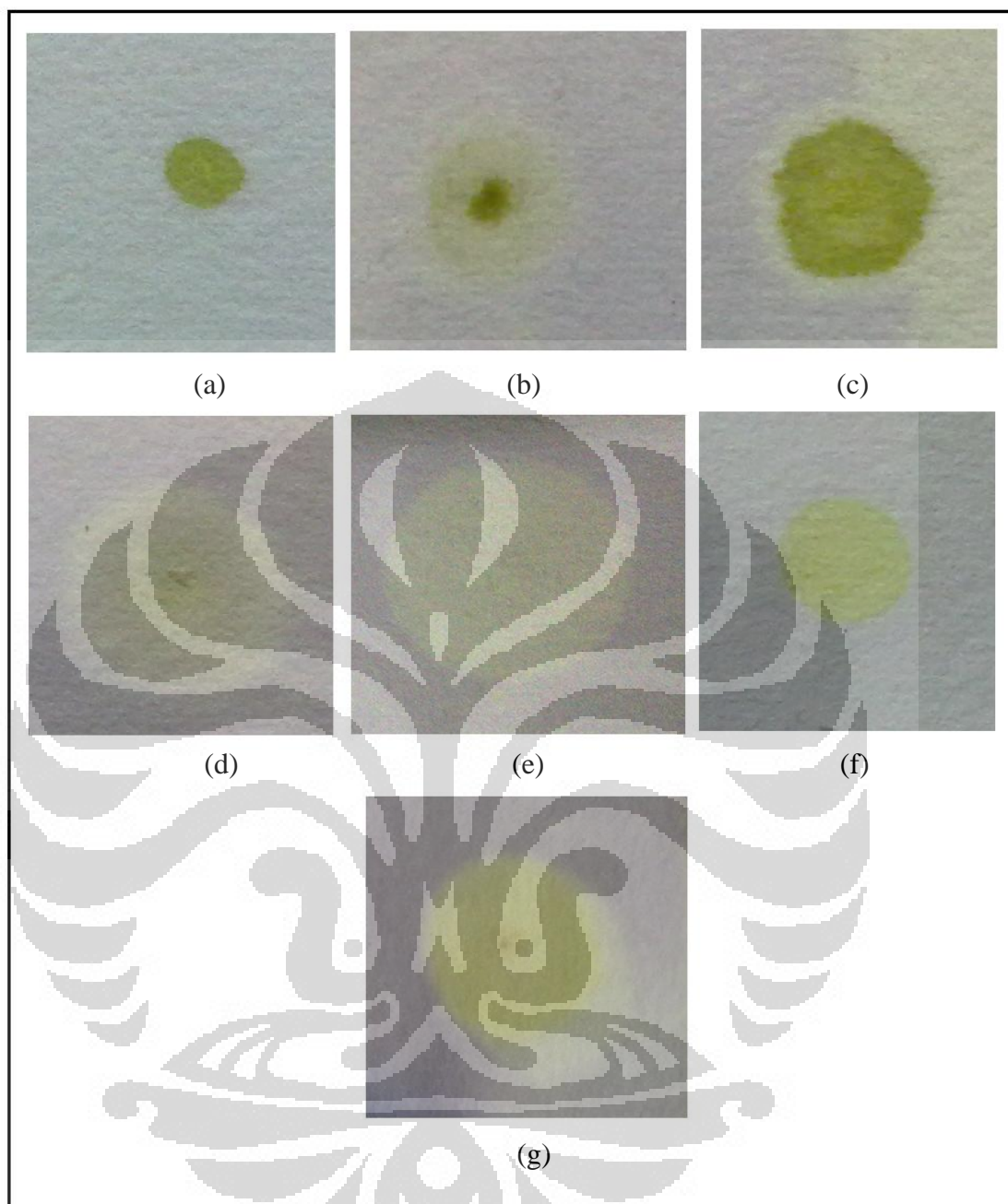
Keterangan : a. Zat Uji dielusi dengan 4:1 (heksana-etilasetat)
b. Blanko (+) (Boldin) dielusi dengan metanol 100%

Gambar 4.5 Uji alkaloid pada ekstrak diklorometan dengan pereaksi semprot Dragendorff

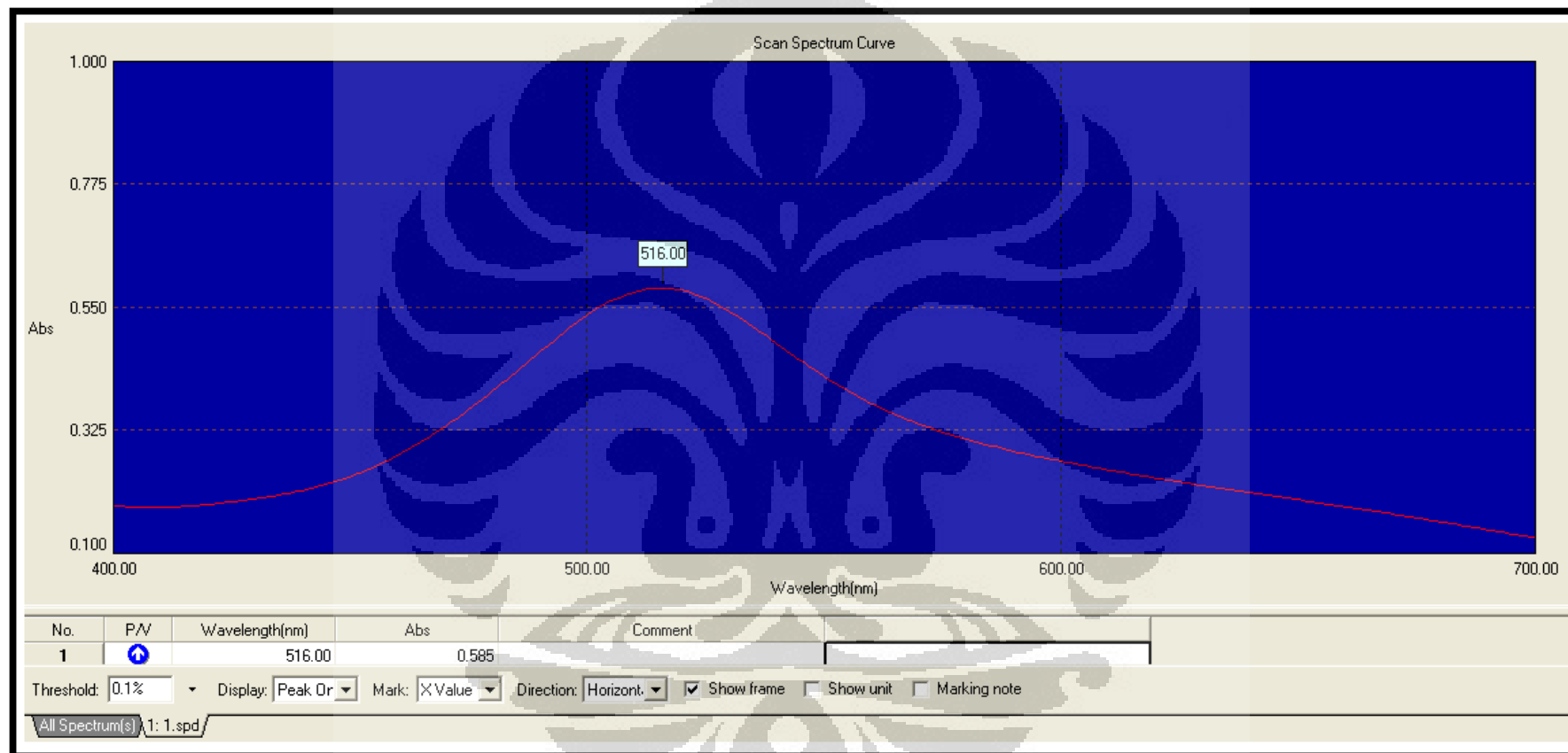


Keterangan : a. Zat Uji; b. Blanko (+) (Boldin)

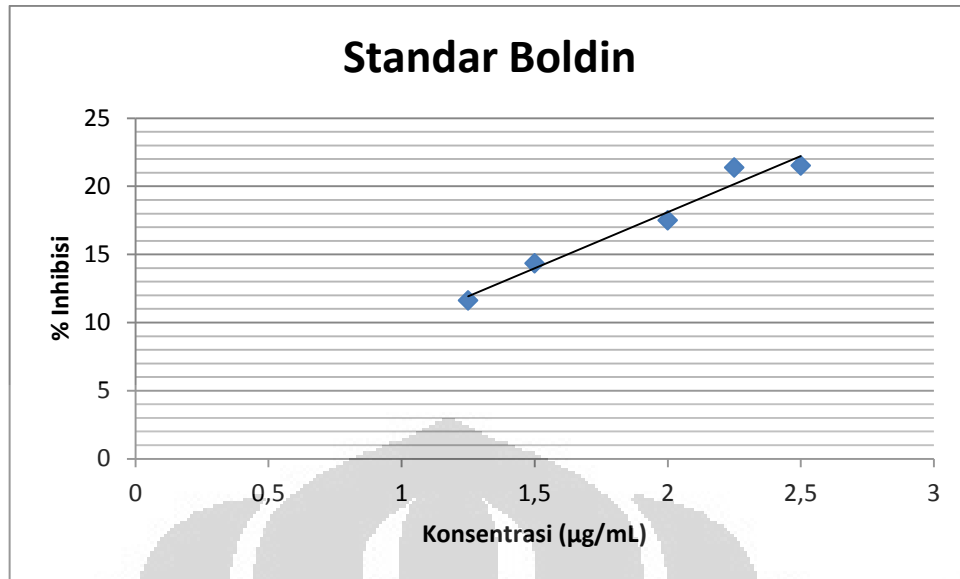
Gambar 4.6 Uji antioksidan dengan pereaksi semprot DPPH pada ekstrak diklorometan



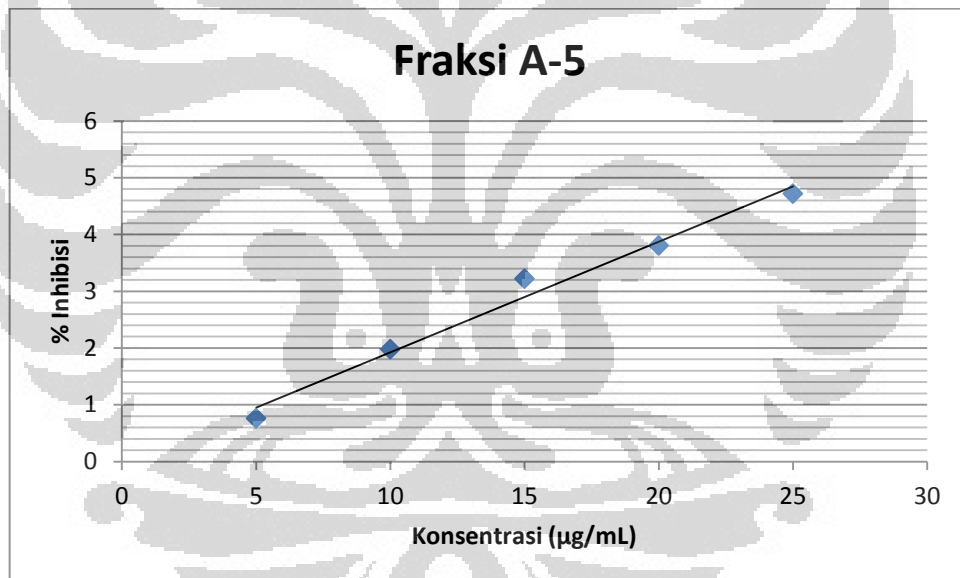
Keterangan : a. A-3; b. A-5; c. A-6; d. A-8; e. A-9; f. A-10; g. boldin
Gambar 4.7 Uji antioksidan pada fraksi alkaloid hasil kolom pertama (A-3, A-5, A-6, A-8, A-9, A-10) dengan pereaksi semprot DPPH



Gambar 4.8 Absorbansi DPPH pada panjang gelombang optimum (516 nm) dengan pelarut metanol

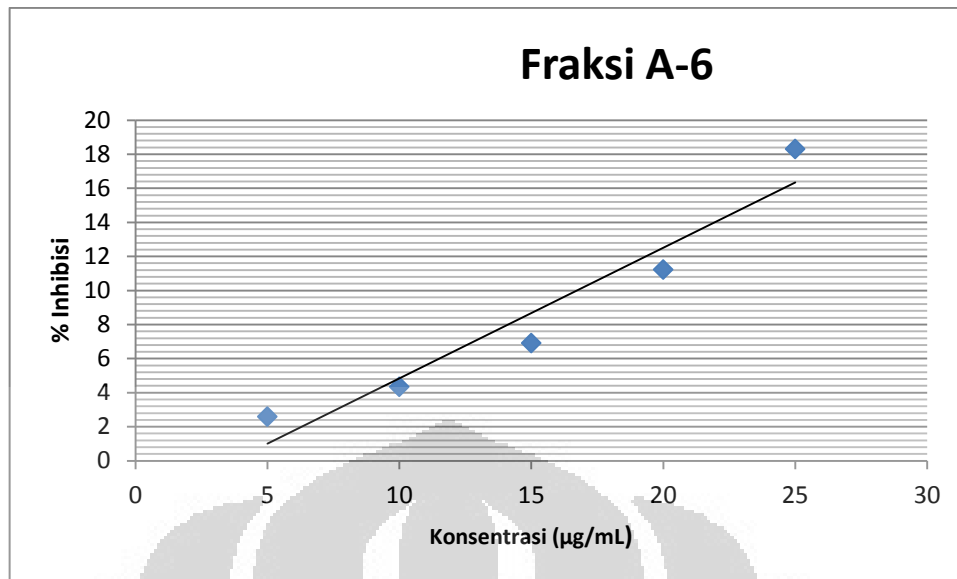


$$y = 8,2346x + 1,6282 \quad R^2 = 0,9662$$

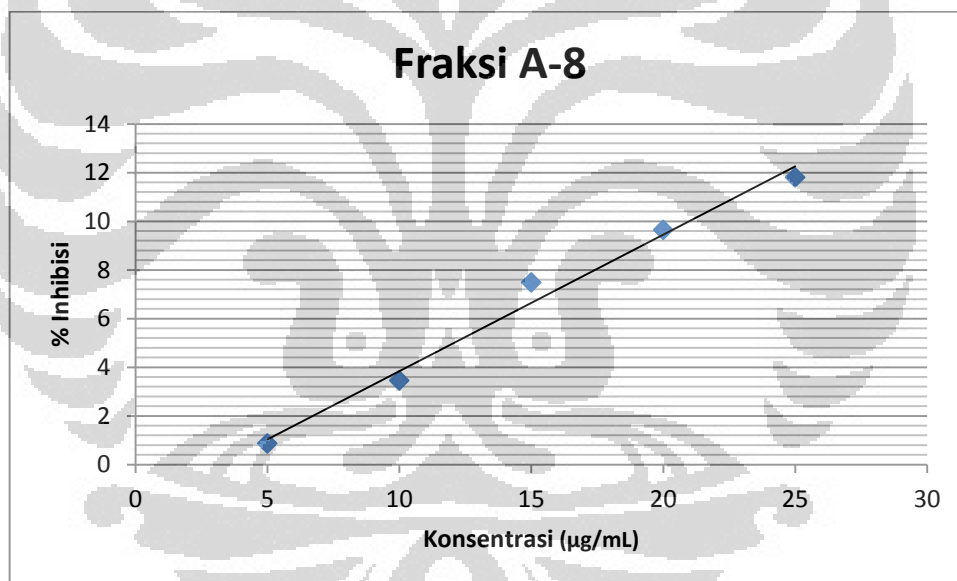


$$y = 0,19486x - 0,0257 \quad R^2 = 0,9831$$

Gambar 4.9.a Kurva regresi uji aktivitas antioksidan standar dan fraksi A-5 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.

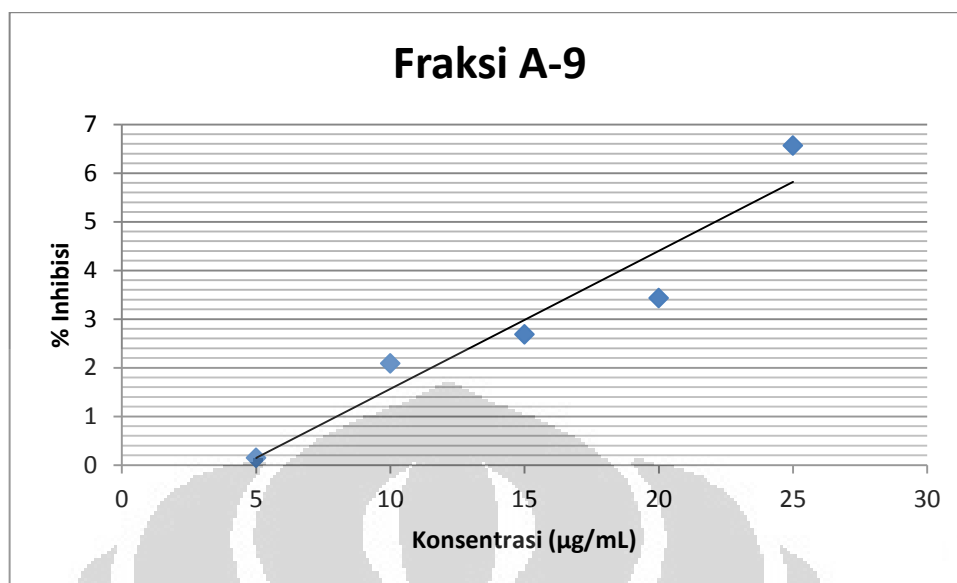


$$y = 0,7664x - 2,8209 \quad R^2 = 0,9281$$



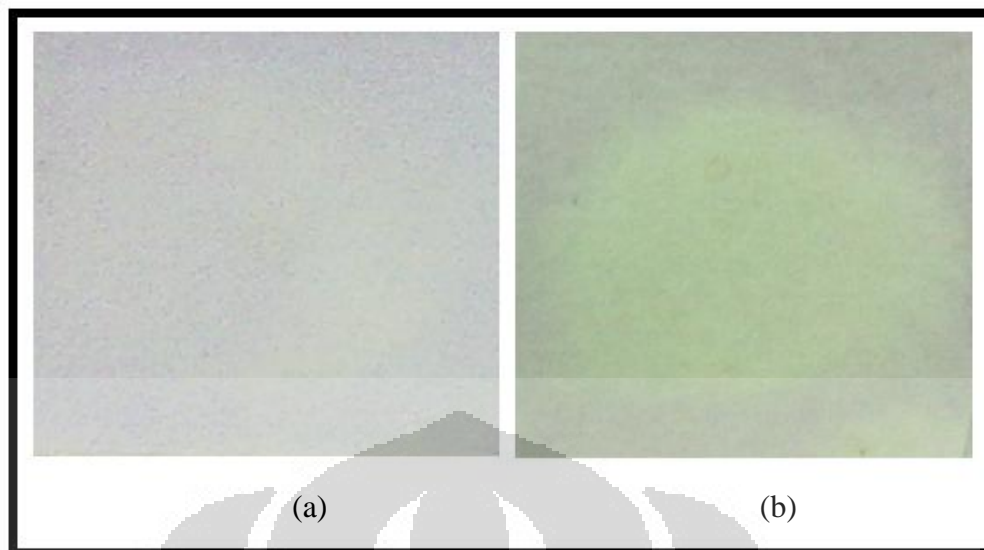
$$y = 0,5613x - 1,7703 \quad R^2 = 0,9859$$

Gambar 4.9.b Kurva regresi uji aktivitas antioksidan fraksi A-6 dan A-8 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.



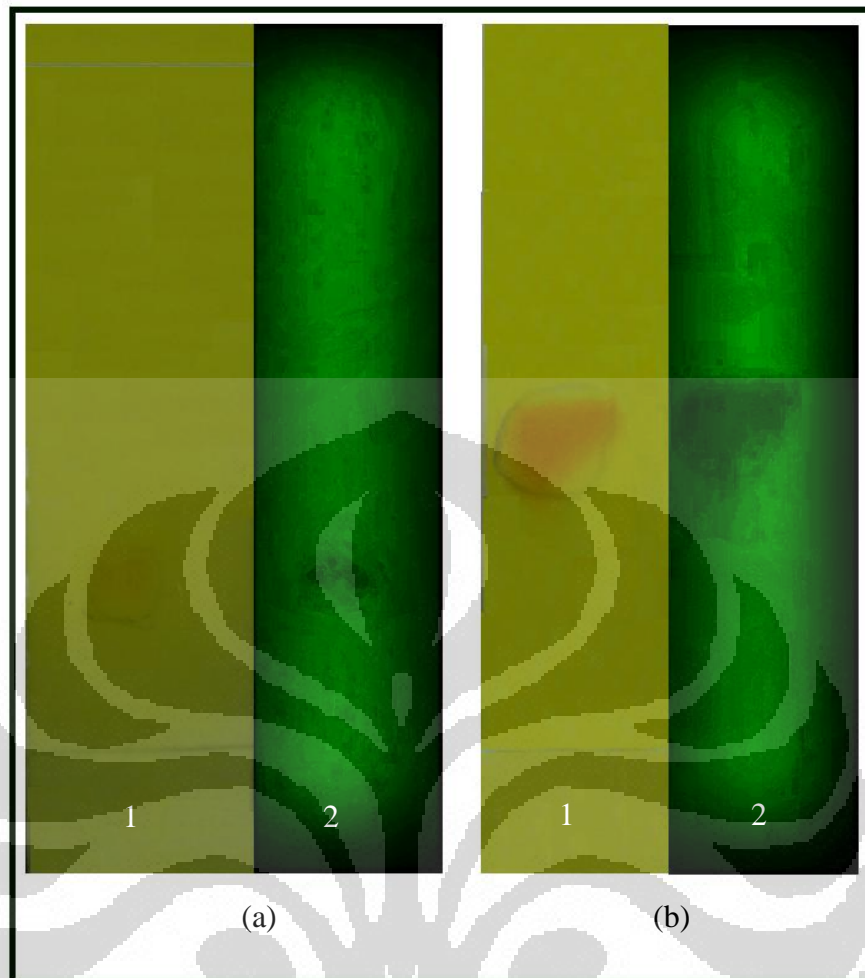
$$y = 0,2836x - 1,2687 \quad R^2 = 0,9153$$

Gambar 4.9.c Kurva regresi uji aktivitas antioksidan fraksi A-9 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.



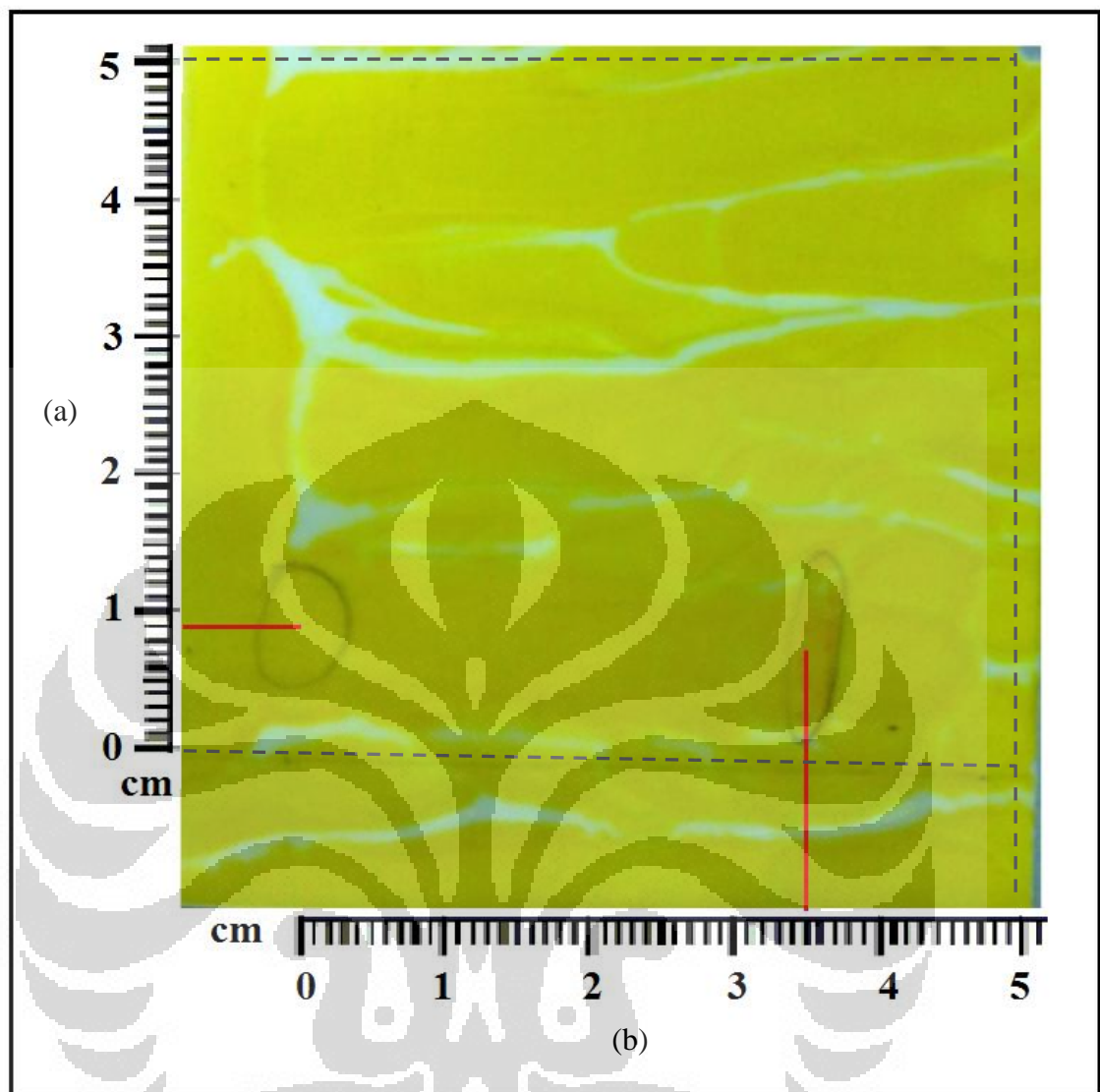
Keterangan : a. B-4; b. Boldin

Gambar 4.10 Uji antioksidan pada fraksi alkaloid hasil kolom kedua (B-4) dengan pereaksi semprot DPPH



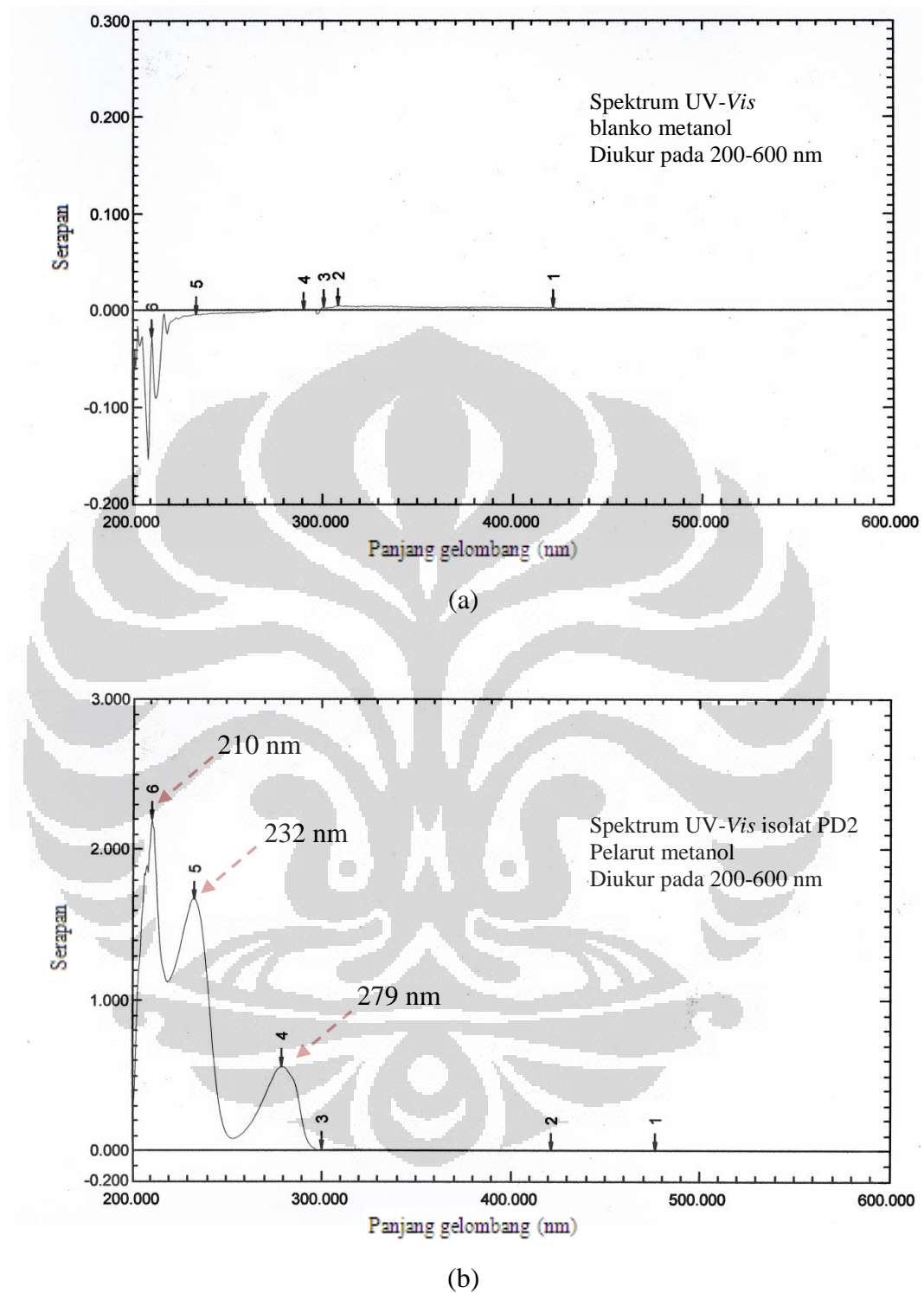
Keterangan : a. Zat Uji dielusi dengan 4:1 (Heksana:etil asetat). Kromatogram diamati secara langsung (1) dan dibawah UV 254 nm (2). Rf: 0,22
 b. Blanko (+) (Boldin) dielusi dengan Metanol 100%. Kromatogram diamati secara langsung (1) dan dibawah UV 254 nm (2). Rf: 0,43

Gambar 4.11 Uji alkaloid pada isolat PD2 dengan pereaksi semprot Dragendorff melalui metode KLT



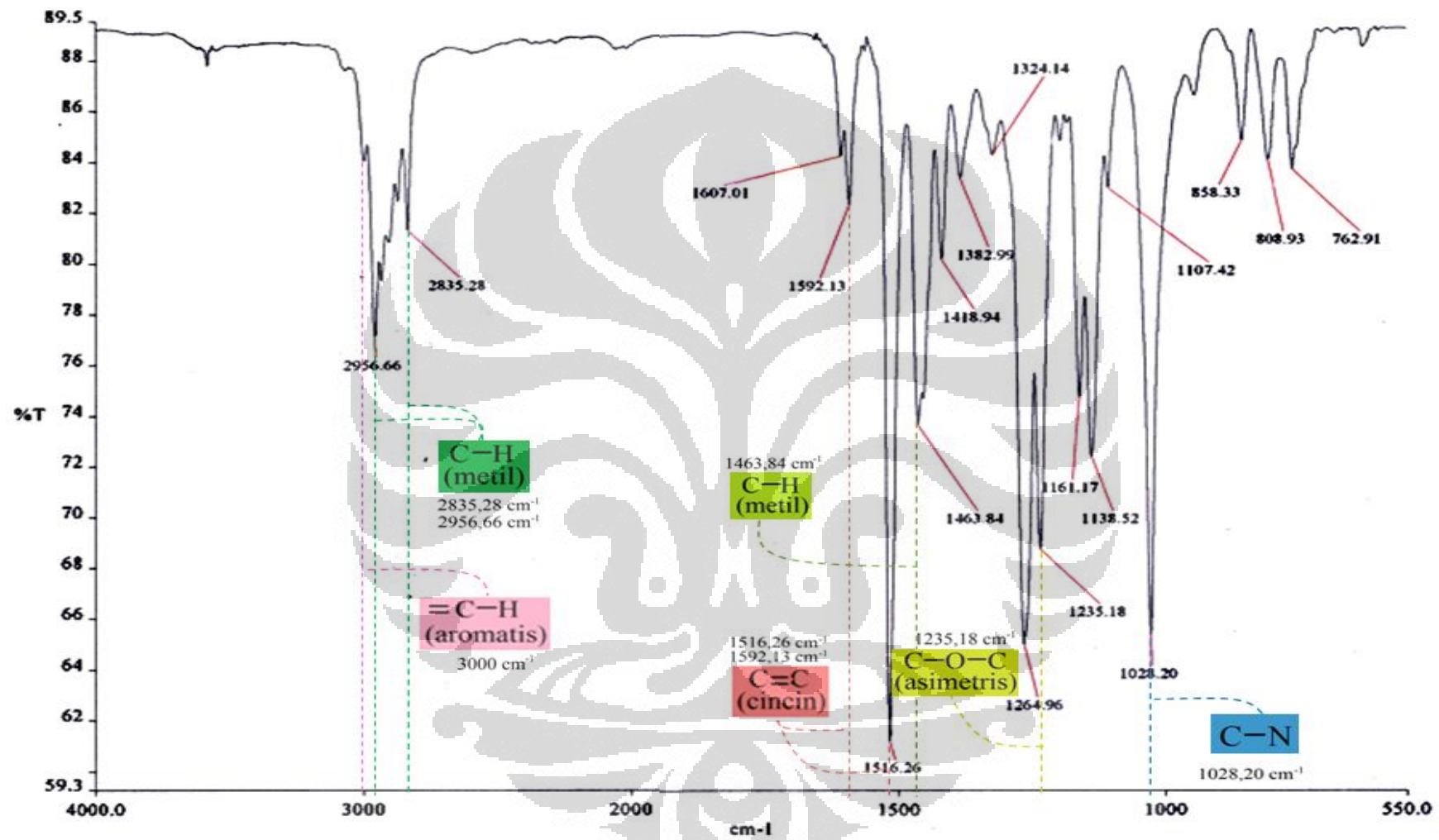
Keterangan : a. Elusi pertama dengan fase gerak 95:5 (diklorometan-metanol). Rf: 0,18.
 b. Elusi kedua dengan fase gerak 95:5 (etil asetat-heksana). Rf: 0,70.

Gambar 4.12 Hasil KLT 2D pada isolat PD2

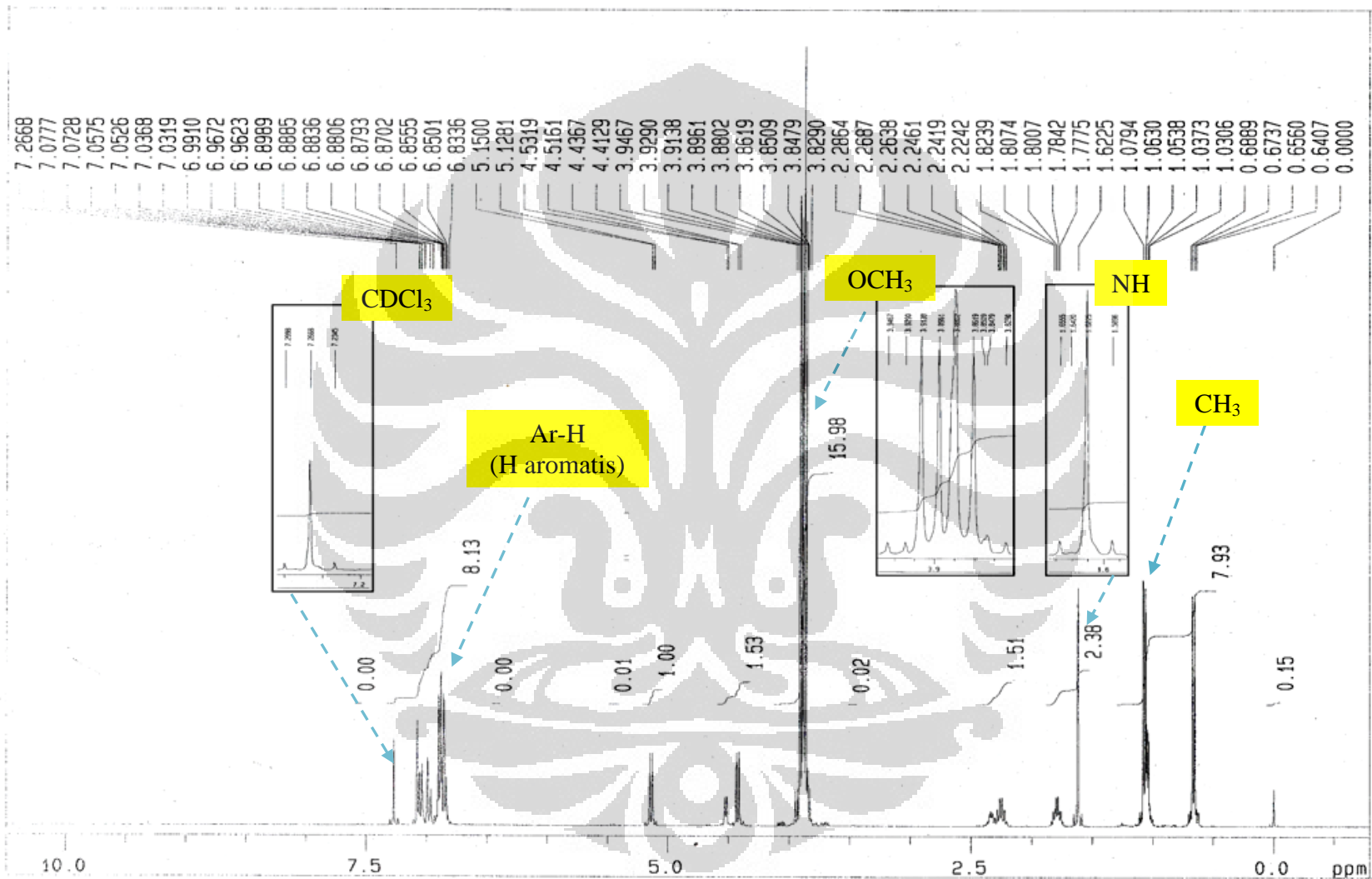


- Keterangan :
- Spektrum UV-Vis blanko metanol diukur pada 200-600 nm.
 - Spektrum UV-Vis isolat PD2 dalam pelarut metanol diukur pada 200-600 nm.
 λ_{maks} 210, 232, dan 279 nm.

Gambar 4.13 Spektrum UV-Vis blanko metanol dan isolat PD2 dalam pelarut metanol

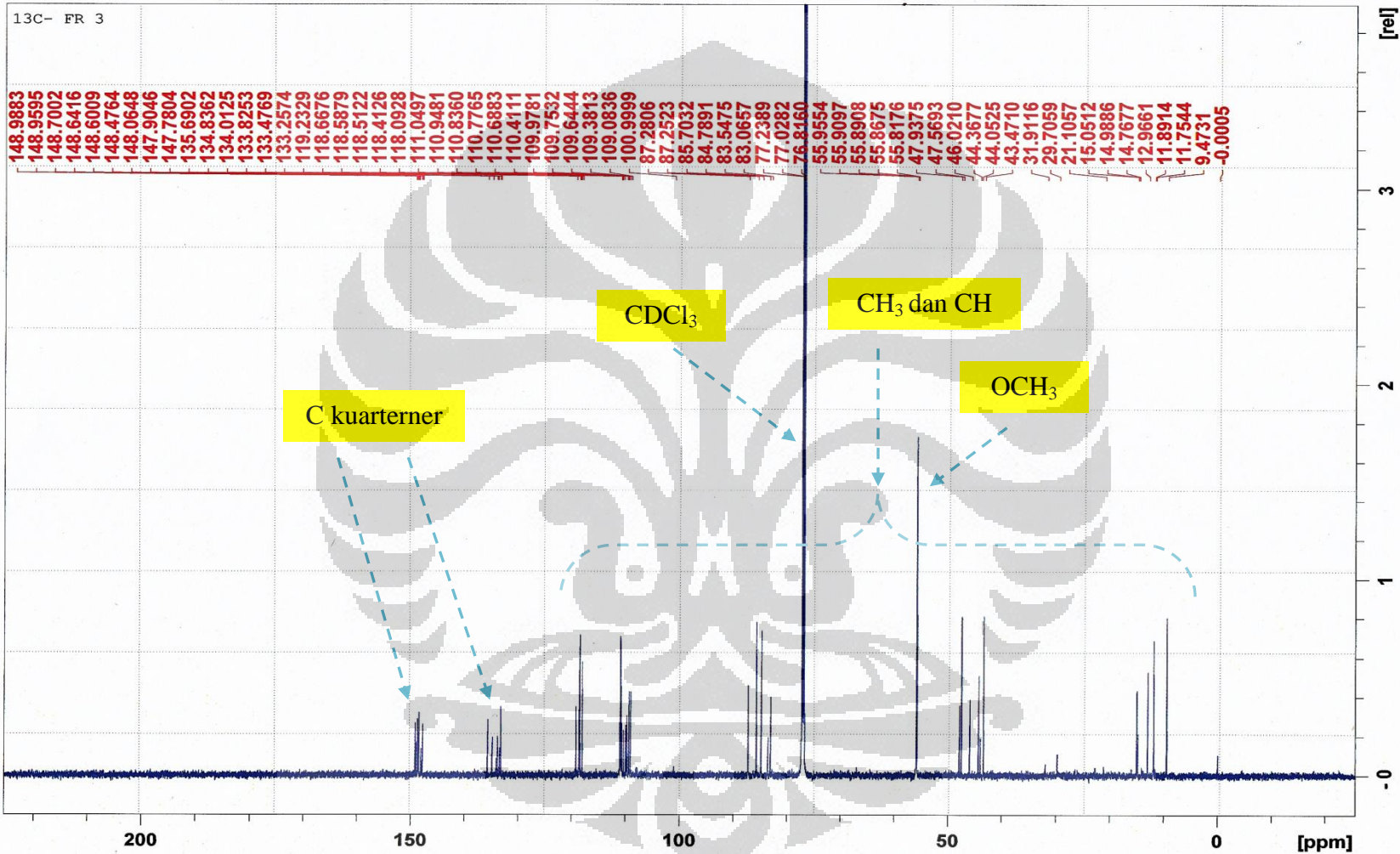


Gambar 4.14 Spektrum infra merah isolat PD2 dalam pelarut metanol

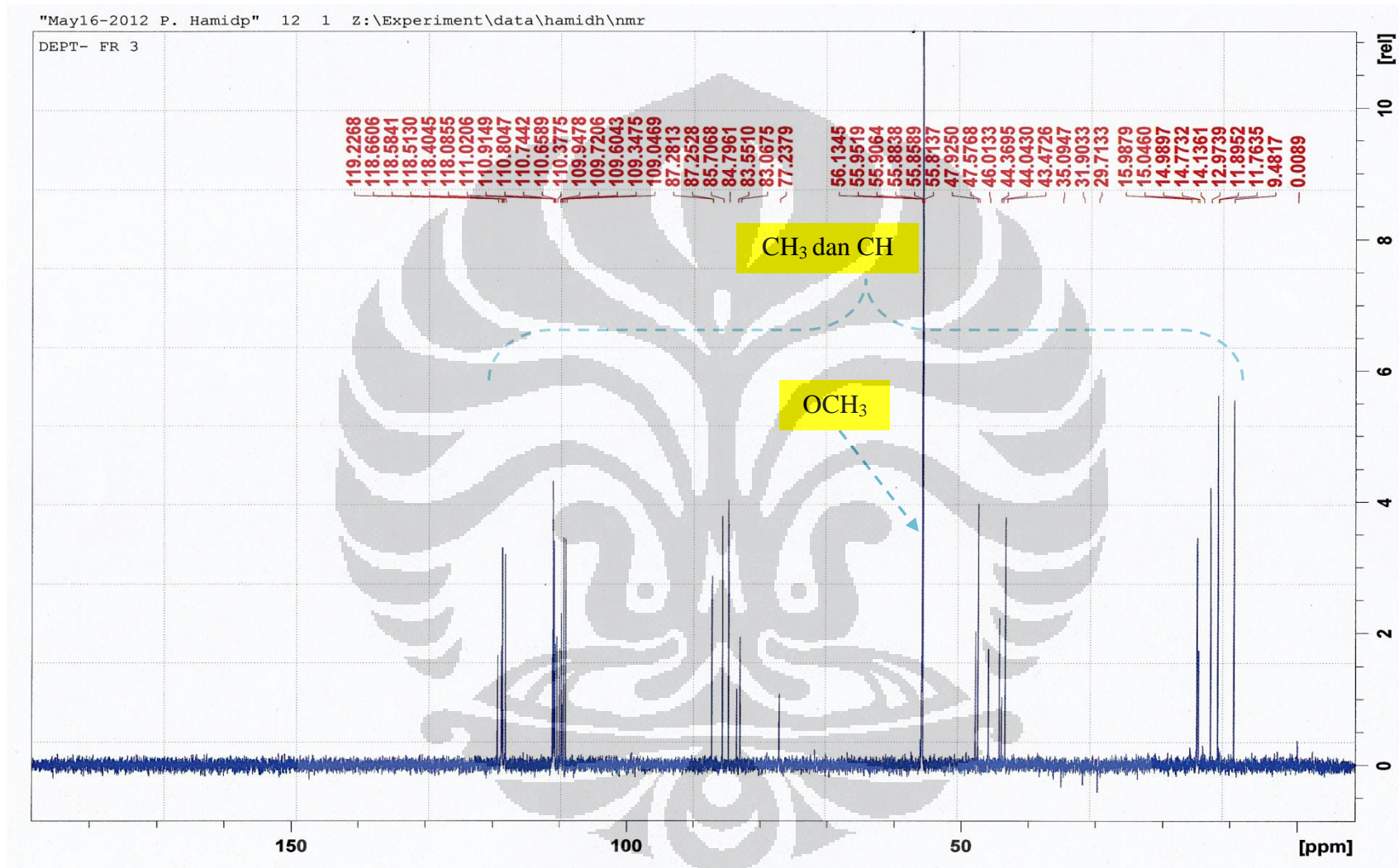


Gambar 4.15 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ isolat PD2 diukur pada 400 MHz dengan pelarut CDCl_3

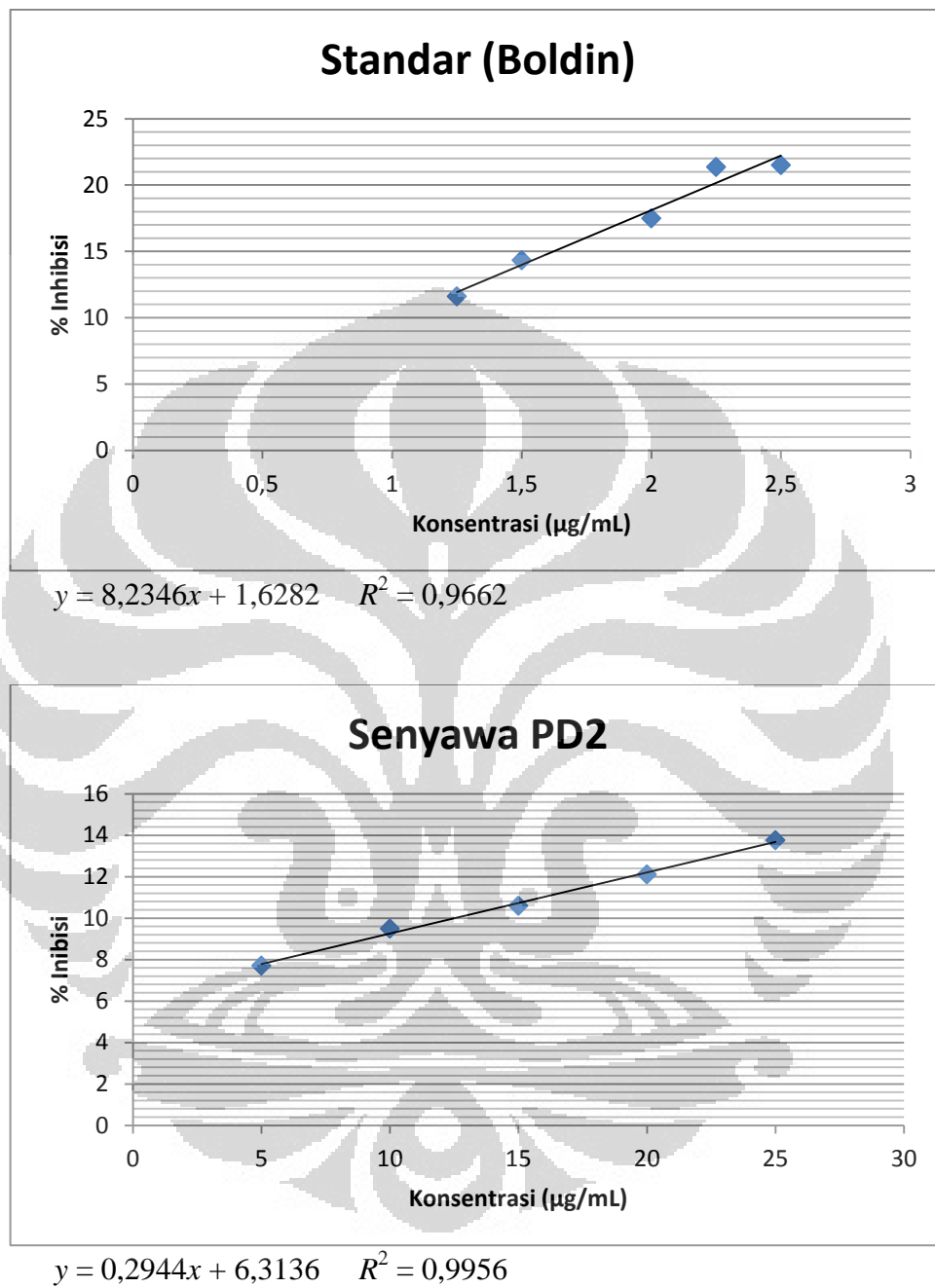
"May16-2012 P. Hamidp" 11 1 Z:\Experiment\data\hamidh\nmr



Gambar 4.16 Spektrum ¹³C-NMR isolat PD2 diukur pada 600 MHz dengan pelarut CDCl₃



Gambar 4.17 Data DEPT isolat PD2 diukur pada 600 MHz dengan pelarut CDCl₃

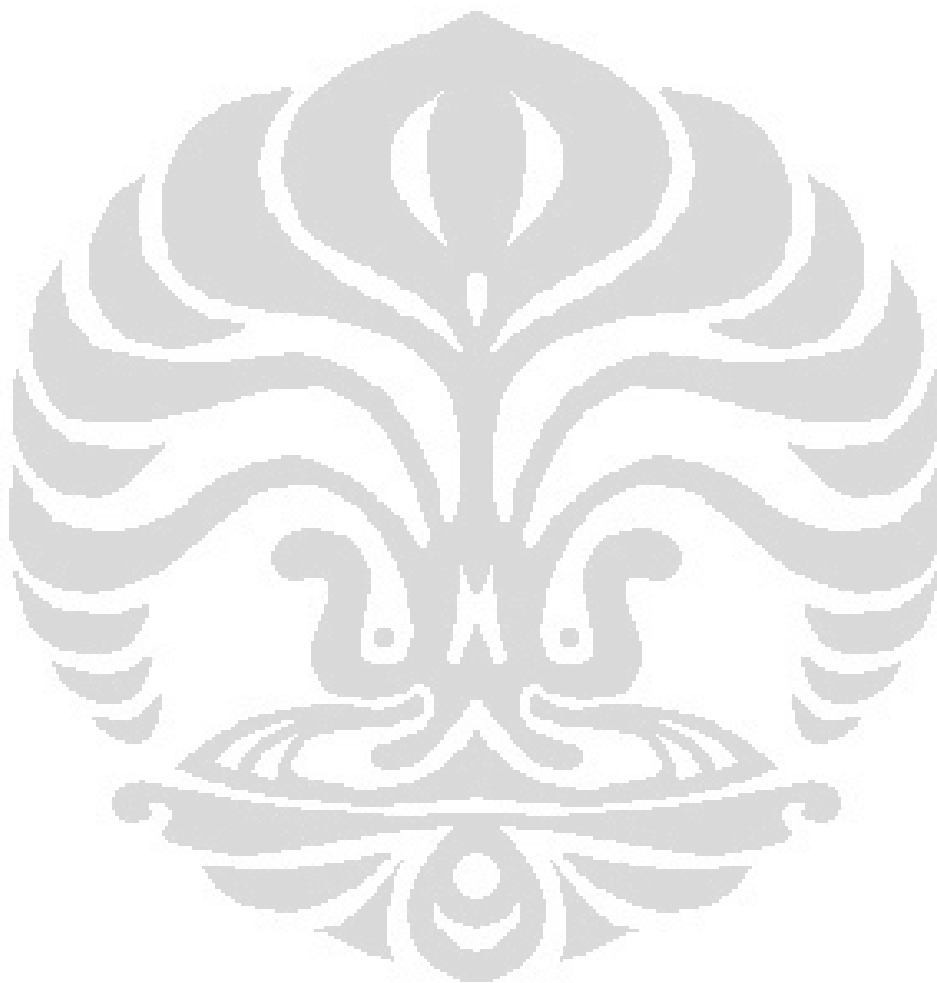


Gambar 4.19 Kurva regresi uji aktivitas antioksidan standar (boldin) dan isolat PD2 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.



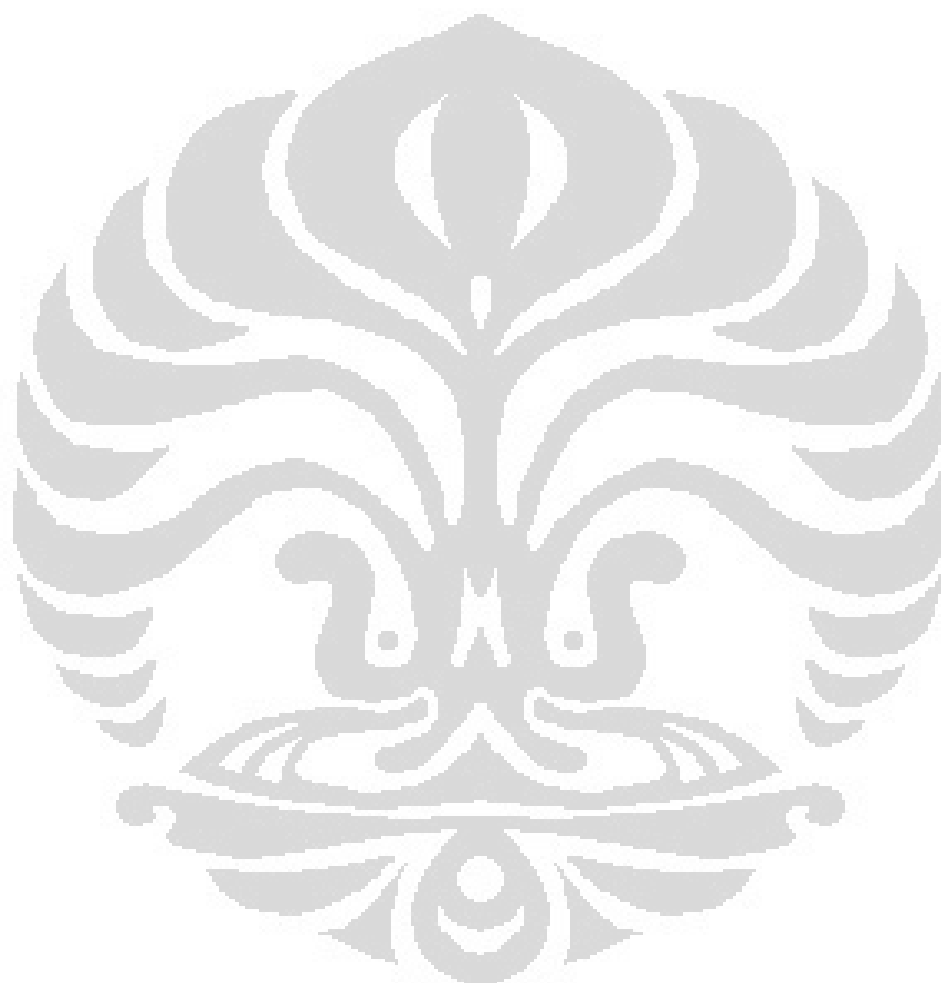
Tabel 4.1.: Hasil penapisan fitokimia alkaloid simplisia *Phoebe declinata* Nees

Sampel	Pereaksi Alkaloid		
	Bouchardat	Mayer	Dragendorff
Simplisia	Endapan hitam +	Endapan putih +	Endapan coklat +
Boldin (standar)	Endapan hitam +	Endapan kuning +	Endapan coklat +



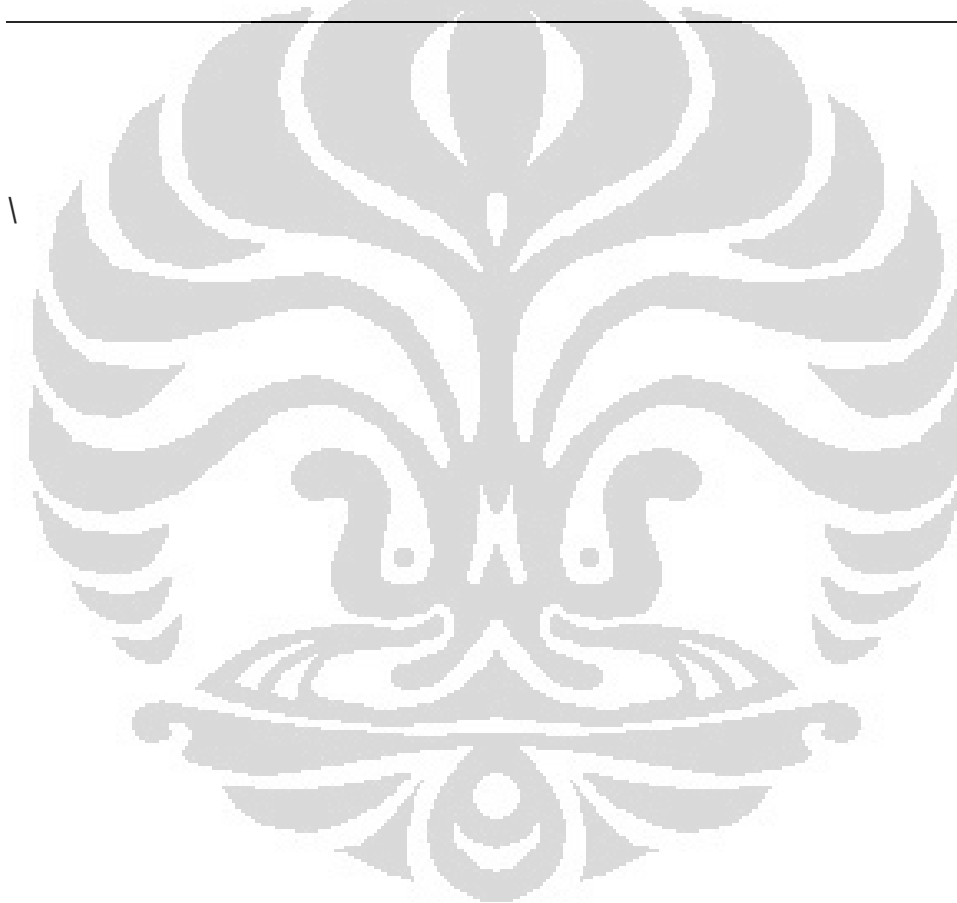
Tabel 4.2.: Data rendemen ekstrak kulit batang *Phoebe declinata* Nees.

No.	Ekstrak	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen Ekstrak (%)
1.	Ekstrak heksana	14,8	1,04
2.	Ekstrak Diklorometan	24,0	1,68



Tabel 4.3. :Hasil penapisan fitokimia alkaloid ekstrak diklorometan

Sampel	Pereaksi Alkaloid			Dragendorff
	Bouchardat	Mayer	Dragendorff	<i>Spray</i>
Ekstrak diklorometan	Endapan hitam +	Endapan putih +	Endapan coklat +	Bercak jingga +
Boldin (standar)	Endapan hitam +	Endapan kuning +	Endapan coklat +	Bercak jingga +



Tabel 4.4.: Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi (A-5, A-6, A-8, A-9) dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.

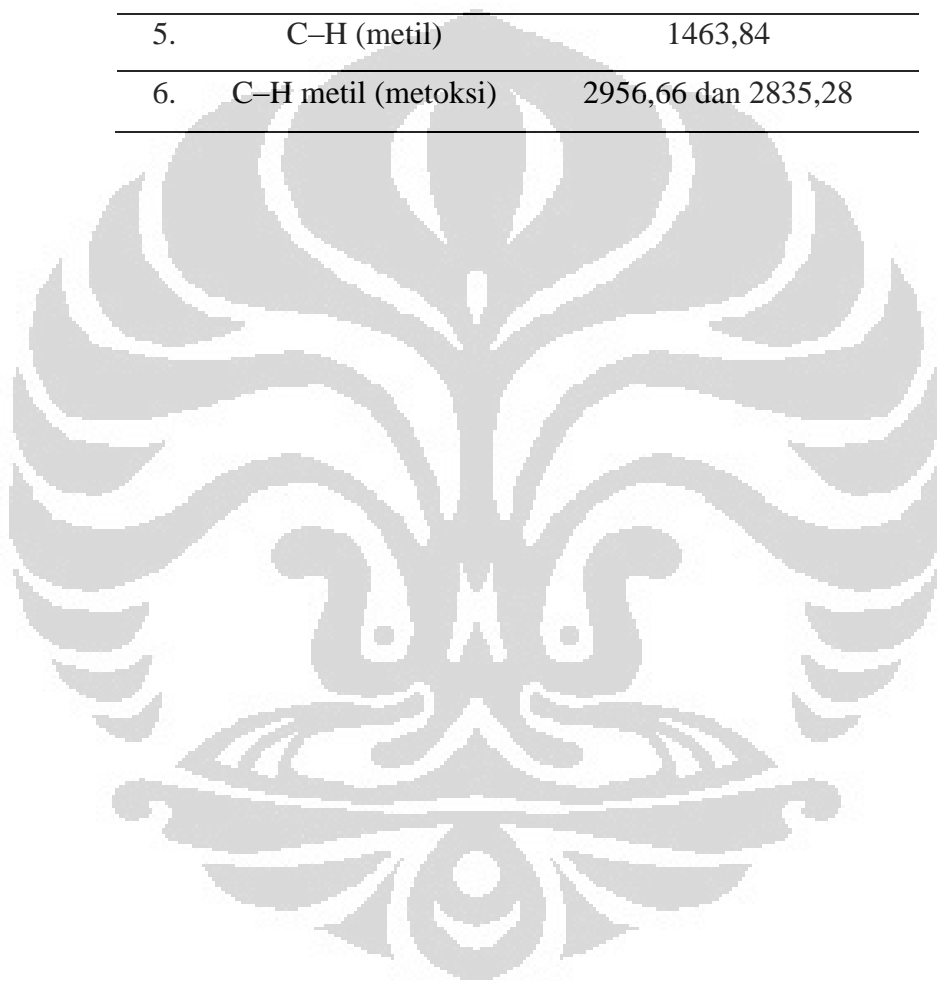
Serapan Blanko	Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Serapan Sampel Uji	% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
0,697	Boldin	5	0,616	11,62123	$y = 8,2346x + 1,6282$ $R^2 = 0,9662$	5,8
		6	0,597	14,3472		
		8	0,576	17,50359		
		9	0,548	21,37733		
		10	0,547	21,5208		
0,657	A-5	20	0,652	0,761035	$y = 0,1948x - 0,0257$ $R^2 = 0,9831$	256,8
		40	0,644	1,978691		
		60	0,636	3,220079		
		80	0,632	3,805175		
		100	0,626	4,718417		
0,579	A-6	20	0,564	2,590674	$y = 0,7664x - 2,8209$ $R^2 = 0,9281$	68,9
		40	0,554	4,340979		
		60	0,546	6,908463		
		80	0,514	11,22625		
		100	0,473	18,30743		
0,579	A-8	20	0,574	0,863558	$y = 0,5613x - 1,7703$ $R^2 = 0,9859$	92,2
		40	0,559	3,454231		
		60	0,545	7,484168		
		80	0,533	9,643063		
		100	0,482	11,80196		
0,671	A-9	20	0,669	0,149254	$y = 0,2836x - 1,3433$ $R^2 = 0,9153$	180,8
		40	0,656	2,089552		
		60	0,652	2,686567		
		80	0,647	3,432836		
		100	0,626	6,567164		

Tabel 4.5.: Hasil uji aktivitas antioksidan isolat PD2 dengan metode DPPH menggunakan pelarut metanol pada λ 516 nm.

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Serapan		% Inhibisi	Persamaan linier	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		Blanko	Sampel Uji			
Boldin	5		0,616	11,62123	$y = 8,2346x + 1,6282$ $R^2 = 0,9662$	5,8
	6		0,597	14,3472		
	8	0,697	0,576	17,50359		
	9		0,548	21,37733		
	10		0,547	21,5208		
PD2	20		0,671	7,702889	$y = 0,2944x - 6,3139$ $R^2 = 0,9956$	148,4
	40		0,658	9,491059		
	60	0,674	0,651	10,59147		
	80		0,639	12,10454		
	100		0,627	13,75516		

Tabel 4.6.: Bilangan gelombang spektrum infra merah isolat PD2 dengan menggunakan pelarut CDCl_3

No.	Gugus Fungsi	Bilangan gelombang (cm^{-1})
1.	$=\text{C}-\text{H}$ (aromatis)	3000
2.	$\text{C}=\text{C}$ (cincin)	1592,13 dan 1516,26
3.	$\text{C}-\text{N}$	1028,20
4.	$-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ (asimetris)	1235,18
5.	$\text{C}-\text{H}$ (metil)	1463,84
6.	$\text{C}-\text{H}$ metil (metoksi)	2956,66 dan 2835,28



Tabel 4.7.: Pergeseran kimia 1D NMR (^1H dan ^{13}C) Isolat PD2 diukur pada ^1H -NMR 400 MHz dan ^{13}C -NMR 600 MHz dengan menggunakan pelarut CDCl_3

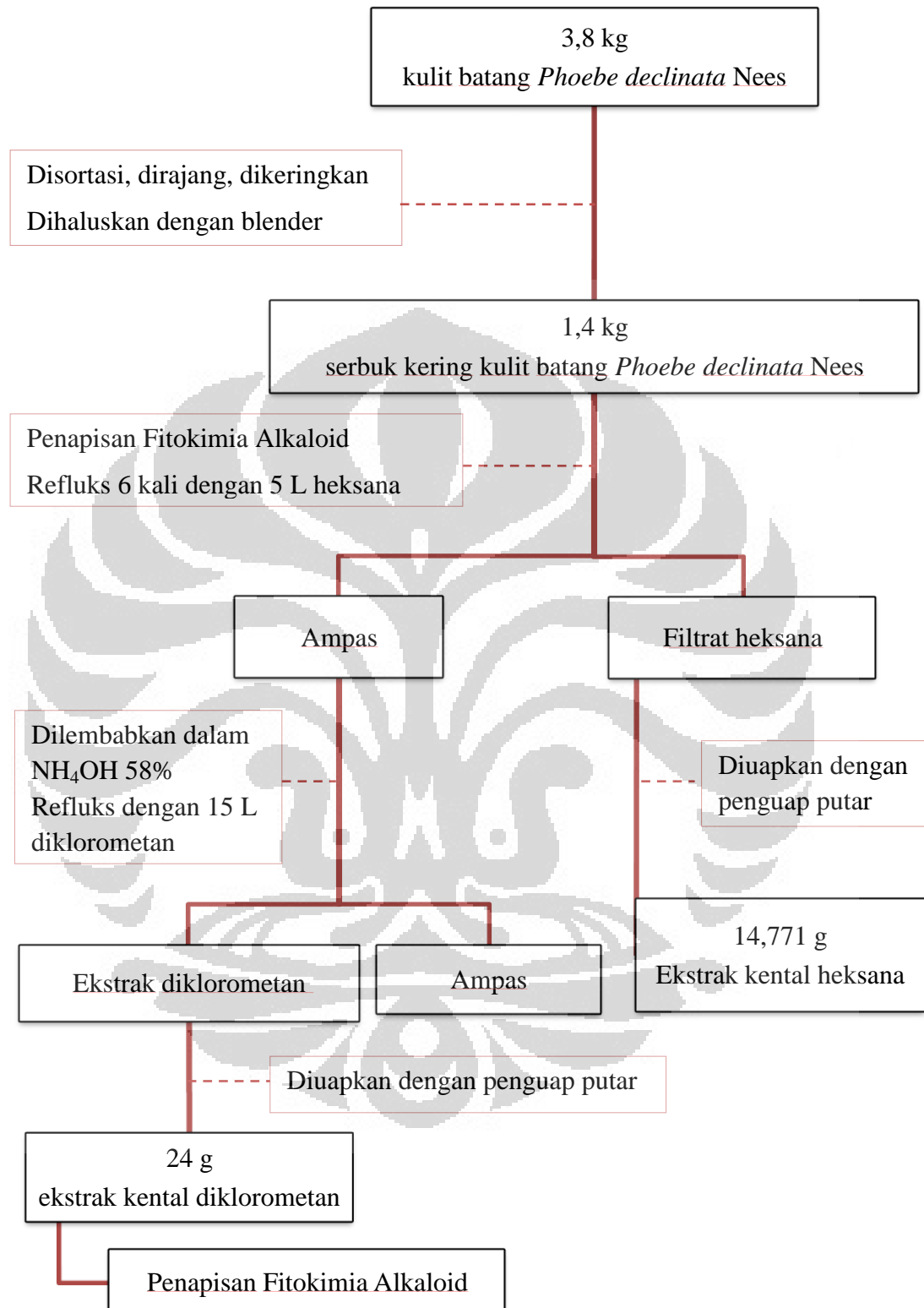
No.	Gugus Fungsi	Pergeseran Kimia (δ) (ppm)	
		Proton	Karbon
1.	NH	1,62bs	-
2.	C	-	133,26-148,99
3.	CH	6,88-0,07	9,48-119,22
4.	CH_3	1,03-1,80	
5.	$\text{CH}_3 (\text{OCH}_3)$	3,86s	55,86
		3,88s	55,88
		3,89s	55,90
		3,90s	55,95

Keterangan : (s) singlet; (b) *broad*; (d) doublet

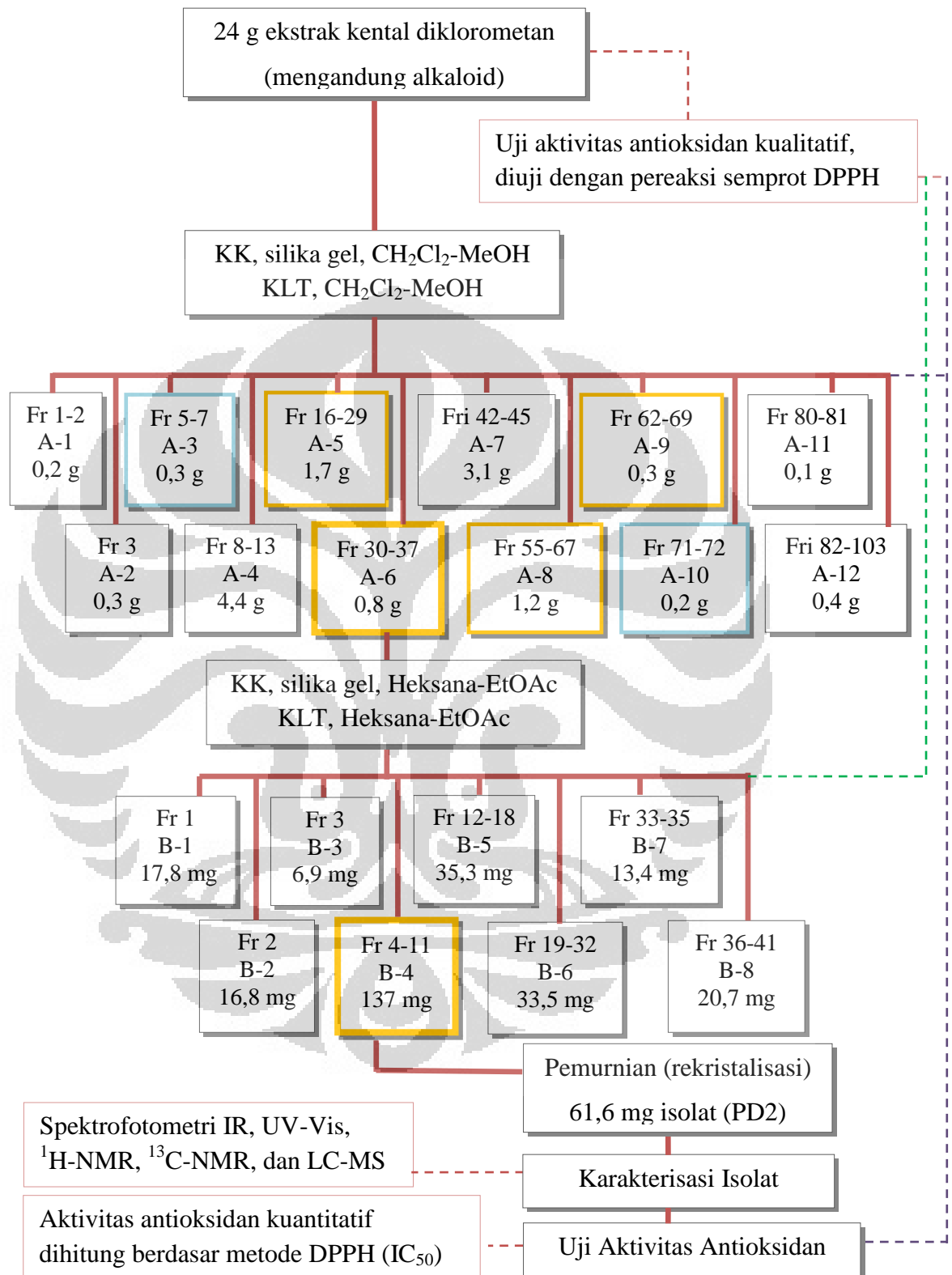


LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Ekstraksi

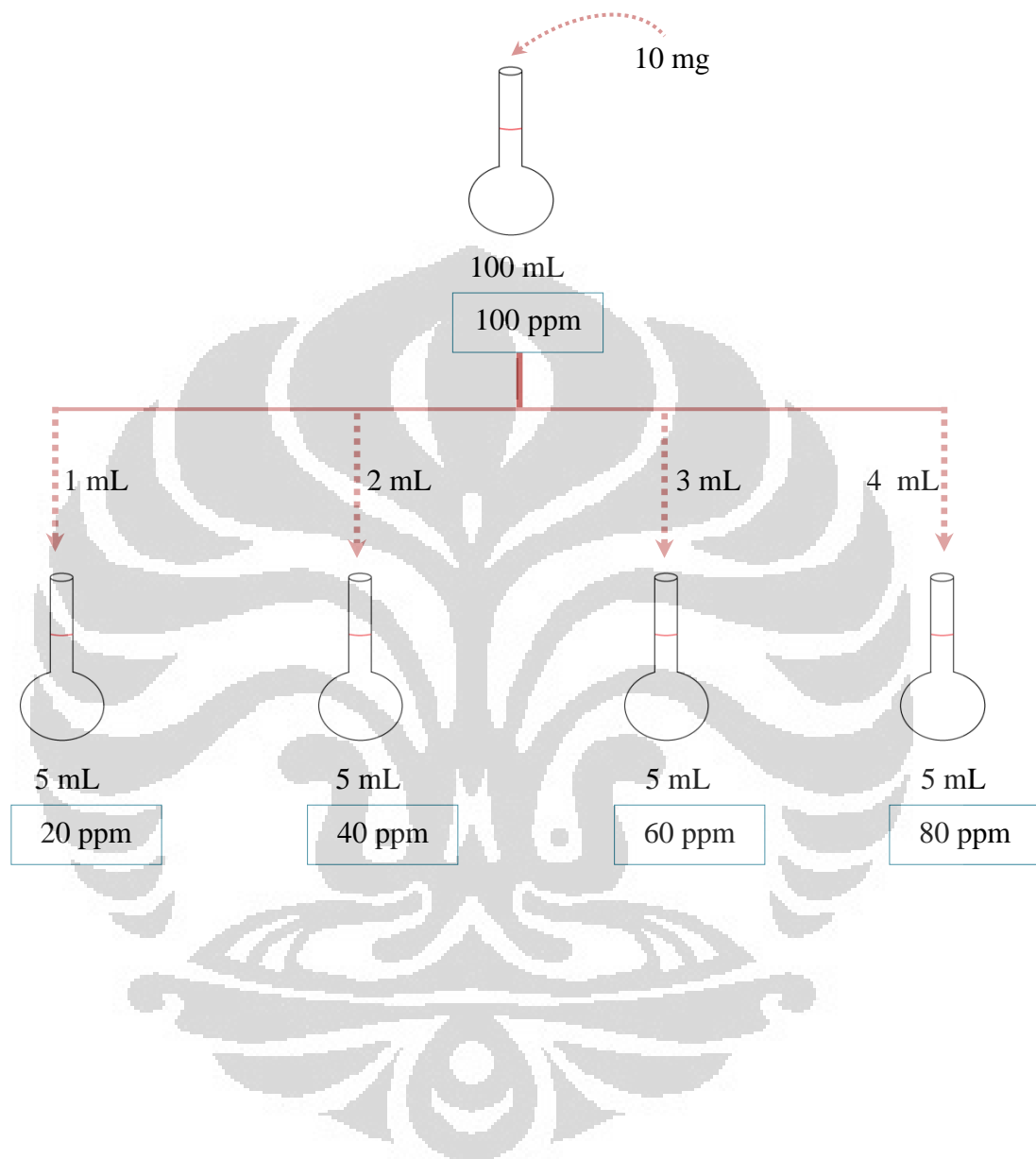


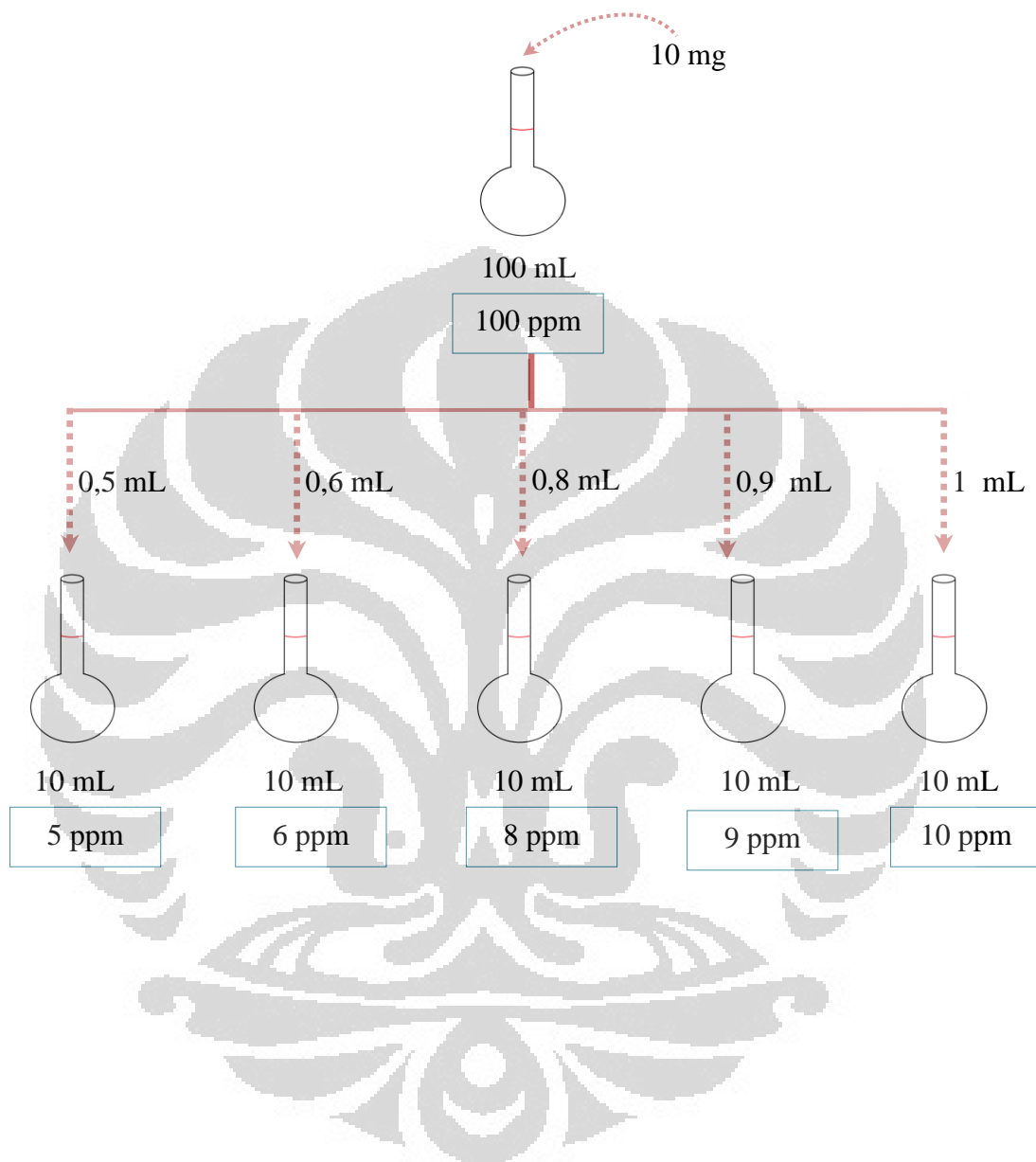
Lampiran 2. Skema Fraksinasi dan Uji Aktivitas Antioksidan



Keterangan :

- mengandung alkaloid dan memiliki aktivitas antioksidan
- mengandung alkaloid dan tidak memiliki aktivitas antioksidan

Lampiran 3. Skema Pembuatan Konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 

Lampiran 4. Skema Pembuatan Konsentrasi 5, 6, 8, 9, dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 

Lampiran 5. Surat Determinasi Kulit Batang *Phoebe declinata* Nees

	<p>LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (Indonesian Institute of Sciences) PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR (Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens) Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. BOX 309 Bogor 16003, Indonesia Telepon (0251) 8322187 - 8321657 - 8322220 - 8311362, 8352519, Fax. 62 (251) 8322187, 8313985 e-mail : kriblipi@indosat.net.id</p>	
	<p>Bogor, 15 Juni 2012</p>	
<p>No. : 134/IPH.3.02/KS/VI/2012 Lampiran : - Hal : Keterangan determinasi</p>	<p>Kepada Yth.: Roshamur Cahyan Forestrania NPM. 0806328032 Fakultas Farmasi Universitas Indonesia Depok</p>	
<p>Dengan hormat,</p> <p>Dengan ini kami sampaikan bahwa spesimen tumbuhan yang diambil dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, LIPI adalah dari jenis kulit batang <i>Phoebe declinata</i> (Blume) Nees, yang merupakan anggota Suku Lauraceae.</p> <p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.</p>		
<p>a.n. KEPALA Kepala Bidang Konservasi Ex-situ</p> <p>Dr. Joko Ridho Witono NIP. 197010091994031004</p>		

Universitas Indonesia

Lampiran 6. Analisis Sertifikat Boldin

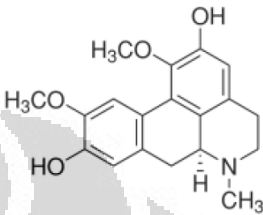
SIGMA-ALDRICH® sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sial.com
 Outside USA: eurtechserv@sial.com

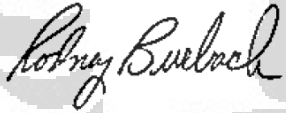
Certificate of Analysis

Product Name: Boldine - analytical standard

Product Number: B3916
 Lot Number: SLBB0164V
 Brand: FLUKA
 CAS Number: 476-70-0
 MDL Number: MFCD00135040
 Formula: C₁₉H₂₁NO₄
 Formula Weight: 327.37 g/mol
 Quality Release Date: 29 NOV 2011



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Off White to Light Yellow and Faint Beige to Light Beige and Faint Brown to Light Brown	Faint Brown
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Faint Yellow to Yellow and Faint Brown-Yellow to Brown-Yellow and Faint Brown to Brown	Light Brown-Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
50 mg/mL, EtOH		
Solvent Content (by GC)	≤ 1 %	0 %
Isopropanol		
% Purity (TLC)	≥ 98	99



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1 Page 1 of 1

Lampiran 7. Analisis Sertifikat DPPH

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		