UNIVERSITAS INDONESIA

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA ALKALOID DARI EKSTRAK DAUN *Phoebe declinata* Nees

SKRIPSI

RYAN ADI CANDRA
0806328051

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

UNIVERSITAS INDONESIA

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA ALKALOID DARI EKSTRAK DAUN *Phoebe declinata* Nees

SKRIPSI
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi

RYAN ADI CANDRA
0806328051

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

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

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

Ryan Adi Candra

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

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 : Ryan Adi Candra

NPM : 0806328051

Tanda Tangan :

Tanggal : 25 Juni 2012

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh	:
Nama	: Ryan Adi Candra
NPM	: 0806328051
Program Studi	: Farmasi
Judul Skripsi	: Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid dari Ekstrak Daun *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 I	: Dr. Berna Elya, Apt., M.Si.	(.....)
Pembimbing II	: Dr. Harmita, Apt.	(.....)
Penguji I	: Drs. Hayun, M.Si.	(.....)
Penguji II	: Dr. Abdul Mun'im, M.S.	(.....)

Ditetapkan di	: Depok
Tanggal	: 2 Juli 2012

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Berna Elya, Apt., M. Si. dan Dr. Harmita, Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Dra. Maryati Kurniadi Apt., M.Si. selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
3. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. Si, selaku Ketua Departemen Farmasi dan Kepala Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi FMIPA UI;
4. Prof. Dr. A. Hamid A. Hadi selaku Ketua Laboratorium Fitokimia *Center Natural Product* Universitas Malaya Malaysia;
5. Drs. Hayun, M.Si. selaku Ketua Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Departemen Farmasi FMIPA UI;
6. Dr. Katrin, M.Si. selaku Ketua Laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi FMIPA UI;
7. Prof. Maksum Radji, M. Biomed., Ph.D., Apt. selaku Ketua Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI;
8. Para dosen yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI;
9. Laboran dan penanggung jawab laboratorium Fitokimia serta staf pegawai Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah membantu saya selama penelitian di Departemen Farmasi FMIPA UI;

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

10. Orang tua saya yaitu Supriadi dan Suryaningsih serta adik saya Faizah Ryanita Putri dan Maulidiya Firdausi Putri yang telah memberikan bantuan dukungan materiil dan moral;
11. Nurul Hasanah atas dukungan dan motivasinya selama ini.
12. Meiyani Nurhayati sebagai Saudara di Farmasi.
13. Yogo Suro Priyadi, Ali Muhammad Shodiq, Muhammad Irfan Hasan, Reza Hermawan, Delly Ramadon, Setiawan, Elphina Rolanda Monica Tobing, dan Indah Nur Fitriandiny yang bersama-sama merasakan tangis sedih dan canda tawa selama di Farmasi.
14. Teman-teman di laboratorium Fitokimia, Farmasi angkatan 2008 yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini; dan
15. 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 pengetahuan di masa yang akan datang.

Penulis

2012

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama	: Ryan Adi Candra
NPM	: 0806328051
Program Studi	: 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 Rigt*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid dari Ekstrak Daun *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

(Ryan Adi Candra)

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

ABSTRAK

Nama : Ryan Adi Candra
Program Studi : Farmasi
Judul : Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid dari Ekstrak Daun *Phoebe declinata* Nees.

Radikal bebas adalah molekul atau senyawa kimia sangat reaktif yang menyebabkan stres oksidatif, yang didefinisikan sebagai ketidakseimbangan antara jumlah oksidan dan antioksidan, berpotensi memicu kanker. Senyawa alkaloid dari *Phoebe* sp. diketahui sebagai antioksidan yang potensial dan sebagai agen sitoprotektif. Oleh karena itu, penelitian kali ini hendak dilakukan isolasi dan uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak daun *Phoebe declinata* Nees. Daun *Phoebe declinata* Nees dimaserasi dengan n-heksana, kemudian diekstraksi kembali dengan metode refluks menggunakan diklorometana. Ekstrak diklorometana diisolasi dengan kromatografi kolom, fraksi yang dihasilkan dimurnikan dengan metode rekristalisasi dan KLT preparatif. Isolat diidentifikasi dengan penyemprot Dragendorff dan diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Dari penelitian ini diperoleh 26,9 mg kristal yang positif terhadap reaksi alkaloid. Nilai IC_{50} dari kristal tersebut adalah 147,62 μg/ml.

Kata Kunci : alkaloid, antioksidan, DPPH, isolasi, *Pheobe declinata* Nees.
xiv + 62 halaman : 12 gambar; 7 tabel; 5 lampiran
Daftar Acuan : 36 (1956-2012)

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

ABSTRACT

Name : Ryan Adi Candra
Study Program : Pharmacy
Title : Isolation and Antioxidant Assay of Alkaloid Compounds from *Phoebe declinata* Nees Leaves Extract.

Free radicals are highly reactive molecules or chemical substances that cause oxidative stress, which is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants, potentially leading to cancer. Alkaloids from *Phoebe* sp. is known as a potential antioxidant and cyto-protective agent. Therefore, at this research the leaves extract of *Phoebe declinata* Nees was isolated and tested its antioxidant activity. Leaves of *Phoebe declinata* Nees were macerated by n-hexane and then re-extracted by reflux method using dichloromethane. Dichloromethane extract was isolated by column chromatography and then its fraction was purified by recrystallization and TLC-preparative method. The isolate was identified by Dragendorff sprayer and its antioxidant activity was tested by DPPH method. From this research, 26.9 mg crystal was obtained and it was positive of alkaloid reaction. IC_{50} of this crystal was 147.62 μg/ml.

Key Words : alkaloid, antioxidant, DPPH, isolation, *Phoebe declinata* Nees.
xiv + 62 pages : 12 pictures; 7 tables; 5 appendices
Bibliography : 36 (1956-2012)

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL ..... **i**
HALAMAN JUDUL ..... **ii**
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME ..... **iii**
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS ..... **iv**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **v**
KATA PENGANTAR ..... **vi**
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH ..... **viii**
ABSTRAK ..... **ix**
ABSTACT ..... **x**
DAFTAR ISI ..... **xi**
DAFTAR GAMBAR ..... **xiii**
DAFTAR TABEL ..... **xiv**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **xv**

BAB 1. PENDAHULUAN **1**
1.1. Latar Belakang 1
1.2. Tujuan 3

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA **4**
2.1. *Phoebe declinata* Nees 4
2.2. Simplisia 5
2.3. Ekstraksi dan Ekstrak 5
2.4. Senyawa Alkaloid 8
2.5. Isolasi 8
2.6. Teknik Rekistalisasi 13
2.7. Uji Kemurnian 13
2.8. Antioksidan 15
2.9. Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak 18
2.10. Spektrometri Inframerah 19
2.11. Spektroskopi Massa 19

BAB 3. METODE PENELITIAN **21**
3.1. Waktu dan Tempat 21
3.2. Alat 21
3.3. Bahan 21
3.4. Cara Kerja 22

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN **33**
4.1. Penyiapan Simplisia 33
4.2. Identifikasi Awal Senyawa Alkaloid 33
4.3. Ekstraksi 34
4.4. Isolasi Ekstrak Diklorometana 36
4.5. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Positif Alkaloid 37
4.6. Pemurnian Fraksi Teraktif 41
4.7. Uji Kemurnian Isolat 42
4.8. Uji Aktivitas Antioksidan Kristal Fraksi C 43

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

4.9. Identifikasi Isolat Alkaloid Menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak, Spektrometer Inframerah, dan Kromatografi Cair-Spektrometer Massa 44

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN 47
5.1. Kesimpulan 47
5.2. Saran 47

DAFTAR ACUAN 48

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Daun *Phoebe declinata* Nees 5
Gambar 4.1. Perubahan warna filtrat hasil maserasi 51
Gambar 4.2. Perubahan warna filtrat hasil refluks 52
Gambar 4.3. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas 37
Gambar 4.4. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif 37
Gambar 4.5. Spektrum DPPH pada panjang gelombang maksimum 53
Gambar 4.6. Hasil pemisahan fraksi VII dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20 menggunakan kromatografi lapis tipis 54
Gambar 4.7. Hasil pemisahan fraksi C dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20 menggunakan kromatografi lapis tipis 55
Gambar 4.8. Hasil uji kemurnian dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi 58
Gambar 4.9. Spektrum ultraviolet-tampak kristal fraksi C 44
Gambar 4.10. Spektrum serapan inframerah kristal fraksi C dalam pelarut $CHCl_3$ 57
Gambar 4.11. Spektrum massa kristal fraksi C dalam pelarut metanol 46

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil uji identiikasi awal senyawa alkaloid 34
Tabel 4.2. Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak tumbuhan uji 35
Tabel 4.3. Hasil penimbangan masing-masing fraksi dan identifikasi senyawa alkaloid 36
Tabel 4.4. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif seluruh fraksi 38
Tabel 4.5. Hasil uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif boldin dan fraksi III, IV, V, VI, VII 40
Tabel 4.6. Nilai IC_{50} dari kristal fraksi C 43
Tabel 4.7. Identifikasi puncak serapan spektrum inframerah kristal fraksi C 45

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja.....58
Lampiran 2. Surat determinasi tumbuhan 59
Lampiran 3. Kromatogram kristal fraksi C dalam pelarut metanol menggunakan alat kromatografi cair-spektrometer massa, kolom C-18 2,5 μm (2,1x50 mm) kecepatan alir 0,5 ml/menit.....60
Lampiran 4. Sertifikat analisis DPPH 61
Lampiran 5. Sertifikat analisis boldin 62

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah molekul atau senyawa kimia sangat reaktif, mengandung elektron tidak berpasangan yang dapat menyebabkan stres oksidatif. Menurut Sies (1997), stres oksidatif adalah ketidakseimbangan antara jumlah oksidan dan antioksidan yang berpotensi menyebabkan kerusakan lipid, protein, enzim, karbohidrat dan DNA dalam sel dan jaringan (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, dan Kumar, 2006). Kerusakan tersebut selanjutnya akan memicu terjadinya kanker, kelainan neurogeneratif, penyakit jantung, diabetes, dan kelainan autoimun (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, dan Kumar, 2006).

World Health Organization (2010) menyebutkan bahwa kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian global dengan angka mencapai 13% (7,4 juta) di dunia dari semua kematian setiap tahunnya. Diperkirakan angka kematian akibat kanker akan meningkat secara signifikan pada tahun-tahun mendatang dan akan mencapai sekitar 13 juta kematian per tahun di seluruh dunia pada tahun 2030. Kecenderungan ini bahkan lebih mencolok di Asia dimana jumlah kematian per tahun 2002 sebesar 3,5 juta dan diperkirakan akan meningkat menjadi 8,1 juta pada tahun 2020. Pada tahun 2008 tercatat 700.000 kasus kanker baru di seluruh negara-negara anggota ASEAN (Aditama, 2011). Upaya pencegahan atau penanggulangan sangatlah diperlukan untuk mengurangi hal tersebut. Salah satunya upaya pencegahan yang dapat kita lakukan adalah pengonsumsian makanan atau minuman yang mengandung senyawa antioksidan.

Tubuh manusia memiliki sistem pertahanan terhadap radikal bebas. Sistem pertahanan tersebut dilakukan oleh senyawa antioksidan enzimatik yang dihasilkan oleh tubuh manusia. Adapun mekanisme antioksidan dalam tubuh manusia dilakukan oleh enzim penangkap radikal bebas seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase. Dalam kondisi sakit, pertahanan terhadap radikal bebas menjadi lemah dan terjadi peningkatan jumlah oksidan. Dalam kondisi tersebut, diperlukan asupan antioksidan

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

dari luar tubuh untuk mengatasi konsekuensi dari stres oksidatif (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, dan Kumar, 2006). Asupan antioksidan dari luar tubuh tersebut dapat berasal dari bahan alam atau sintetis.

Saat ini, masyarakat memiliki kecenderungan untuk mengonsumsi antioksidan yang berasal dari bahan alam dibandingkan bahan sintetik. Kecenderungan tersebut didasarkan adanya anggapan bahwa antioksidan yang berasal dari bahan alam memiliki efek samping rendah. Umumnya, bahan alam yang digunakan berasal dari tumbuhan. Senyawa dari tumbuhan yang memiliki aktivitas antioksidan umumnya adalah senyawa flavonoid. Namun, Galati dan O'Brien (2004) menjelaskan bahwa flavonoid memungkinkan risiko terjadinya mutagenesis, memiliki bioavailabilitas yang rendah jika diberikan secara per oral, farmakokinetiknya kurang baik, dan belum diketahui toksisitasnya (O'Brien, Carrasco-Pozo, dan Speisky, 2006). Alternatif senyawa selain flavonoid yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa alkaloid. Boldin, salah satu senyawa alkaloid, telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang poten dan merupakan agen sitoprotektif (O'Brien, Carrasco-Pozo, dan Speisky, 2006). Senyawa ini berasal dari tumbuhan *Peomus boldus* Molina dan *Phoebe grandis.* Senyawa alkaloid lain yang berpotensi memiliki aktivitas antioksidan adalah amida cinnamoil dan amida hidroksicinnamoil dari glaucin (Spasova, Philipov, Nikolaeva-Glomb, Galabov, dan Milkova, 2008). Senyawa 9-metoksiisomoschatolin dan lisikamin, merupakan alkaloid oksoaporfin, juga memiliki aktivitas antioksidan (Costa, et al., 2010). Dari beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa alkaloid berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

Tumbuhan jenis *Phoebe* sp. dilaporkan mengandung senyawa alkaloid. *Phoebe lancolata* mengandung senyawa (1) *N-6/ C-7 oxalyl-fused 2,9-dihidroxy-1,10-dimethoxy 6a,7-didehydroaporphine* dan senyawa (2) *N-6/ C-7 oxalyl-fused 1,2,9,10-tetramethoxy 6a,7-didehydroaporphine* yang merupakan senyawa alkaloid (Semwal, Rawat, dan Singh, 2008). *Phoebe grandis* mengandung senyawa alkaloid, yaitu grandin A dan 8,9-dihidrolinearisin (Mukhtar, Aziz, Thomas, Hadi, Litaudon, dan Awang, 2009). Di Indonesia juga terdapat tumbuhan Phoebe, salah satunya adalah *Phoebe declinata* Nees. Tumbuhan ini berasal dari

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

pulau Jawa, tetapi belum banyak dilakukan penelitian terhadap tumbuhan tersebut. Oleh karena itu, pada penelitian kali ini, hendak dilakukan isolasi senyawa alkaloid dan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak daun *Phoebe declinata* Nees.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan isolat senyawa alkaloid dari ekstrak daun *Phoebe declinata* Nees.
2. Mengetahui aktivitas antioksidan senyawa alkaloid dari ekstrak daun *Phoebe declinata* Nees.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pheobe declinata* Nees

2.1.1 Klasifikasi

Tumbuhan *Phoebe declinata* Nees secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Core, 2011):

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Laurales
Suku : Lauraceae
Marga : Phoebe
Jenis : *Phoebe declinata* Nees.

2.1.2 Deskripsi

Phoebe declinata Nees adalah tumbuhan yang agak tinggi dan ramping di daerah barat Nusantara. Di Jawa hanya terdapat pada daerah di bawah 650 meter di atas permukaan laut. Dalam bahasa Sunda, nama tumbuhan ini adalah Huru hiris dan Huru leucur (Heyne, 1987). Tumbuhan ini berupa pohon berkayu, dengan tinggi pohon 12-20 m, merupakan tumbuhan meranggas dan berjenis tumbuhan tahunan. Memiliki batang yang berwarna hijau kecoklatan dengan diameter yang lebih kecil dari diameter *Phoebe grandis*. Daunnya berwarna merah ketika masih muda dan berwarna hijau saat sudah tua, berupa daun tunggal dan berbentuk lanset. Memiliki biji dan bunga, tetapi jumlahnya jarang. Bunganya berwarna kuning muda dan tumbuh di ketiak daun. Kayunya baik digunakan untuk bangunan rumah. Tumbuhan ini belum diketahui manfaat tradisionalnya sebagai obat suatu penyakit (Harto, 2012).

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

[sumber: koleksi penulis]

Gambar 2.1. Daun *Phoebe declinata* Nees

2.2 Simplisia

Menurut Materia Medika Indonesia, simplisia adalah bahan alami yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan apapun kecuali dikatakan lain. Macam-macam simplisia antara lain: simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan, atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang keluar secara spontan dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya, atau senyawa nabati lain yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni (Depkes, 2000).

2.3 Ekstraksi dan Ekstrak

Ekstraksi merupakan pemisahan zat berkhasiat yang terkandung dalam jaringan tumbuhan atau hewan dari komponen inaktif atau inert menggunakan pelarut selektif (Handa, 2008). Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes, 1995). Ekstrak yang didapat dari tumbuhan berupa cairan, semi padat atau serbuk yang relatif tidak murni dan digunakan hanya untuk penggunaan oral atau eksternal. Sediaan ekstrak tumbuhan antara lain dekokta, infusa, cairan, tinktura, pil, dan serbuk. Tujuan dari prosedur ekstraksi terstandar adalah untuk mencapai kadar yang dibutuhkan secara terapeutik dan untuk mengurangi material inert dengan menggunakan pelarut

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

selektif. Standardisasi prosedur ekstraksi berpengaruh secara signifikan terhadap kualitas obat herbal yang dibuat. Ekstrak yang telah siap digunakan sebagai agen pengobatan dalam bentuk tinktura atau ekstrak cair, selanjutnya diproses untuk dibuat dalam berbagai sediaan seperti tablet atau kapsul, atau ekstrak tersebut difraksinasi untuk diiisolasi senyawa kimia tunggal yang terkandung di dalamnya.

2.3.1 Metode Umum Ekstraksi Tumbuhan Obat

Proses ekstraksi tumbuhan obat terdiri dari berbagai macam cara, antara lain: maserasi, perkolasi, infus, digesti, dekok, soxhlet, dan refluks.

2.3.1.1 Maserasi (Depkes, 2000 dan Handa, 2008)

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Dalam proses ini, serbuk kasar simplisia ditempatkan dalam wadah tertutup, ditambahkan pelarut, diletakkan pada temperatur kamar selama periode tertentu dengan penggoncangan atau pengocokan berulang kali. Selanjutnya campuran simplisia dan pelarut difiltrasi atau didekantasi.

2.3.1.2 Perkolasi (Depkes, 2000 dan Handa, 2008)

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, dilakukan pada temperatur ruangan, dan menggunakan alat perkolator. Dalam metode ini, simplisia dikemas dan diletakkan pada perkolator. Pelarut dialirkan melewati simplisia yang telah dikemas tersebut sehingga didapat perkolat.

2.3.1.3 Infus

Infus merupakan ekstraksi simplisia dalam air dingin atau panas dengan maserasi dalam waktu singkat. Infus dapat dikatakan sebagai metode modifikasi dari maserasi (Singh, 2008). Definisi lain dari infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air selama waktu tertentu (Depkes, 2000). Adapun langkah umum dari metode ini adalah sebagai berikut: serbuk simplisia ditambahkan air, ditempatkan dalam wadah tertutup, dan dikocok selama 15 menit, selanjutnya ditambahkan air panas dan dikocok kembali selama 30 menit.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

2.3.1.4 Digesti

Digesti merupakan metode maserasi yang menggunakan temperatur hangat selama proses ekstraksinya. Metode ini digunakan untuk simplisia yang tidak boleh diekstraksi pada suhu yang tinggi (Handa, 2008). Dalam buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan terus menerus) pada temperatur 40-50^{o} C (Depkes, 2000).

2.3.1.5 Dekok

Dekok merupakan ekstraksi simplisia dengan cara pemanasan dalam volume air dan waktu tertentu, kemudian didinginkan dan disaring (Handa, 2008). Dalam buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan pada temperatur sampai titik didih air (Depkes, 2000). Metode ini digunakan untuk mengekstraksi zat yang larut air dan stabil dalam pemanasan.

2.3.1.6 Soxhlet/ Ekstraksi Panas Berkesinambungan

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi terus menerus dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Dalam metode ini, simplisia dikemas dalam kantong yang terbuat dari kertas saring dan ditempatkan dalam alat Soxhlet. Kemudian pelarut dipanaskan sampai menguap. Uap dari pelarut tersebut mengalami kondensasi dan mengekstraksi simplisia (Depkes, 2000 dan Handa, 2008).

2.3.1.7 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali (Depkes, 2000).

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

2.4 Senyawa Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen, umumnya berbentuk siklik, serta bereaksi dengan pereaksi alkaloid. Umumnya alkaloid berbentuk kristal padat dan sebagian kecil bersifat cair dan terasa pahit (Harborne, 1987). Fungsi alkaloid pada tanaman adalah sebagai bahan cadangan untuk sintesis protein, sebagai zat untuk melindungi dari serangan hewan, sebagai stimulan atau pengatur seperti hormon dan sebagai produk untuk detoksikasi. (Ikan, 1969).

2.5 Isolasi

Banyak senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan. Salah satu senyawa kimia dalam tumbuhan tersebut diketahui memiliki khasiat yang baik bagi tubuh. Untuk memperoleh salah satu senyawa berkhasiat yang terkandung dalam tumbuhan tersebut diperlukan suatu cara yang disebut isolasi. Metode yang sering digunakan untuk mengisolasi suatu senyawa adalah kromatografi. Kromatografi adalah proses pemisahan yang diperoleh dari distribusi senyawa yang dipisahkan di antara dua fase yaitu, fase diam dan fase gerak. Zat terlarut terdistribusi dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat melewati sistem dibandingkan dalam fase diam (Cazes dan Scott, 2002). Salah satu metode yang digunakan untuk isolasi suatu senyawa yang berasal dari tumbuhan adalah metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom.

2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penjerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya (Harmita, 2006). Dalam buku *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi yang digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari senyawa campuran, analisis kuantitatif dan isolasi skala preparatif (Waksmundzka-Hajnos, Sherma, dan Kowalska, 2008). S.K. Poole, Kiridena, Miller, dan C.F. Poole (1995) menyebutkan bahwa metode ini digunakan untuk menentukan kemurnian senyawa dari suatu tumbuhan (Poole, 2003). Galand, Pothier, dan Viel (2002) menjelaskan

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

bahwa saat ini metode ini banyak digunakan untuk standardisasi bahan alam yang digunakan sebagai pengobatan tradisional (Poole, 2003). Dalam industri kimia, metode ini digunakan untuk menguji kemurnian suatu senyawa kimia. Menurut Abjean (1993) dan Harmita (2006), keuntungan dari penggunaan metode kromatografi lapis tipis, antara lain:

a. Membutuhkan biaya yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan metode pemisahan lainnya (Poole, 2003).
b. Dapat mengidentifikasi banyak sampel dalam waktu yang bersamaan (Poole, 2003).
c. Waktu yang diperlukan untuk analisis cukup singkat, yaitu sekitar 15-60 menit (Harmita, 2006).
d. Jumlah zat yang dianalisis cukup kecil, kira-kira 0,01 g senyawa murni/ 0,1 g simplisia (Harmita, 2006).
e. Teknik pengerjaan sederhana dan tidak diperlukan ruang besar (Harmita, 2006).

Kerugian menggunakan metode ini mungkin hanya pada prosedur pembuatan lempengnya yang membutuhkan tambahan waktu, kecuali bila telah tersedia lempeng yang diproduksi secara komersial (Harmita, 2006).

2.5.1.1 Komponen-komponen pada KLT

a. Adsorben

Adsorben merupakan komponen dalam KLT yang berfungsi sebagai fase diam (*stationer phase*). Adsorben yang umum digunakan pada KLT antara lain silika gel, alumina, poliamida, dan kieselguhr. Silika gel banyak digunakan sebagai penjerap dalam lempeng KLT. Prinsip pemisahan pada lempeng yang menggunakan silika gel adalah interaksi ikatan hidrogen atau dipol dengan permukaan silanol dimana fase gerak yang digunakan adalah zat yang bersifat lipofilik. Zat akan memisah dari silanol berdasarkan tingkat kepolarannya. Alumina adalah adsorben yang bersifat polar seperti silika gel, tetapi memiliki afinitas adsorpsi yang tinggi terhadap karbon ikatan rangkap dan lebih selektif untuk hidrokarbon aromatis dan turunannya. Poliamida merupakan adsorben yang memiliki gugus –CO-NH- dan menunjukkan afinitas tinggi dan selektif untuk

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

senyawa polar yang dibentuk dari ikatan hidrogen dengan senyawa karbonil (Sherma dan Fried, 2003).

Adsorben pada lempeng KLT tidak hanya berupa satu adsorben, tetapi terdapat pula dalam bentuk campuran, seperti silika gel-alumina, kieselguhr-alumina, alumina-kalsium sulfat, magnesia-kieselguhr, selulosa-silika gel, poliamida-silika gel, poliamida-kieselguhr, dan alumina-selulosa (Sherma dan Fried, 2003).

b. Lempeng

Lempeng yang digunakan pada KLT terbuat dari gelas/ kaca, plastik, atau aluminium. Umumnya lempeng tersebut berukuran 20 x 20 cm (Sherma dan Fried, 2003). Ukuran lainnya dari lempeng antara lain 5 x 20 cm, 10 x 20 cm dan 20 x 40 cm. Lempeng mikro dapat dibuat dari slide mikroskop (Gritter, Bobbits, dan Schwarting, 1987).

c. Sistem Pelarut

Dalam kromatografi lapis tipis, fase gerak (*mobile phase*) sering disebut sistem pelarut (Fried dan Sherma, 1999). Pelarut yang digunakan pada KLT bersifat mudah menguap, viskositasnya rendah, dapat membasahi lapisan lempeng dan tidak melarutkan sampel secara sempurna. Pada prakteknya, kita tidak mungkin menemukan pelarut dengan semua sifat di atas. Pemilihan pelarut atau fase gerak umumnya berdasarkan coba-coba dari para analis. Prinsip umum sistem kromatografi dalam hal pemilihan pelarut adalah pelarut yang dipilih seharusnya cocok dengan sampel dan lapisan adsorben yang digunakan. Alasannya, pelarut akan berkompetisi dengan zat yang dipisahkan (sampel). Zat polar membutuhkan pelarut polar untuk bermigrasi pada sisi lapisan adsorben. Pelarut yang memiliki daya yang lebih besar akan meningkatkan nilai Rf. Untuk KLT yang menggunakan silika gel sebagai adsorbennya, pelarut yang digunakan bersifat sedikit polar (Sherma, dan Fried, 2003).

Hal-hal yang perlu diperhatikan pada saat penggunaan pelarut pada KLT (eluen) antara lain: eluen harus murni, campuran eluen yang digunakan dapat terdiri dari dua sampai tiga jenis eluen, komposisi eluen dapat berubah karena penyerapan atau penguapan, komponen campuran eluen kemungkinan dapat

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

bereaksi satu sama lain, dan eter atau kloroform umumnya mengandung 0,5-1% etanol karena digunakan sebagai stabilisator (Harmita, 2006).

2.5.1.2 Aplikasi Sampel

Langkah pertama yang dilakukan pada kromatografi lapis tipis untuk proses analisis adalah penyiapan sampel. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan kemudian ditotolkan pada lempeng KLT. Konsentrasi sampel yang hendak dianalisis tidak boleh terlalu sedikit atau banyak. Jika sampel yang dianalisis jumlahnya terlalu sedikit, senyawa yang diperiksa kemungkinan tidak dapat terdeteksi. Sebaliknya, jika sampel yang dianalisis jumlahnya terlalu banyak, senyawa yang akan diperiksa tidak akan teradsorbsi oleh adsorben, tetapi hanya berada pada permukaan lapisan adsorben (Fried dan Sherma, 1999).

Langkah kedua adalah penyiapan lempeng sebelum penotolan sampel. Pada bagian atas lempeng seharusnya ditandai dengan pensil. Hal ini dimaksudkan untuk menandai daerah yang akan digunakan dan yang tidak digunakan. Selain itu, hal ini dimaksudkan juga untuk mencegah adanya sidik jari yang menempel pada daerah yang telah ditandai. Penggunaan sarung tangan selama penyiapan lempeng sangat diperlukan untuk mencegah adanya zat pengotor yang dapat mengganggu selama proses kromatografi. Sebelum digunakan, lempeng diaktifkan terlebih dahulu dengan cara memasukkan ke dalam oven pada suhu 70-110^{0}C selama 30 menit. Setelah diaktifkan, buat garis awal yang berjarak 1,5-2,5 cm dari bagian bawah lempeng (Fried dan Sherma, 1999).

Langkah ketiga adalah penotolan sampel. Sampel seharusnya ditotolkan pada garis horizontal lurus agar nilai Rf dapat dibandingkan. Setelah sampel ditotolkan pada lempeng KLT, lempeng tersebut dimasukkan ke dalam *chamber* (Fried dan Sherma, 1999).

2.5.1.3 Teknik Pengembangan

Proses pemisahan campuran sampel dengan cara migrasi fase gerak melewati lapisan lempeng dinamakan pengembangan (elusi). Ketika fase gerak terdiri dari dua atau lebih eluen dengan polaritas yang berbeda, pemisahan eluen

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

akan terjadi. Fenomena ini melibatkan pemisahan eluen oleh lapisan adsorben selama proses pengembangan karena adsorben memiliki afinitas yang lebih kuat untuk eluen yang bersifat lebih polar. Eluen yang kurang polar akan banyak terdapat pada bagian atas lempeng, sedangkan eluen yang lebih polar akan banyak terdapat pada bagian bawah lempeng. Kejenuhan *chamber* memiliki pengaruh yang besar terhadap nilai Rf dan pemisahan yang terjadi (Fried dan Sherma, 1999). Derajat retensi dinyatakan dengan Rf yang digunakan untuk menyatakan posisi dari sampel setelah pengembangan, dapat dihitung dengan (Stahl, 1969):

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

2.5.1.4 Deteksi dan Visualisasi

Setelah pengembangan, lempeng dikeluarkan dari *chamber* dan eluen diuapkan dengan pemberian udara panas atau hangat dengan pengering rambut atau dimasukkan ke dalam oven. Tahap selanjutnya yang dilakukan adalah proses deteksi sampel. Senyawa yang sudah berwarna langsung dideteksi dengan mata, sedangkan senyawa yang tidak berwarna dideteksi dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Jika suatu senyawa menghasilkan fluoresensi, senyawa tersebut diperiksa dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. (Fried dan Sherma, 1999).

2.5.2 Kromatografi Kolom

Salah satu metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar adalah menggunakan kromatografi kolom. Pada kromatografi kolom, fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel, selulosa atau poliamida. Fase gerak yang digunakan dapat dimulai dengan pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal ataupun kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan (Stahl, 1969).

Fraksi yang diperoleh dari kolom kromatografi ditampung dalam penampung dengan ukuran yang dikehendaki dan dilihat profilnya dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Jika menghasilkan profil KLT

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

yang mirip, maka fraksi tersebut digabung. Fraksi yang telah digabung, selanjutnya diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan isolat (Stahl, 1969).

Senyawa hasil isolasi sulit diperoleh senyawa murni karena terdiri dari banyak senyawa gabungan. Untuk senyawa berbentuk kristal, permuniaannya dapat dilakukan dengan metode rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara senyawa utama yang dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran dari pelarut yang cocok. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan dimurnikan. Adanya perbedaan kelarutan akibat pemanasan atau penambahan pelarut lain akan menyebabkan senyawa utama akan mengkristal lebih dahulu. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sehingga didapatkan senyawa berbentuk kristal yang lebih murni dan ditandai dengan jarak leleh yang tajam (Stahl, 1969).

2.6 Teknik Rekristalisasi

Rekristalisasi adalah teknik pemurnian bahan padat atau kristal. Senyawa yang diperoleh dari hasil suatu isolasi atau sintesis seringkali memiliki kemurnian yang tidak terlalu tinggi. Salah satu cara yang dilakukan untuk memurnikan senyawa tersebut perlu dilakukan teknik rekristalisasi. Pemilihan pelarut merupakan hal sangat penting dalam merekristalisasi suatu senyawa. Senyawa tersebut dilarutkan ke dalam pelarut yang sesuai kemudian dipanaskan sampai senyawa tersebut larut sempurna. Apabila dalam temperatur kamar senyawa tersebut sudah terlarut secara sempurna maka tidak perlu lagi dilakukan pemanasan (Vogel, 1956).

2.7 Uji Kemurnian

Kemurnian merupakan hal yang penting dimiliki suatu senyawa hasil isolasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi tersebut. Metode yang dapat digunakan untuk uji kemurnian senyawa hasil isolasi antara lain dengan penentuan jarak lebur dan penggunaan kromatografi lapis tipis dua dimensi.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

2.7.1 Jarak Lebur

Jarak lebur berperan penting dalam proses identifikasi dan pengujian kemurnian suatu senyawa organik padat. Senyawa murni memiliki jarak lebur yang tajam dimana jarak temperatur senyawa tersebut sangat kecil ketika berubah sempurna dari padat ke cair. Jarak temperatur maksimum untuk senyawa murni adalah 1-2^{0}C. Metode ini penting dilakukan untuk pengujian kemurnian karena fakta menunjukkan bahwa senyawa tidak murni memiliki suhu lebur yang rendah dan jarak lebur yang lebih lebar. Oleh karena itu, uji kemurnian pertama yang harus dilakukan adalah dengan penentuan jarak lebur (Margono dan Zandrato, 2006).

Pada identifikasi secara kualitatif, titik lebur merupakan tetapan fisika yang penting terutama untuk senyawa hasil isolasi, sintesis, maupun kristalisasi. Titik lebur kristal atau zat padat adalah temperatur ketika kristal atau zat padat tersebut mulai berubah menjadi cair pada tekanan udara satu atmosfer. Molekul senyawa akan menyerap energi ketika temperatur dinaikkan. Makin tinggi temperatur makin banyak energi yang diserap sehingga proses tersebut dapat meningkatkan gerakan vibrasi dan rotasi molekul. Molekul akan rusak dan berubah dari padat menjadi cair ketika temperatur terus dinaikkan. Saat telah menjadi cair, molekul tersebut masih terikat satu dengan yang lain tetapi ikatannya sudah tidak teratur lagi (Saputro, 2009).

2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

Pada awalnya metode ini menggunakan sistem satu dimensi. Namun, ekstrak tumbuhan dan produk obat herbal umumnya merupakan senyawa campuran sehingga akan sulit untuk diidentifikasi jika menggunakan metode kromatografi lapis tipis satu dimensi. Oleh karena itu, diperlukan metode lain yang lebih baik yaitu kromatografi lapis tipis dua dimensi. Penggunaan metode ini sering diterapkan untuk menguji kemurnian dari suatu senyawa dimana senyawa yang dikatakan murni adalah senyawa yang menghasilkan satu bercak setelah dilakukan proses elusi menggunakan eluen tertentu. Menurut Giddings (1984), langkah dari metode ini, yaitu sampel ditotolkan pada bagian pojok dari fase diam dan dilakukan proses elusi. Selanjutnya lempeng diangkat, dikeringkan, diputar

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

90^0, dan dilakukan elusi dengan eluen yang berbeda dari eluen pertama (Ciesla dan Waksmundzka-Hajnos, 2009). Keuntungan dari kromatografi lapis tipis dua dimensi antara lain (Ciesla dan Waksmundzka-Hajnos, 2009):

a. Merupakan salah satu metode sederhana tanpa menggunakan peralatan yang rumit.
b. Lempeng yang digunakan sekali pakai sehingga tidak perlu prosedur yang sulit untuk membersihkan sampel yang diuji.
c. Tidak ada batasan dalam penggunaan fase gerak karena sebelum dilakukan elusi kedua, dilakukan penguapan terlebih dahulu terhadap eluen pertama.
d. Mampu menganalisis senyawa campuran.
e. Hasil pemisahan mudah dilihat.

2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal dan mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Senyawa ini dapat mengurangi atau menangkap oksidan sebelum oksidan bereaksi dengan target biologis, mencegah terjadinya reaksi berantai, dan mencegah aktivasi oksigen agar tidak terbentuk produk reaktif (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, dan Kumar, 2006).

Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu antioksidan enzimatik dan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik adalah antioksidan yang diproduksi secara endogen. Contoh antioksidan enzimatik antara lain: enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase, glutathion reduktase, dan glukosa 6-fosfat dehidrogenase. Antioksidan non-enzimatik adalah antioksidan yang berasal dari sumber makanan dan mineral. Yang termasuk dalam antioksidan non-enzimatik antara lain: polifenol, vitamin, karotenoid, senyawa organosulfural, mineral dan antioksidan kofaktor (Ratnam, Ankola, Bhardwaj, Sahana, dan Kumar, 2006).

Menurut Amstrong (2002), antioksidan non-enzimatik diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu:

a. Antioksidan larut air. Contohnya asam askorbat, antosianidin, katekin, epikatekin, flavonoid, dan glikosida fenol.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

b. Antioksidan larut lemak. Contohnya vitamin A, vitamin E, karotenoid, likopen, dan senyawa quinonoid.
c. Antioksidan logam. Contohnya selenium pada bawang putih dan bawang merah.

2.8.1 Metode Uji Aktivitas Antioksidan secara *In Vitro*

Metode-metode uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* antara lain: peredaman radikal DPPH, TRAP, ORAC, TEAC, dan ABTS.

2.8.1.1 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Peredaman Radikal DPPH

1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) merupakan radikal bebas stabil dan berwarna ungu. Ketika larutan DPPH dicampurkan dengan zat uji yang dapat memberikan atom hidrogennya, maka warna dari DPPH akan tereduksi menjadi warna kuning pucat atau tak berwarna (Molyneux, 2004). Parameter yang menjadi interpretasi hasil dari metode ini adalah *efficient concentration* 50 atau nilai EC_{50} atau seringkali disebut juga *inhibition concentration* 50 atau nilai IC_{50}. IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi zat uji yang dapat menyebabkan kehilangan 50% aktivitas dari DPPH (berkaitan dengan berkurangnya intensitas warna dari DPPH). Zat uji yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi adalah zat yang memiliki nilai EC_{50} atau IC_{50} yang paling rendah. Waktu reaksi yang dibutuhkan dengan menggunakan metode ini adalah 30 menit (Molyneux, 2004).

2.8.1.2 Parameter Antioksidan Menjebak Radikal Total/ *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP)

Pada metode ini, kecepatan peroksidasi yang terinduksi oleh AAPH (2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorida) dipantau melalui hilangnya fluoresensi dari protein R-fikoerithrin. Fase lag yeng terinduksi oleh plasma dibandingkan dengan yang terinduksi oleh Trolox (analog vitamin E larut air) dalam sampel plasma yang sama.

Keuntungan dari metode ini adalah dapat digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan secara *in vitro* dalam serum atau plasma karena metode ini digunakan untuk mengukur antioksidan non-enzimatik seperti asam askorbat.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Kerugian menggunakan metode ini yaitu relatif kompleks, memakan banyak waktu, dan membutuhkan pengalaman dan keahlian yang tinggi (Badarinath, Rao, Chetty, Ramkanth, Rajan, dan Gnanaprakash, 2010).

2.8.1.3 Kapasitas Penyerapan Radikal Oksigen/ *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)

Pada dasarnya memiliki prinsip yang sama seperti pada metode TRAP. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ORAC berdasarkan pada kemampuan zat uji dalam menghambat oksidasi β-fikoeritrin oleh oksigen reaktif, relatif terhadap Trolox.

Keuntungan menggunakan metode ini adalah menggunakan pendekatan nilai daerah bawah kurva/ *Area Under Curve* (AUC) yang dapat menghasilkan perhitungan yang sama baiknya antara antioksidan yang memiliki fase lag dan tidak. Selain itu, metode ini telah digunakan secara luas dalam akademi dan industri makanan dan suplemen. Kerugiannya, ORAC terbatas hanya untuk mengukur antioksidan yang hidrofilik saja (Badarinath, Rao, Chetty, Ramkanth, Rajan, dan Gnanaprakash, 2010).

2.8.1.4 Kapasitas Antioksidan Ekuivalen Trolox/ *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC)

Metode ini didasarkan pada kemampuan molekul untuk menangkap radikal bebas stabil 2,2'-azinobis-(asam 3-etil-benzothiazolin-6-sulfonat) dibandingkan dengan Trolox, analog vitamin E larut air. Metode ini tidak digunakan secara luas, terbatas hanya untuk membandingkan hasil dengan pengujian lain (Badarinath, Rao, Chetty, Ramkanth, Rajan, dan Gnanaprakash, 2010).

2.8.1.5 ABTS {2,2'-azinobis-(asam 3-etil-benzothiazolin-6-sulfonat)}

Miller et al (1993) menjelaskan metode lain yang berbasis kolorimetri. Uji tersebut dinamakan ABTS. Uji ini didasarkan pada prinsip bahwa ketika ABTS diinkubasi dengan peroksidase (seperti metmioglobin dan H_2O_2) akan membentuk $ABTS^+$ kation radikal yang stabil. Pembentukan $ABTS^+$ dari interaksi dengan

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

ferril mioglobin membentuk warna hijau-biru yang relatif stabil. Antioksidan dalam sampel cairan menekan pembentukan warna tersebut.

2.9 Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak

Spektrofotometri ultraviolet-tampak merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk identifikasi suatu senyawa. Senyawa yang dapat diukur adalah senyawa senyawa yang memiliki gugus kromofor. Gugus kromofor adalah gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan sinar tampak jika senyawa-senyawa tersebut diikat oleh senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Hampir semua kromofor mempunyai ikatan rangkap berkonjugasi, seperti diena (C=C-C=C, dienon C=C-C=O), benzen, dan lain-lain. Contoh dari senyawa yang memiliki gugus kromofor antara lain: alkena, enon, ester, karboksilat, aldehid, dan aromatis (Supratman, 2010).

Spektrum ultraviolet-tampak merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Parameter yang perlu diketahui antara lain panjang gelombang, frekuensi, bilangan gelombang dan serapan. Panjang gelombang dinyatakan dalam satuan nanometer (1 nm = 10^{-9} m). Senyawa yang memiliki gugus kromofor dapat diketahui jumlah ikatan rangkap berkonjugasinya berdasarkan besarnya panjang gelombang maksimum. Semakin besar panjang gelombang maksimum diduga ikatan rangkap yang berkonjugasi lebih dari dua. Panjang gelombang maksimum pada sinar ultraviolet terentang antara 200 nm sampai 400 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum pada sinar tampak terentang antara 400 nm sampai 700 nm. Senyawa yang tidak memiliki kromofor, panjang gelombang maksimumnya di bawah 200 nm (Kosela, 2010).

Letak dan intensitas spektrum serapan ultraviolet dan tampak dipengaruhi oleh jenis pelarut, pH larutan, kadar larutan, tebal larutan, dan lebar celah. Efek yang ditimbulkan oleh faktor-faktor di atas terhadap spektrum serapan yang terbentuk adalah adanya perubahan serapan (hiperkromik dan hipokromik) dan perubahan panjang gelombang (hipsokromik dan batokromik). Hiperkromik adalah efek yang mengakibatkan kenaikan intensitas serapan, disebabkan oleh

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

pekatnya konsentrasi zat terlarut. Hipokromik adalah efek yang menyebabkan penurunan intensitas serapan disebabkan oleh encernya konsentrasi zat terlarut. Hipsokromik adalah pergeseran serapan maksimum ke arah panjang gelombang yang lebih pendek akibat substituen atau pelarut. Batokromik adalah pergeseran serapan maksimum ke arah panjang gelombang yang lebih panjang akibat substituen atau pelarut (Silverstein, Bassler, dan Morrill, 1991).

2.10 Spektrometri Inframerah

Spektrometri inframerah digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul. Spektrum inframerah adalah grafik dari panjang gelombang atau frekuensi atau bilangan gelombang yang berubah sepanjang suatu daerah sempit dari spektrum elektromagnetik, terhadap persen transmitan (% T) atau serapan (A). Daerah yang umumnya diperhatikan oleh ahli kimia organik dalam identifikasi suatu senyawa adalah bilangan gelombang 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} (Kosela, 2010).

Bila suatu senyawa menyerap radiasi pada suatu panjang gelombang tertentu, intensitas radiasi yang diteruskan oleh sampel akan berkurang. Hal tersebut mengakibatkan penurunan nilai %T dan terlihat pada spektrum sebagai suatu sumur yang disebut puncak absorbsi atau pita absorbsi (Kosela, 2010). Pita-pita absorbsi dalam spektrum infamerah dapat dikelompokkan menurut intensitasnya, yaitu: kuat (*strong*, s), medium (m), dan lemah (*weak*, w). Suatu pita lemah yang bertumpang tindih dalam suatu pita kuat disebut bahu (*shoulder*, sh). Istilah-istilah tersebut hanya bersifat kualitatif (Supratman, 2010).

2.11 Spektroskopi Massa

Metode spektroskopi massa berbeda dengan metode spektroskopi lain. Dalam spektrometer ini, suatu sampel dalam keadaan gas ditabrak atau ditembak dengan elektron berenergi tinggi. Penembakan tersebut menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari molekul sampel dan membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

sebuah spektrometer massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi (Supratman, 2010).

Spektrum massa adalah alur kelimpahan (*abundance*) jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan terhadap massa per muatan (m/z atau m/e) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari sampel yang dideteksi dalam suatu spektrometer massa adalah +1, maka nilai m/z sama dengan massa molekulnya (M). Suatu molekul atau ion dari suatu sampel akan pecah menjadi fragmen-fragmen bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Oleh karena itu, struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya dan dapat pula menentukan bobot molekul suatu senyawa dari spektrum massanya (Supratman, 2010).

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia; Laboratorium Kimia Farmasi/Analisis Obat; Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kuantitatif; Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi; dan Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia Depok; serta Laboratorium Fitokimia *Central Natural Product* Universitas Malaya Malaysia mulai Januari sampai Mei 2012.

3.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: blender Kirin KBB-200PL1, penguap putar (Janke & Kunkel IKA, Jerman), peralatan Maserasi, alat refluks, lempeng kromatografi lapis tipis preparatif (Merck, TLC Silica Gel 60 F_{254}), alat kromatografi kolom, Spektrofotometer Ultraviolet (Camag), Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak (UV 1601, Shimadzu), pipet mikro (Eppendorf), timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), inkubator (Memmert), Spektrofotometer Inframerah (Spektrum RX I, PerkinElmer), Kromatografi Cair-Spektrometer Massa (6530, Accurate-Mass Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies), dan alat penentu jarak lebur (Stuart, Scientific).

3.3 Bahan

3.3.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah daun *Phobe declinata* Nees yang diperoleh dari Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di LIPI Bogor.

3.3.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana, metanol, etil asetat, dan diklorometana teknis yang telah didestilasi; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (Wako); Celite; $CHCl_3$ (Merck); silika gel 60 (70-230 mesh, E.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Merck 1.07734); pereaksi semprot Dragendorff (Merck); Mayer LP, Dragendorff LP, Bouchardat LP, Asam Klorida p.a (Merck), dan Ammonium Hidroksida p.a (Merck).

3.3.3 Bahan Pembanding

Bahan pembanding yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah boldin (Sigma-Aldrich).

3.4 Cara Kerja

Proses isolasi senyawa alkaloid dan uji aktivitas antioksidan dari daun *Phoebe declinata* Nees dilakukan beberapa tahapan penelitian antara lain: penyiapan simplisia; identifikasi awal senyawa alkaloid; ekstraksi; isolasi ekstrak diklorometana; uji aktivitas antioksidan fraksi positif alkaloid; pemurnian fraksi teraktif; uji kemurnian isolat; uji aktivitas antioksidan kristal alkaloid; serta identifikasi isolat alkaloid menggunakan spektrofotometer ultraviolet-tampak, spektrometer inframerah, dan kromatografi cair-spektrometer massa. Selengkapnya skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1 Penyiapan Simplisia

Simplisia yang digunakan adalah daun *Phoebe declinata* Nees. Daun tersebut diambil dan dikumpulkan pada tanggal 2 November 2010 dari Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor sebanyak enam kilogram. Kemudian daun tersebut dikeringkan dalam ruangan yang dilengkapi dengan *air conditioner* (AC), bersuhu 17^0C selama dua minggu. Selanjutnya dilakukan sortasi terhadap daun tersebut. Daun yang telah disortasi dihaluskan dengan blender selama 15 detik lalu diayak dengan pengayak ukuran B30, kemudian serbuk disimpan dalam wadah yang bersih. Sebanyak dua kilogram serbuk daun kering ditimbang dengan seksama dan selanjutnya dilakukan ekstraksi.

3.4.2 Identifikasi Awal Senyawa Alkaloid (Depkes, 1995)

Sebanyak kurang lebih sepuluh miligram serbuk daun *Phoebe declinata* Nees ditambahkan kurang lebih 1 mL HCl 2N dan 9 mL air suling, dipanaskan di

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

penangas air selama 2 menit, kemudian didinginkan. Selanjutnya disaring dan larutan ditampung (filtrat). Larutan (filtrat) digunakan sebagai larutan percobaan selanjutnya.

a. Filtrat diambil kurang lebih 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Bouchardat ditambahkan sebanyak 2 tetes ke dalam tabung reaksi berisi filtrat. Hasil positif bila terbentuk endapan coklat sampai dengan hitam.
b. Filtrat diambil kurang lebih 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Mayer ditambahkan 2 tetes ke dalam tabung reaksi berisi filtrat. Hasil positif bila terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol.
c. Filtrat diambil kurang lebih 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pereaksi Dragendorff ditambahkan 2 tetes ke dalam tabung reaksi berisi filtrat. Hasil positif bila terbentuk endapan jingga coklat.

3.4.3 Ekstraksi

Serbuk kering daun *Phoebe declinata* Nees ditimbang dengan seksama kurang lebih 2 kg, dimasukkan ke dalam botol, dan ditambahkan dengan pelarut n-heksana teknis yang telah didestilasi. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi selama 24 jam dimana dilakukan pengocokan pada enam jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Maserat disaring dengan penyaring Buchner. Residu ditambahkan pelarut n-heksana dan dimaserasi kembali sebanyak lima kali sampai terjadi perubahan warna yang lebih muda. Maserat yang diperoleh, diuapkan dengan penguap putar hingga terbentuk ekstrak kental n-heksana, sedangkan residu diuapkan hingga kering. Selanjutnya residu ditambahkan dengan NH_4OH p.a lalu diuapkan, dimana proses tersebut dilakukan pada lemari asam. Residu tersebut diekstraksi kembali dengan cara refluks pada suhu 40^0C selama 30 menit menggunakan pelarut diklorometana teknis yang telah didestilasi. Hasil refluks disaring dengan penyaring Buchner. Filtrat yang dihasilkan, dipekatkan dengan penguap putar sampai dihasilkan ekstrak kental diklorometana. Residu ditambahkan dengan pelarut diklorometana dan direfluks kembali sebanyak enam kali sampai terjadi perubahan warna yang lebih muda.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Ekstrak kental tersebut diletakkan pada cawan penguap, dibiarkan mengering, dan ditimbang bobotnya.

3.4.4 Isolasi Ekstrak Diklorometana

Metode yang digunakan untuk isolasi ekstrak diklorometana adalah dengan kromatografi kolom.

3.4.4.1 Kromatografi Kolom Awal

Langkah-langkah yang dilakukan pada proses ini antara lain: pemilihan eluen yang tepat, preparasi sampel, preparasi kolom kromatografi, proses pemisahan dan identifikasi senyawa alkaloid dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

a. Pemilihan Eluen yang Tepat

Sebelum dilakukan isolasi ekstrak dengan cara kromatogafi kolom, dilakukan terlebih dahulu pemilihan eluen yang tepat dengan cara kromatografi lapis tipis. Ekstrak kental atau kering diklorometana ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 1 ml metanol. Larutan ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dalam *chamber* yang berisi diklorometana dan telah dijenuhkan selama 15 menit. Setelah dielusi, lempeng KLT dikeringkan dan dilihat bercaknya dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Hasilnya menunjukkan bahwa eluen diklorometana menghasilkan pemisahan terbaik. Berdasarkan literatur, campuran eluen diklorometana-metanol digunakan untuk memisahkan senyawa alkaloid yang berasal dari tumbuhan jenis *Phoebe* sp. menggunakan kromatografi kolom (Mukhtar, Aziz, Thomas, Hadi, Litaudon, dan Awang, 2009). Oleh karena itu, pada penelitian kali ini eluen yang digunakan adalah diklorometana, diklorometana-metanol dengan perbandingan komposisi yang berbeda, dan metanol.

b. Preparasi Sampel

Ekstrak kering diklorometana ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 gram, lalu dilarutkan dengan pelarut diklorometana. Larutan yang terbentuk

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

ditambahkan dengan kurang lebih 20 miligram silika gel. Campuran ekstrak dengan silika gel diaduk dan diuapkan sampai kering dan terbentuk serbuk.

c. Preparasi Kolom Kromatografi

Kolom kromatografi yang digunakan berukuran tinggi 59 cm dan berdiameter 4 cm. Silika gel ditimbang dengan seksama kurang lebih 193,4 gram. Silika gel tersebut disuspensikan dalam 500 ml diklorometana. Kapas dimasukkan ke dalam bagian dasar kolom kromatografi. Suspensi silika gel yang telah terbentuk dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Kertas saring diletakkan di atas suspensi silika gel.

d. Proses Pemisahan

Ekstrak yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya kertas saring diletakkan di atas ekstrak yang telah dipreparasi. Selanjutnya ekstrak tersebut dielusi dengan diklorometana-metanol dengan perbandingan 100:0, 99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 88:12, 84:16, 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. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol penampung ukuran 100 ml. Masing-masing fraksi yang terbentuk dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk dilihat profilnya. Masing-masing fraksi ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dalam *chamber* yang berisi diklorometana dan telah dijenuhkan selama 15 menit. Setelah dielusi, lempeng KLT dikeringkan dan dilihat bercaknya dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Fraksi-fraksi yang memiliki profil sama digabungkan.

e. Identifikasi Senyawa Alkaloid dengan KLT

Masing-masing fraksi gabungan yang terbentuk diuapkan hingga kering dan ditimbang bobotnya. Masing-masing fraksi yang telah digabungkan, ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dalam *chamber* yang berisi diklorometana dan telah dijenuhkan selama 15 menit. Setelah dielusi, lempeng KLT dikeringkan dan disemprot dengan penampak bercak yang berisi pereaksi Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya bercak berwarna jingga setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Warna jingga menunjukkan bahwa fraksi tersebut mengandung senyawa alkaloid. Selanjutnya fraksi yang positif senyawa alkaloid tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

3.4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Positif Alkaloid

Uji aktivitas antioksidan fraksi positif alkaloid dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

3.4.5.1 Secara Kualitatif

Langkah-langkah yang dilakukan pada tahap uji aktivitas antioksidan secara kualitatif antara lain: pembuatan pereaksi semprot 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) dan proses uji aktivitasnya.

a. Pembuatan Pereaksi Semprot 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH)

Pembuatan pereaksi semprot DPPH dilakukan dengan cara ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg DPPH. Kemudian DPPH tersebut dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml. Pereaksi tersebut dimasukkan ke dalam labu penyemprot.

b. Uji Aktivitas

Masing-masing fraksi positif alkaloid ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg, dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1 ml metanol. Selanjutnya masing-masing larutan tersebut ditotolkan pada kertas kromatografi. Kemudian kertas kromatografi tersebut disemprot dengan pereaksi DPPH. Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan adalah fraksi yang menghilangkan warna ungu dari larutan DPPH dan menghasilkan warna kuning di sekitar totolan sampel.

3.4.5.2 Secara Kuantitatif

Langkah-langkah yang dilakukan pada tahap uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif antara lain: pembuatan larutan blanko DPPH, optimasi panjang gelombang maksimum DPPH, uji aktivitas antioksidan larutan standar boldin, dan uji aktivitas antioksidan larutan uji fraksi alkaloid.

a. Pembuatan Larutan Blanko DPPH

Pembuatan larutan blanko DPPH dilakukan dengan cara ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg DPPH. Kemudian dilarutkan dengan metanol

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml.

b. Optimasi Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Optimasi penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan dengan cara dipipet 1,0 ml larutan blanko DPPH dan 3,0 ml metanol lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terlindung dari cahaya. Selanjutnya campuran dalam tabung reaksi dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37^0C selama 30 menit. Setelah 30 menit, campuran ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer Ultraviolet-Tampak pada panjang gelombang (λ) 400 nm hingga 800 nm serta ditentukan λ maksimumnya.

c. Uji Aktivitas Antioksidan Larutan Standar Boldin

Pembuatan larutan standar boldin dilakukan dengan cara ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg boldin. Kemudian boldin dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan induk boldin dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Larutan induk dipipet 500,0; 600,0; 700,0; 800,0; 900,0; 1000,0 µl kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Masing-masing labu ukur tersebut dicukupkan volumenya hingga batas dengan metanol sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 µg/ ml. Masing-masing larutan tersebut dipipet 1,0 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang terlindung dari cahaya. Lalu tabung reaksi ditambahkan 1,0 ml larutan blanko DPPH dan 2,0 ml metanol. Selanjutnya campuran dalam tabung reaksi dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik dan dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu 37^0C selama 30 menit. Setelah 30 menit, campuran ini diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan ketika optimasi panjang gelombang maksimum. Selanjutnya dilakukan perhitungan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi berdasarkan rumus sebagai berikut (Blois, 1958):

$$\%\ Inhibisi = \frac{Serapan\ Blanko\ DPPH - Serapan\ Standard\ Boldin}{Serapan\ Blanko\ DPPH}\ X\ 100\ \% \qquad (3.1)$$

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y = A + Bx$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi (µg/ml) dan y adalah persentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi standard boldin atau sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah menggantikan y dengan 50.

d. Uji Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Fraksi Alkaloid

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg ekstrak. Kemudian ekstrak dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Fraksi yang tidak larut, dilarutkan terlebih dahulu menggunakan sonikator selama lima menit. Larutan induk dipipet masing-masing 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 ml kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Masing-masing labu ukur tersebut dicukupkan volumenya hingga batas dengan metanol sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, dan 600 µg/ ml. Selanjutnya langkah pengujian antioksidan dan larutan uji fraksi alkaloid sama seperti langkah pengujian pada boldin. Kemudian dilakukan perhitungan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi berdasarkan rumus sebagai berikut (Blois, 1958):

$$\%\ Inhibisi = \frac{Serapan\ Blanko\ DPPH - Serapan\ Sampel}{Serapan\ Blanko\ DPPH}\ X\ 100\ \% \qquad (3.2)$$

Setelah didapat nilai persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, selanjutnya dilakukan perhitungan nilai IC_{50} sama seperti perhitungan pada standard boldin. Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat selanjutnya dilakukan pemurnian.

3.4.6 Pemurnian Fraksi Teraktif

Langkah-langkah pemurnian fraksi teraktif antara lain menggunakan kromatografi kolom lanjutan, rekristalisasi, dan kromatografi lapis tipis preparatif.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

3.4.6.1 Kromatografi Kolom Lanjutan

Langkah-langkah yang dilakukan pada metode ini sama seperti langkah pada kromatografi kolom awal.

a. Pemilihan Eluen Terbaik

Ekstrak fraksi teraktif ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 1 ml metanol. Larutan ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dalam *chamber* yang berisi campuran n-heksana-etil asetat dan telah dijenuhkan selama 15 menit. Setelah dielusi, lempeng KLT dikeringkan dan dilihat bercaknya dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Eluen yang terbaik adalah eluen yang menghasilkan pemisahan terbaik yaitu campuran n-heksana-etil asetat dengan perbandingan 80:20.

b. Preparasi Sampel

Ekstrak fraksi teraktif ditimbang dengan seksama kurang lebih 390,5 mg dan dilarutkan dengan pelarut diklorometana. Larutan yang terbentuk ditambahkan dengan silika gel. Campuran ekstrak dengan silika gel diaduk dan diuapkan sampai kering dan terbentuk serbuk.

c. Preparasi Kolom Kromatografi

Kolom kromatografi yang digunakan berukuran tinggi 30 cm dan berdiameter 1,2 cm. Silika gel ditimbang dengan seksama kurang lebih 8,73 gram. Silika gel disuspensikan dengan campuran pelarut n-heksan-etil asetat 90:10.

d. Pemisahan dengan Menggunakan Kromatografi Kolom

Ekstrak fraksi teraktif yang telah dipreparasi dimasukkan ke dalam kolom. Selanjutnya kertas saring diletakkan di atas ekstrak yang telah dipreparasi. Ekstrak dielusi dengan campuran eluen n-heksana-etil asetat dengan perbandingan 90:10; 88:12; 86:14; 84:16; 80:20; 75:25; 70:30; dan 60:40. Fraksi yang keluar dari kolom ditampung dalam botol penampung ukuran 100 ml. Masing-masing fraksi yang terbentuk dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk dilihat profilnya. Setiap fraksi ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi dalam *chamber* yang berisi eluen n-heksana-etil asetat 80:20 dan telah dijenuhkan selama 15 menit. Setelah dielusi, lempeng KLT dikeringkan dan dilihat bercaknya dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Fraksi-fraksi yang

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

memiliki profil sama digabungkan. Masing-masing fraksi gabungan yang terbentuk diuapkan hingga kering dan ditimbang bobotnya. Fraksi yang telah digabungkan, diperiksa kemurniannya dengan cara kromatografi lapis tipis dimana fraksi yang hanya memiliki satu bercak pada lempeng KLT dengan eluen tertentu adalah fraksi yang telah murni. Jika fraksi tersebut masih memiliki lebih dari satu bercak maka dimurnikan kembali dengan rekristalisasi atau KLT preparatif.

3.4.6.2 Rekristalisasi

Jika fraksi yang dihasilkan berupa kristal, proses pemurnian dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksana-etil asetat. Kristal tersebut dilakukan rekristalisasi sampai murni. Kemurnian diperiksa menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20. Kristal tersebut dikatakan murni ketika menghasilkan satu bercak pada lempeng KLT

3.4.6.3 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Ekstrak ditimbang dengan seksama kurang lebih 25,0 mg lalu dilarutkan dalam 5 ml diklorometana. Seluruh larutan ekstrak ditotolkan pada lempeng kaca KLT preparatif. Metode KLT preparatif yang digunakan adalah metode Semwal, Rawat, dan Singh yang telah dimodifikasi. Lempeng kaca KLT preparatif dielusi ke dalam *chamber* besar yang berisi eluen n-heksana-etil asetat 80:20 dan telah dijenuhkan selama 1 jam. Setelah dielusi, lempeng kaca KLT preparatif dikeringkan dan dilihat bercaknya dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Sedikit bagian lempeng kaca KLT preparatif disemprot dengan pereaksi Dragendorff untuk memperkirakan bercak yang positif alkaloid. Hal tersebut ditandai dengan adanya bercak yang berwarna jingga setelah disemprot pereaksi Dragendorff. Bercak yang positif alkaloid dikeruk dan dimasukkan ke dalam gelas piala. Campuran ekstrak dan silika gel dalam gelas piala dilarutkan dengan diklorometana, lalu disaring dalam kolom kecil yang berisi Celite. Filtrat yang terbentuk ditampung dalam vial, diuapkan

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

hingga kering, ditimbang bobotnya dan diperiksa kembali kemurniannya menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20.

3.4.7 Uji Kemurnian Isolat

3.4.7.1 Penentuan Jarak Lebur

Isolat berupa kristal dimasukkan ke dalam mikrokapiler yang tertutup salah satu ujungnya. Mikrokapiler dimasukkan ke dalam alat penentu titik lebur dan pemanas diaktifkan. Kenaikan suhu diatur 20^0C/menit sampai 60^0C. Ketika suhu mencapai 85^0C, kenaikan suhu diatur menjadi 1^0C/menit. Suhu pada saat mula-mula zat melebur hingga melebur sempurna seluruhnya dicatat sebagai jarak lebur.

3.4.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

Kristal dilarutkan ke dalam diklorometana sampai larut sempurna. Larutan isolat ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT). Lempeng KLT dielusi dalam *chamber* yang berisi eluen diklorometana-metanol 96:4. Setelah proses elusi selesai, lempeng dikeringkan dan diperiksa bercaknya dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Tandai bercak dalam lempeng dengan pensil. Kemudian lempeng diputar 90^0 dan dielusi kembali dalam *chamber* yang berisi eluen n-heksana-etil asetat 90:10. Setelah selesai dielusi, lempeng dikeringkan dan dilihat kembali bercaknya dengan spektrofometer ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm. Tandai bercak dengan pensil. Selanjutnya dilakukan identifikasi alkaloid dengan penyemprot Dragendorff untuk memastikan bahwa bercak tersebut adalah isolat alkaloid. Terakhir, bercak pada lempeng KLT dihitung nilai $R_f$nya.

.

3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Kristal Alkaloid

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan cara ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg kristal. Kemudian kristal dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 100,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 100 µg/ml. Larutan induk dipipet masing-masing 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0; 10,0 ml kemudian

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Masing-masing labu ukur tersebut dicukupkan volumenya dengan metanol hingga batas sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 20, 40, 50, 60, 80, dan 100 µg/ ml. Langkah pengujian antioksidan dan perhitungan IC_{50} sama seperti langkah pada pengujian dan perhitungan larutan uji fraksi alkaloid.

3.4.9 Identifikasi Isolat Alkaloid Menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak, Spektrometri Inframerah, dan Kromatografi Cair-Spektrometer Massa.

3.4.9.1 Pemeriksaan Spektrum Ultraviolet-Tampak

Sebanyak kurang lebih 1 mg sampel dilarutkan ke dalam pelarut metanol. Larutan ditempatkan pada kuvet dan diukur serapannya pada panjang gelombang 200 sampai 600 nm. Blanko yang digunakan adalah metanol.

3.4.9.2 Pemeriksaan Spektrum Inframerah

Sebanyak kurang lebih 1 mg sampel dilarutkan ke dalam $CHCl_3$. Larutan tersebut selanjutnya ditempatkan ke dalam pelet yang telah tersedia. Pelet yang telah siap tersebut selanjutnya diukur serapan inframerahnya.

3.4.9.3 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan Kromatografi Cair-Spektrometer Massa (LC-MS)

Sebanyak 1 mg sampel dilarutkan dalam metanol p.a, lalu larutan diambil menggunakan *syringe*, kemudian disuntikkan ke dalam vial hingga batas 1 mL menggunakan *syringe* yang telah dilengkapi filter. Larutan sampel dalam vial kemudian diukur dengan kromatografi cair-spektrometer massa melalui kolom C-18 2,5 µm (2,1 x 50 mm) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Simplisia

Tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Phoebe declinata* Nees. Tumbuhan tersebut diperoleh dari Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi oleh LIPI Bogor. Hasil determinasi dari tumbuhan tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2. Adapun bagian yang digunakan adalah bagian daunnya. Sebanyak kurang lebih enam kilogram daun basah tumbuhan tersebut diambil dan dikumpulkan pada tanggal 2 November 2010. Kemudian daun tersebut dikeringanginkan dalam ruangan yang dilengkapi dengan *air conditioner* (AC), bersuhu 17^0C selama dua minggu. Daun dikeringkan bertujuan untuk mengurangi kadar air sehingga tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri; mengurangi aktivitas enzim yang dapat menguraikan kandungan zat aktif; serta memudahkan proses pengolahan selanjutnya sehingga dapat lebih ringkas, tahan lama, dan mudah disimpan (Manoi, 2006). Daun kering yang dihasilkan sebanyak 2,8 kg. Selanjutnya daun kering disortasi dengan tujuan untuk memisahkan pengotor atau benda-benda asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji daun. Daun yang telah disortasi dihaluskan dengan *blender* selama 15 detik lalu diayak dengan pengayak ukuran B30. Tujuan penghalusan simplisia adalah untuk memperluas bidang kontak antara simplisia dengan pelarut pada saat proses ekstraksi. Semakin luas bidang kontak antara simplisia dengan pelarut maka akan semakin banyak jumlah zat kimia yang akan terekstraksi. Kemudian serbuk disimpan dalam wadah yang bersih dengan tujuan untuk menjaga mutu dari simplisia.

4.2 Identifikasi Awal Senyawa Alkaloid

Umumnya alkaloid diekstraksi terlebih dahulu dari suatu tumbuhan dengan pelarut yang bersifat asam (Harborne, 1987). Tahap ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan pelarut air dalam suasana asam yaitu HCl 2N dan air suling dengan perbandingan 1:9. Selanjutnya larutan diuji dengan pereaksi

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Mayer, Dragendorff, dan Bouchardart. Hasil uji dengan menggunakan pereaksi-pereaksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji identifikasi awal senyawa alkaloid

No.	Pereaksi	Hasil
1	Mayer	-
2	Dragendorff	-
3	Bouchardat	-

Pada tabel tersebut menunjukkan hasil yang negatif terhadap semua pereaksi alkaloid. Hal tersebut terjadi kemungkinan disebabkan karena pelarut yang digunakan untuk ekstraksi tidak cukup kuat untuk menyari alkaloid yang terkandung di dalamnya. Selain itu, kandungan alkaloid yang terdapat pada tumbuhan tersebut kemungkinan sedikit sehingga dengan jumlah simplisia yang digunakan untuk uji jumlahnya pun sedikit maka hasilnya terlihat negatif palsu saat penambahan ketiga pereaksi tersebut. Menurut Harborne (1987), terdapat metode lain yang dapat digunakan untuk mendeteksi alkaloid yaitu metode kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis. Kertas atau lempeng ditotolkan ekstrak lalu dielusi dalam eluen yang umum digunakan. Kemudian kertas atau lempeng disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna bercak menjadi warna jingga setelah disemprot pereaksi Dragendorff.

4.3 Ekstraksi

Sebanyak kurang lebih dua kilogram serbuk kering daun *Phoebe declinata* Nees ditimbang dengan seksama lalu dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut n-heksana sebanyak 5,5 L yang telah didestilasi. Adapun proses ini terdiri dari dua tahap yaitu dilakukan pengocokan pada enam jam pertama kemudian dibiarkan 18 jam. Cara maserasi dipilih untuk proses ekstraksi pertama karena peralatan yang digunakan sederhana dan dapat mengekstraksi simplisia dalam jumlah lebih banyak meskipun waktu yang dibutuhkan untuk proses ini cukup lama. Proses ini dilakukan pada suhu 25^0C dengan kecepatan maserator 120 rpm. Selanjutnya dilakukan proses pengulangan maserasi sebanyak lima kali sampai filtrat yang dihasilkan berwarna hijau lemah. Perubahan warna filtrat dapat dilihat pada

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Gambar 4.1. Filtrat yang dihasilkan disaring menggunakan penyaring Buchner dan diuapkan dengan penguap putar pada suhu 50^0C sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana. Ekstrak kental n-heksana tersebut diletakkan pada cawan penguap, diuapkan pada *waterbath* dengan suhu 37^0C, serta ditimbang dan dihitung rendemennya. Hasil penimbangan dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada Tabel 4.2. Residu dari hasil maserasi diuapkan hingga kering agar residu tidak mengandung pelarut n-heksana.

N-heksana merupakan pelarut yang bersifat non polar sehingga n-heksana dipilih sebagai pelarut pengekstraksi pertama dengan tujuan untuk menyari senyawa-senyawa non polar yang terkandung dalam simplisia. Senyawa non polar disari dari simplisia tersebut untuk memudahkan proses ekstraksi selanjutnya sehingga kandungan senyawa non polar yang terkandung pada ekstrak berikutnya berjumlah sedikit atau tidak ada sama sekali.

Residu hasil maserasi ditambahkan dengan 100 ml NH_4OH p.a lalu diuapkan. Penambahan NH_4OH p.a tersebut bertujuan untuk membentuk alkaloid bebas sehingga diharapkan pada proses ekstraksi selanjutnya banyak alkaloid yang tersari oleh pelarut diklorometana. Residu yang telah kering direfluks dengan 10 L diklorometana yang telah didestilasi. Refluks dilakukan pada suhu 40^0C selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan pengulangan refluks sebanyak enam kali sampai filtrat berwarna kuning pucat. Perubahan warna filtrat dapat dilihat pada Gambar 4.2. Filtrat yang dihasilkan disaring dengan penyaring Buchner dan diuapkan dengan penguap putar pada suhu 50^0C sehingga diperoleh ekstrak kental diklorometana. Ekstrak kental diklorometana tersebut diletakkan pada cawan penguap, diuapkan pada *waterbath* dengan suhu 37^0C, serta ditimbang dan dihitung rendemennya. Hasil penimbangan dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil ekstraksi dan rendemen ekstrak tumbuhan uji

No	Pelarut	Berat Simplisia (g)	Volume Ekstraksi (ml)	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
1	n-heksana	2000,0	16720	55,6	2,78
2	Diklorometana	2000,0	84500	109,2	5,46

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

4.4 Isolasi Ekstrak Diklorometana

Isolasi ekstrak diklorometana dilakukan dengan cara kromatografi kolom. Eluen yang digunakan adalah diklorometana-metanol dengan perbandingan 100:0, 99:1, 98:2, 95:5, 90:10, 88:12, 84:16, 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. Dari proses pemisahan ini dihasilkan 130 fraksi. Masing-masing fraksi dilihat profilnya dengan cara KLT dan diidentifikasi dengan penampak bercak yang berisi pereaksi Dragendorff. Fraksi yang memiliki profil yang sama digabungkan sehingga terbentuk 15 fraksi. Kemudian masing-masing fraksi gabungan ditimbang. Hasil penimbangan dan identifikasi senyawa alkaloid dapat dilihat pada Tabel 4.3.

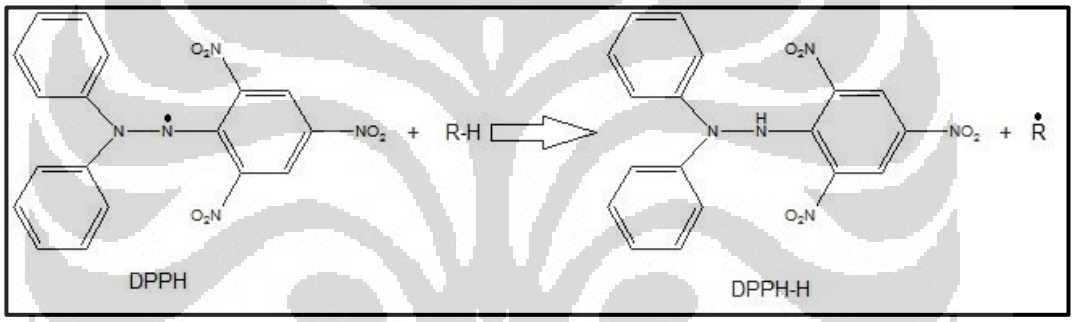
Tabel 4.3 Hasil penimbangan masing-masing fraksi dan identifikasi senyawa alkaloid

No.	Fraksi Ke-	Bobot Fraksi (mg)	Identifikasi Alkaloid
1.	I	1842,9	-
2.	II	1803,7	-
3.	III	2512,3	+
4.	IV	994,4	+
5.	V	903,4	+
6.	VI	839,8	+
7.	VII	472,4	+
8.	VIII	97,1	-
9.	IX	739,1	-
10.	X	755,7	-
11.	XI	508,8	-
12.	XII	87,9	-
13.	XIII	1309,8	-
14.	XIV	243,9	-
15.	XV	26,8	-

Pada tabel di atas, fraksi yang positif alkaloid adalah fraksi III, IV, V, VI, dan VII. Kelima fraksi tersebut selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH).

4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Positif Alkaloid

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH). Metode ini dipilih karena mudah dilakukan, efektif, dan waktu yang diperlukan untuk proses uji cukup cepat (Badarinath, Rao, Chetty, Ramkanth, Rajan, dan Gnanaprakash, 2010). Pada proses pengujian, zat uji akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi senyawa bukan radikal yaitu 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin yang stabil. Hal tersebut ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat atau tidak berwarna (Molyneux, 2004). Mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 4.3.

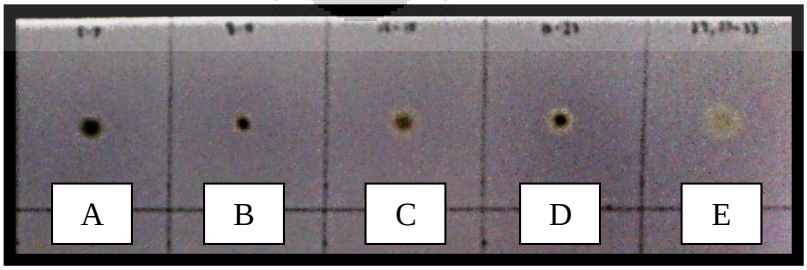


[sumber: Gressler, Moura, Flores, Flores, Colepicolo, dan Pinto, 2010, telah diolah kembali)

Gambar 4.3 Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas

4.5.1 Uji Kualitatif

Masing-masing fraksi dilarutkan dalam metanol, ditotolkan pada kertas kromatografi dan dikeringkan. Setelah kering, kertas kromatografi tersebut disemprot dengan larutan DPPH. Hasilnya dilihat pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.4.



[Sumber: koleksi penulis]
Keterangan : A = Fraksi III, B = Fraksi IV, C = Fraksi V, D = Fraksi VI, dan E = Fraksi VII.

Gambar 4.4 Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif

Pada Gambar 4.4 menunjukkan bahwa fraksi IV-VII positif memiliki aktivitas antioksidan, sedangkan fraksi III negatif. Daerah yang berwarna kuning di sekitar totolan ekstrak menunjukkan kemampuan dari ekstrak tersebut untuk meredam warna ungu yang berasal dari warna larutan DPPH. Dengan kata lain, ekstrak tersebut mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Semakin luas daerah yang berwarna kuning maka semakin besar kemampuan ekstrak tersebut meredam radikal bebas DPPH dan semakin besar pula aktivitas antioksidannya.

Tabel 4.4 Hasil uji aktivitas antioksidan secara kualitatif seluruh fraksi

No.	Fraksi Ke-	Aktivitas Antioksidan
1.	I	+
2.	II	-
3.	III	-
4.	IV	+
5.	V	+
6.	VI	+
7.	VII	+
8.	VIII	+
9.	IX	+
10.	X	+
11.	XI	+
12.	XII	+
13.	XIII	+
14.	XIV	+
15.	XV	+

Pada tabel di atas menunjukkan bahwa fraksi yang mengandung alkaloid (fraksi IV, V, VI, VII) dan fraksi selain fraksi alkaloid (I, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV) memiliki aktivitas antioksidan.

4.5.2 Uji Kuantitatif Fraksi Positif Alkaloid

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan untuk mengetahui konsentrasi yang dibutuhkan zat uji dalam menghambat 50% radikal DPPH atau dikenal dengan nilai *inhibition concentration* 50% (IC_{50}). Alat yang digunakan dalam pengujian ini adalah spektrofotometer Ultraviolet-Tampak. Langkah

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

pertama yang dilakukan adalah optimasi panjang gelombang DPPH. Berdasarkan penelusuran literatur, panjang gelombang optimal dari DPPH adalah 515-520 nm (Molyneux, 2004). Setelah dilakukan optimasi, panjang gelombang maksimum dari DPPH adalah 517 nm. Spektrum dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif terhadap zat standard. Zat standard yang digunakan sebagai pembanding adalah boldin. Boldin dijadikan sebagai zat pembanding karena zat ini diketahui merupakan alkaloid yang memiliki aktivitas antioksidan yang poten dan sebagai agen sitoprotektif (O'Brien, Carrasco-Pozo, dan Speisky, 2006). Pada literatur yang sama, boldin diketahui memiliki nilai IC_{50} sebesar $5x10^{-6}$ – $15x10^{-6}$ M dalam melindungi membran plasma sel darah merah yang terinduksi AAPH (2,2-azobis[2-amidinopropan]). Adapun nilai IC_{50} boldin mengunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dalam penelitian ini adalah 5,90 µg/ml.

Setelah dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap standard boldin, langkah selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap fraksi III-VII. Prosedur uji aktivitas antioksidan fraksi III-VII sama seperti prosedur uji dari standard boldin, tetapi berbeda dalam hal perhitungan dimana persentase inhibisi fraksi dihitung dari selisih serapan blanko DPPH dengan serapan sampel fraksi yang kemudian dibagi dengan serapan blanko DPPH dan dikalikan dengan seratus persen.

Pada penelitian ini fraksi III tetap dilakukan pengujian aktivitas antioksidan meskipun pada pengujian secara kualitatif menunjukkan hasil negatif. Hal tersebut dilakukan karena pengujian secara kualitatif tidak dapat dijadikan acuan karena hanya diamati oleh mata yang memiliki keterbatasan.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Hasil uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif menunjukkan bahwa fraksi VII memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan fraksi III-VI (dapat dilihat pada Tabel 4.5).

Tabel 4.5 Hasil uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif boldin dan fraksi III, IV, V, VI, VII

No.	Serapan Blanko DPPH	Sampel			% Inhibisi	Pers. Regresi Linier	IC_{50} (µg/ml)
		Nama	Konsentrasi (µg/ml)	Serapan			
1	0,6970	Boldin	1,25	0,6160	11,62	y = 1,7556 + 8,1823x r = 0,9819	5,90
			1,50	0,5960	14,49		
			2,00	0,5750	17,50		
			2,25	0,5480	21,38		
			2,50	0,5470	21,52		
2	0,7177	Fraksi III	25	0,7177	0	-	-
			50	0,7177	0		
			75	0,7177	0		
			100	0,7177	0		
			125	0,7177	0		
			150	0,7177	0		
3	0,6387	Fraksi IV	25	0,6014	5,84	y = 1,9973 + 0,1072x r = 0,9694	447,79
			50	0,5958	6,72		
			75	0,5880	7,94		
			100	0,5498	13,92		
			125	0,5363	16,03		
			150	0,5249	17,82		
4	0,6025	Fraksi V	25	0,5761	4,38	y = 2,1727 + 0,0894x r = 0,9821	534,98
			50	0,5651	6,21		
			75	0,5511	8,53		
			100	0,5259	12,71		
			125	0,5240	13,03		
			150	0,5116	15,09		
5	0,6924	Fraksi VI	25	0,6230	10,02	y = 4,8840 + 0,1772x r = 0,9831	254,61
			50	0,6073	12,29		
			75	0,5679	17,98		
			100	0,5276	23,80		
			125	0,5022	27,47		
			150	0,4795	30,75		
6	0,4265	Fraksi VII	25	0,3190	8,32	y = 2,4853 + 0,2329x r = 0,9999	204,01
			50	0,3652	14,37		
			75	0,3439	19,37		
			100	0,3157	25,98		
			125	0,2902	31,96		
			150	0,2678	37,21		

Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yang paling kecil yaitu 204,01 µg/ml. Nilai IC_{50} fraksi IV-VI berturut-turut adalah 447,79; 534,98; dan 254,61 µg/ml. Jika nilai IC_{50} dari fraksi VII dibandingkan dengan standard boldin ternyata memiliki perbedaan yang sangat signifikan dimana fraksi VII memiliki aktivitas antioksidan yang kurang kuat. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena fraksi VII belum murni.

Pada fraksi III, serapan zat uji sama dengan serapan blanko DPPH. Hal tersebut menunjukkan bahwa zat uji tidak memiliki kemampuan untuk meredam radikal bebas DPPH atau dengan kata lain fraksi ini tidak memiliki aktivitas antioksidan. Hasil ini semakin memperkuat data pada uji aktivitas antioksidan secara kualitatif bahwa fraksi III memang tidak memiliki aktivitas antioksidan.

4.6 Pemurnian Fraksi Teraktif

Zat uji fraksi VII yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi III, IV, V, dan VI selanjutnya dilakukan pemurnian dengan menggunakan kolom kromatografi yang lebih kecil karena bobot zat uji pada fraksi ini hanya berjumlah 390,5 mg. Sebelum dilakukan pemurnian dengan menggunakan kramatografi kolom, terlebih dahulu dilakukan pemilihan eluen yang tepat dengan menggunakan metode KLT. Eluen yang menunjukkan pemisahan yang terbaik adalah n-heksana-etil asetat 80:20. Pemisahan tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.6.

Eluen yang digunakan pada proses pemurnian dengan kromatografi kolom kecil tidak hanya menggunakan eluen n-heksana-etil asetat dengan perbandingan 80:20 saja, tetapi digunakan n-heksana-etil asetat dengan perbandingan 90:10 kemudian diturunkan menjadi 88:12; 86:14; 84:16; 80:20; 75:25; 70:30; dan 60:40. Hal tersebut dilakukan karena terkadang pemisahan yang terbentuk pada KLT terkadang tidak sama dengan pemisahan pada kromatografi kolom. Hasil dari proses kromatografi kolom ini dihasilkan 14 fraksi. Masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20. Setelah dielusi, lempeng dikeringkan, dilihat profilnya, digabungkan, serta disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Dari proses ini dihasilkan 8 fraksi dan fraksi yang positif alkaloid hanya fraksi C.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Fraksi C dilakukan KLT dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20 untuk dilihat kemurniaannya. Hasilnya terbentuk dua bercak dan setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff hanya satu bercak yang berwarna jingga (positif alkaloid). Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 4.7. Kemudian fraksi C diuapkan dan setelah kering dihasilkan serbuk putih kehijauan sebanyak 87,3 mg. Serbuk tersebut dilakukan KLT kembali dan masih dihasilkan dua bercak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa serbuk tersebut masih belum murni. Oleh karena itu, dilakukan pemurnian dengan metode rekristalisasi. Pelarut yang digunakan pada proses rekristalisasi adalah campuran n-heksana-etil asetat. Ketidakmurnian tersebut kemungkinan disebabkan karena pengotor yang terdapat di dalamnya masih ada yang menempel pada serbuk pada saat proses penguapan.

Serbuk tersebut dimurnikan dengan metode lain yaitu metode KLT preparatif dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20. Bercak yang positif alkaloid dikeruk dan disaring. Dari proses ini dihasilkan kristal sebanyak 26,9 mg. Kristal tersebut berwarna putih kekuningan dan tidak berbau.

4.7 Uji Kemurnian Isolat

Kristal fraksi C selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan cara penentuan jarak lebur dan pemeriksaan dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi.

4.7.1 Jarak Lebur

Pengujian kemurnian kristal yang pertama dilakukan adalah penentuan titik lebur. Dari pengujian tersebut didapat hasil bahwa jarak lebur kristal adalah 102-104^{0}C. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa kristal fraksi C cukup murni karena rentang perbedaan suhunya cukup sempit, yaitu 2^{0}C.

4.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

Pengujian kemurnian selanjutnya yang dilakukan adalah dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Hasil dari pengujian ini didapat bercak tunggal (dapat dilihat pada Gambar 4.8). Hal tersebut menunjukkan bahwa kristal fraksi C cukup murni karena dihasilkan satu bercak pada lempeng KLT. Selain

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

itu, kristal tersebut merupakan kristal alkaloid karena menghasilkan warna jingga setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Adapun nilai R_f pada elusi pertama dengan menggunakan eluen diklorometana-metanol 96:4 adalah sebesar 0,771. Nilai R_f pada elusi kedua dengan menggunakan eluen n-heksana-etil asetat 90:10 adalah sebesar 0,186. Kedua nilai R_f tersebut menunjukkan bahwa kristal merupakan senyawa semipolar karena diklorometana dan etil asetat bersifat semipolar.

4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Kristal Fraksi C

Hasil dari pengujian aktivitas antioksidan kristal fraksi C didapat nilai IC_{50} sebesar 147,62 μg/ml (selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6).

Tabel 4.6 Nilai IC_{50} dari kristal fraksi C

Serapan Blanko DPPH	Sampel			% Inhibisi	Pers. Regresi Linier	IC_{50} (μg/ml)
	Nama	Konsentrasi (μg/ml)	Serapan			
0,7270	Kristal Alkaloid	5	0,6710	7,70	y = 6,2457 + 0,2964x r = 0,9969	147,62
		10	0,6580	9,49		
		12,5	0,6560	9,77		
		15	0,6500	10,59		
		20	0,6390	12,10		
		25	0,6270	13,76		

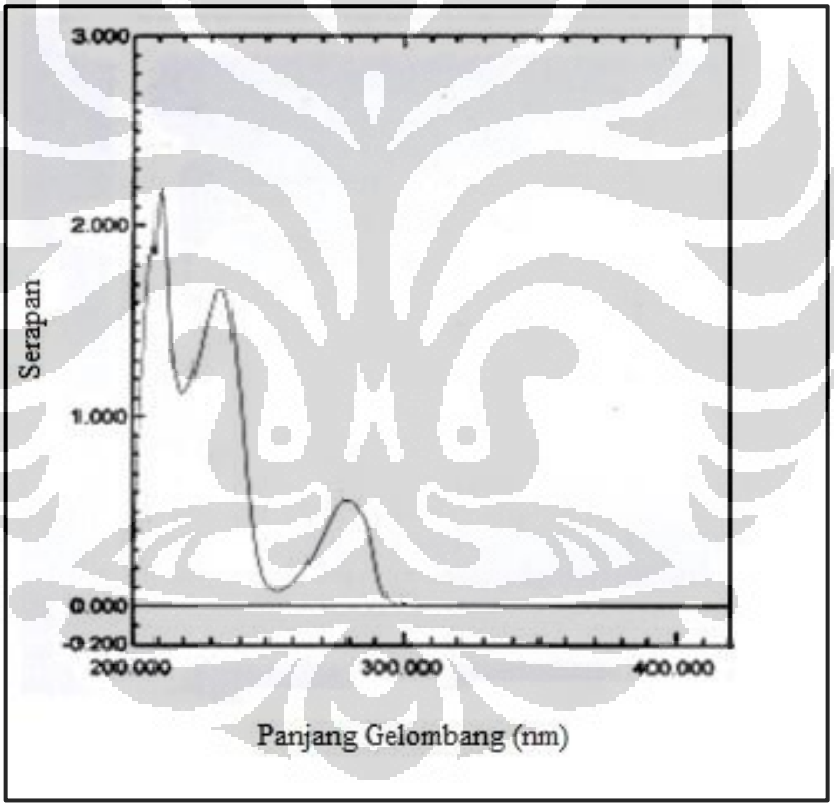
Dari hasil tersebut menunjukkan adanya penurunan nilai IC_{50} dari 204,01 μg/ml pada fraksi VII yang belum dimurnikan menjadi 147, 62 μg/ml pada kristal hasil pemurnian atau dengan kata lain kristal fraksi C yang sudah cukup murni tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan ketika masih belum murni. Fraksi VII memiliki aktivitas yang lebih rendah dibandingkan kristal fraksi C kemungkinan disebabkan adanya zat pengotor yang memiliki kemampuan untuk menurunkan aktivitas antioksidannya.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

4.9 Identifikasi Isolat Alkaloid Menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak, Spektrometer Inframerah dan Kromatografi Cair-Spektrometer Massa

4.9.1 Spektrum Ultraviolet-Tampak

Kristal memberikan puncak serapan pada panjang gelombang 210 nm sebesar 2,204; panjang gelombang 232,5 nm sebesar 1,672; serta panjang gelombang 279 nm sebesar 0,555. Tiga puncak di atas merupakan ciri-ciri adanya senyawa aromatis dan ikatan rangkap terkonjugasi dalam struktur senyawa kristal fraksi C (Supratman, 2010). Gambar spektrum Ultraviolet Tampak dari kristal dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Spektrum ultraviolet-tampak dari kristal fraksi C

4.9.2 Spektrum Inframerah

Spektrum inframerah dari kristal fraksi C menunjukkan puncak-puncak serapan pada bilangan gelombang 3000 cm^{-1}; 2956 cm^{-1}; 2835 cm^{-1}; 1607 cm^{-1}; 1592 cm^{-1}; 1516 cm^{-1}; 1463 cm^{-1}; 1418 cm^{-1}; 1382 cm^{-1}; 1264 cm^{-1}; 1235 cm^{-1};

1161 cm^{-1}; 1138 cm^{-1}; 1107 cm^{-1}; 1028 cm^{-1}; 858 cm^{-1}; 808 cm^{-1}; dan 762 cm^{-1}. Gambar spektrum inframerah kristal fraksi C dapat dilihat pada Gambar 4.10.

Tabel hasil identifikasi puncak serapan spektrum inframerah kristal fraksi C dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Identifikasi puncak serapan spektrum inframerah kristal fraksi C

No.	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Bentuk Puncak Serapan dan Intensitas Serapan	Gugus Fungsi
1	3000	Tajam dan Lemah	C-H aromatis
2	2956	Tajam dan Sedang	C-H alkana
3	1592	Tajam dan Lemah	C=C alkena
4	1516	Tajam dan Kuat	C=C aromatis
5	1463	Tajam dan Sedang	C=C aromatis
6	1382	Tajam dan Lemah	C-H alkana
7	1264	Tajam dan Kuat	C-O-C
8	1028	Tajam dan Kuat	C-N

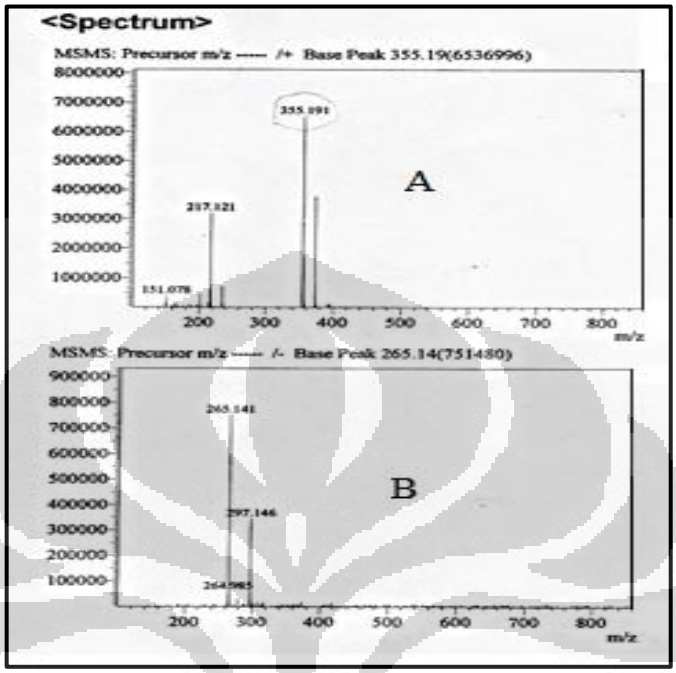
Dari data di atas didapatkan puncak tajam dan lemah pada bilangan gelombang 3000 cm^{-1}; puncak tajam dan kuat pada bilangan gelombang 1516 cm^{-1} serta puncak tajam dan sedang pada bilangan gelombang 1463 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus fungsi aromatis. Puncak tajam dan sedang pada bilangan gelombang 2956 cm^{-1} dan puncak tajam dan lemah pada bilangan gelombang 1382 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus fungsi alkana. Puncak tajam dan lemah pada bilangan gelombang 1592 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus alkena. Puncak tajam dan kuat pada bilangan gelombang 1264 cm^{-1} mengindikasikan adanya ikatan C-O-C. Puncak tajam dan kuat pada bilangan gelombang 1028 cm^{-1} mengindikasikan adanya ikatan C-N (Silverstein, Bassler, dan Morrill, 1991).

4.9.3 Spektrum Massa

Pada pemeriksaan spektrum massa dengan menggunakan kromatografi cair-spektroskopi massa diperoleh puncak fragmentasi m/e 355, 217, dan 151

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

pada detektor ion positif. Pada detektor ion negatif terdapat puncak fragmentasi pada m/e 297, 265, dan 264. Gambar spektrum massa dari isolat dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Keterangan: A = Spektrum massa dengan detektor ion positif;
B = Spektrum massa dengan detektor ion negatif.

Gambar 4.11 Spektrum massa kristal fraksi C dalam pelarut metanol

Pada detektor ion negatif menunjukkan kemungkinan adanya pecahan fragmen CH_3OH. Hal tersebut dibuktikan dengan selisih antara fragmen m/e 297 dengan fragmen m/e 265 yang bernilai 32. Selisih fragmen m/e 265 dengan fragmen m/e 264 yang bernilai 1 menunjukkan adanya pecahan atom H. Dari data fragmentasi di atas masih belum dapat ditentukan bobot molekul dari isolat. Selain itu, dari kromatogram (dapat dilihat pada lampiran 3) pada panjang gelombang 220 nm menunjukkan banyak puncak yang muncul. Banyaknya puncak tersebut mengindikasikan bahwa ternyata isolat belum murni. Oleh karena itu, isolat perlu dilakukan pemurnian kembali.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat diambil kesimpulan, yaitu:

1. Telah didapat isolat dari fraksi C ekstrak daun *Phoebe declinata* Nees berbentuk kristal, berwarna kekuningan dan tidak berbau sebanyak 26,9 mg. Isolat merupakan senyawa alkaloid dimana isolat menghasilkan warna jingga setelah disemprot pereaksi Dragendorff.
2. Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) menunjukkan bahwa fraksi VII memiliki nilai IC_{50} terendah, yaitu 204.01 μg/ml. Setelah fraksi ini dimurnikan, nilai IC_{50} dari kristal isolat adalah 147,62 μg/ml.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemurnian kembali terhadap kristal isolat.
2. Perlu dilakukan elusidasi struktur terhadap kristal isolat yang telah dimurnikan agar dapat ditentukan struktur kimia dari isolat tersebut.

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

DAFTAR ACUAN

Aditama, T. Y. (2011, Desember 18). *Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.* Dipetik Januari 24, 2012, dari Kementrian Kesehatan Republik Indonesia: http://www.pppl.depkes.go.id/index.php?c=berita&m=fullview&id=417.

Amstrong, D. (2002). *Oxidative stress biomarkers and antioxidant protocols.* New Jersey: Humana Press.

Badarinath, A. V., Rao K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., dan Gnanaprakash K. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International of PharmTech Research,* 2: 1276-1285.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Journal of Nature,* 118: 1199-1200.

Cazes, J. dan Scott, R. P. W. (2002). *Chromatography Theory.* New York: Marcel Dekker.

Ciesla, L. dan Waksmundzka-Hajnos, M. (2009). Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *Journal of Chromatography A,* 1216: 1035-1052.

Costa, et al. (2010). Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. *Journal of Natural Product*, 73: 1180-1183.

Depkes. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid 6.* Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Depkes. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.* Jakarta: Departemen Kesehatan RI.

Gressler, V., Moura, S., Flores, A. F. C., Flores, D. C., Colepicolo, P., dan Pinto, E. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of 2-(4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine and 1-carboxamidino-1H-pyrazole derivatives. *Journal Sociedade Brasileira de Química*, Vol. 21, No. 8, 1477-1483.

Gritter, R.J., Bobbits J.M., dan Schwarting, A.E. (1987). *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi), Edisi ke-2, diterjemahkan oleh K. Padmawinata.* Bandung: Penerbit ITB.

Handa, S. (2008). An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. Dalam S. K. Handa, *Extraction Technologies for*

Isolasi dan..., Ryan Adi Candra, FMIPA UI, 2012

Medicinal and Aromatic Plants (hal. 22-24). Trieste: International Centre for Science and High Technology.

Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia II, (Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerjemah).* Bandung: ITB.

Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia.* Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.

Harmita. (2007). *Buku Elusidasi Struktur.* Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.

Harto. (2012, Januari). Penjelasan Phoebe declinata. (R. A. Candra, Pewawancara)

Heyne. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia Jilid II, (Badan Litbang Kehutanan Jakarta, Penerjemah).* Jakarta: Badan Litbang Kehutanan Jakarta.

Ikan, R. (1969). *Natural Product: A Laboratory Guide.* London, New York, dan San Fransisko: Akademic Press.

Kosela, S. (2010). *Cara Mudah dan Sederhana Penentuan Struktur Molekul Berdasarkan Spektra Data (NMR, MASS, IR, UV).* Jakarta: Lembaga Penerbit Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia.

Manoi, F. (2006). Pengaruh cara pengeringan terhadap mutu simplisia sambiloto. *Buletin Littro*, Vol. XVII No.1, 1-5.

Margono, S. A. dan Zandrato, R. N. (2006). Sintesis diasetil gamavuton-0 dengan menggunakan asetil kloroda sebagai acylating agent. *Majalah Farmasi Indonesia*, 17 (1), 25 – 31.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 26(2): 211-219.

Mukhtar, M.P., Aziz, A.N., Thomas, N.F., Hadi, A.H.A., Litaudon, Marc., dan Awang, K. (2009). Grandine A, a New proaporphine alkaloid from the bark of *Phoebe grandis*. *Molecules*, 14: 1227-1233.

O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., dan Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, 1-17.

Poole, C. (2003). Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000: 963-984.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., dan Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidant in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113: 189-207.

Saputro, A. A. (2009). *Optimasi Sintesis Senyawa analog Kurkumin 1,3-Bis-(4-Hidroksi-3,5-Dimetilbenziliden) Urea pada Rentang pH 3-4.* Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Semwal, D.K., Rawat, U., dan Singh, G. J. P. (2008). Further aporphine alkaloids from *Phoebe lanceolata*. *Molbank*, M581: 1-5.

Sherma, J., dan Fried, B. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography edisi ketiga.* New York: Marcell Dekker.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C., dan Morrill, T.C. . (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds (5th edition).* New York: John Wiley and Sons.

Singh, J. (2008). Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. Dalam S. K. Handa, *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* (hal. 81). Trieste: International Centre for Science and High Technology.

Spasova, M., Philipov, S., Nikolaeva-Glomb, L., Galabov, A. S., dan Milkova, Ts. (2008). Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their antioxidative and antiviral activities. *Journal of Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16: 7457-7461.

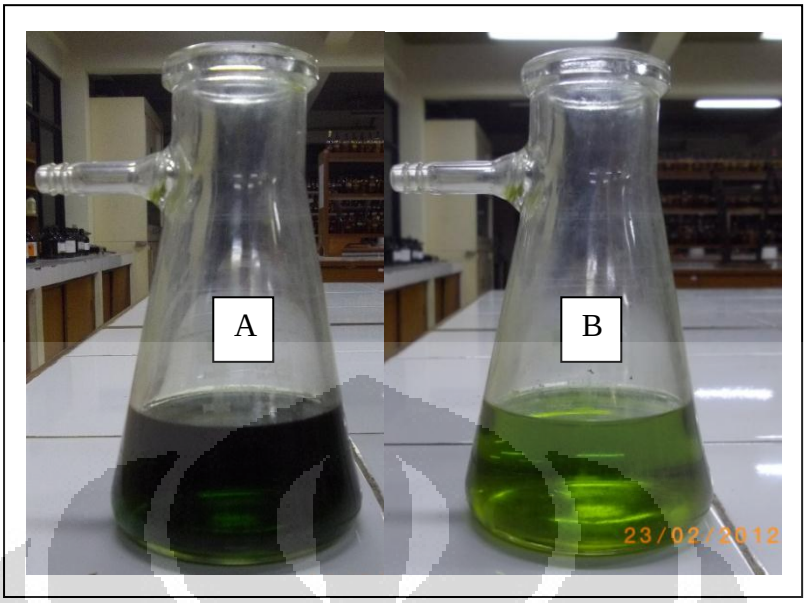
Stahl, E. (1969). *Apparatus and General Techniques in TLC. Dalam: Stahl, E. (ed). Thin-layer Chromatography a Laboratory Handbook. Terjemahan dari Dunnschicht Chromatographie, oleh Ashworth, M.R.F.* Berlin: Springer-Verlag.

Supratman, U. (2010). *Elusidasi Struktur Senyawa Organik (metode spektroskopi untuk penentuan struktur senyawa organik).* Bandung: Widya Padjadjaran.

Vogel, A. I. (1956). *A Text-book of Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Analysis (3rd edition).* London: Longman Group Limited.

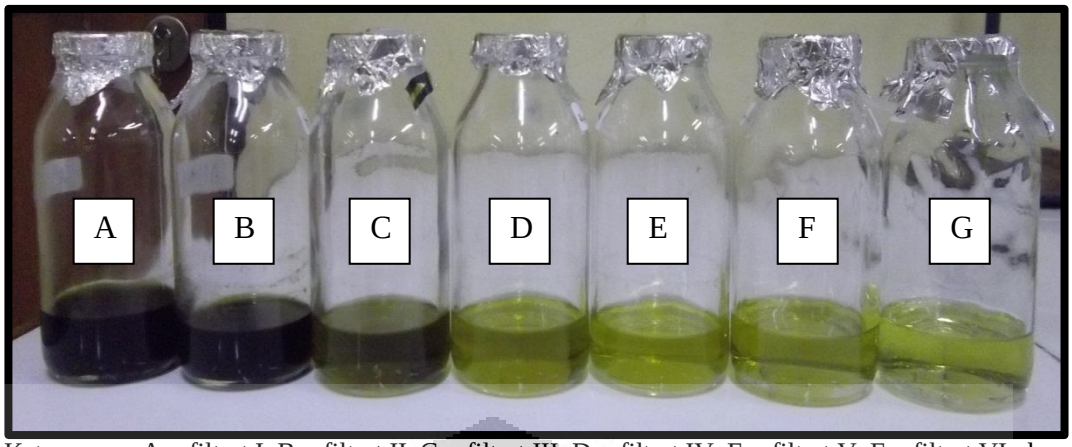
Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. dan Kowalska, T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.* Boca Raton: CRC Press.

GAMBAR



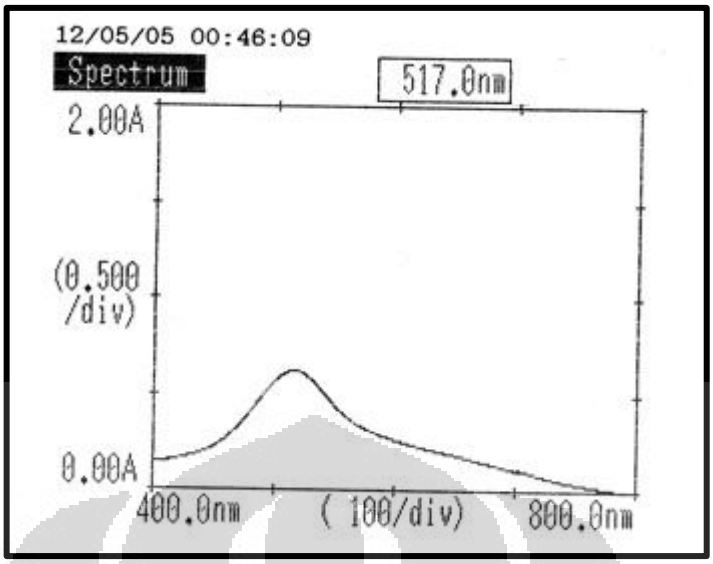
Keterangan : A = Filtrat maserasi pertama dan B = Filtrat maserasi keenam.

Gambar 4.1 Perubahan warna filtrat hasil maserasi



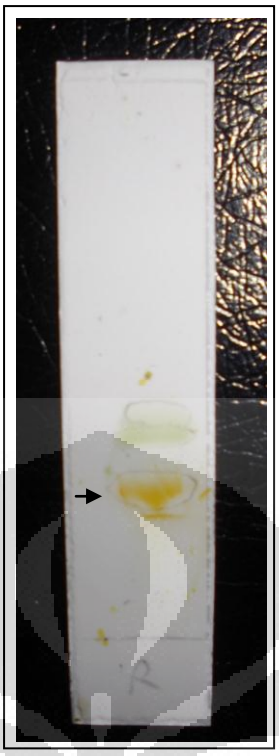
Keterangan: A = filtrat I, B = filtrat II, C = filtrat III, D = filtrat IV, E = filtrat V, F = filtrat VI, dan G = filtrat VII.

Gambar 4.2 Perubahan warna filtrat hasil refluks



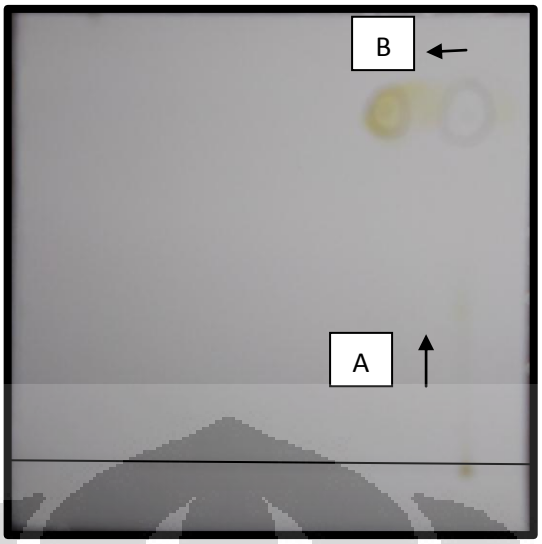
Gambar 4.5 Spektrum DPPH pada panjang gelombang maksimum

Gambar 4.6 Hasil pemisahan fraksi VII dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20 menggunakan kromatografi lapis tipis



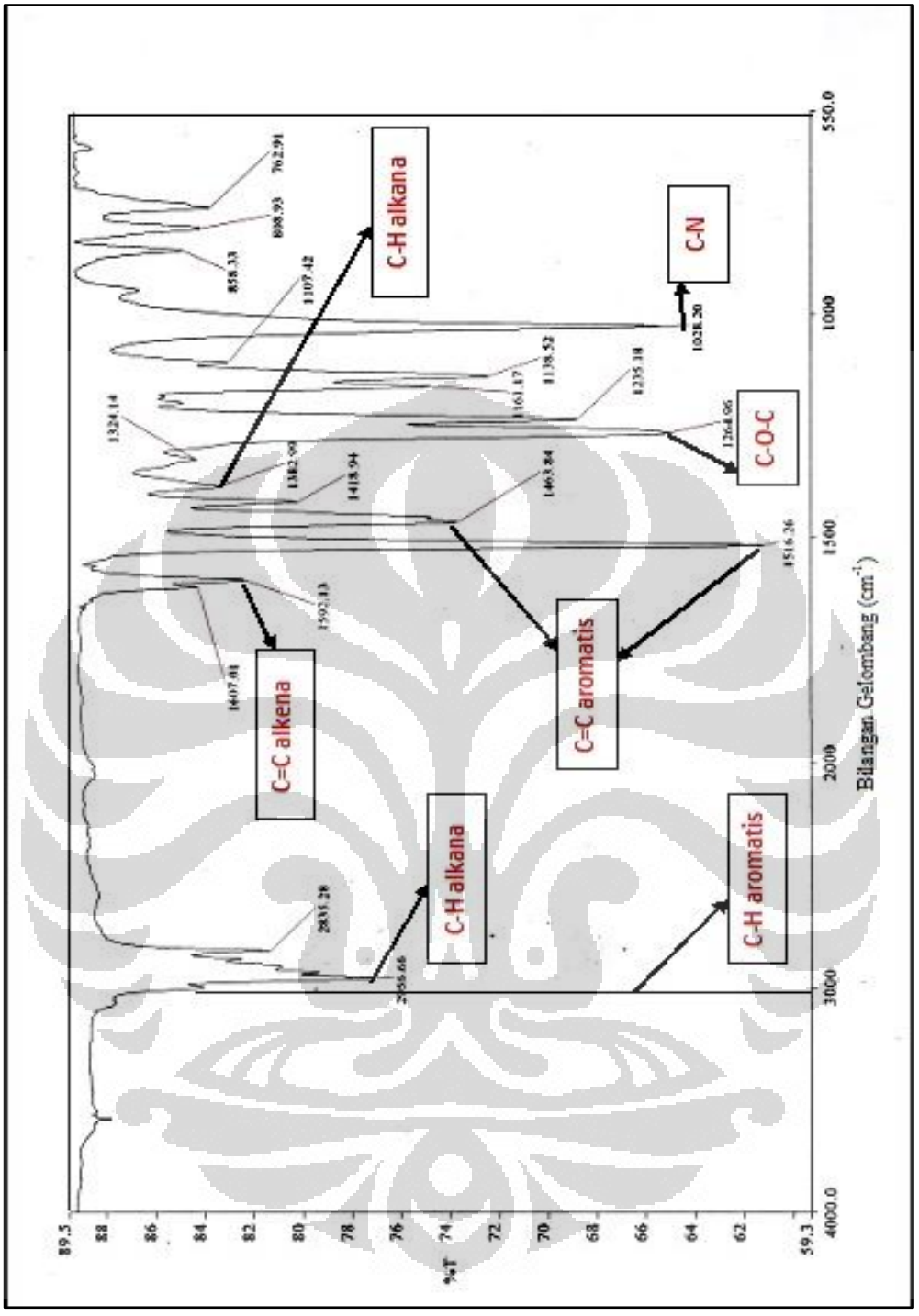
Keterangan : Bercak warna jingga menunjukkan fraksi C positif mengandung alkaloid

Gambar 4.7 Hasil pemisahan fraksi C dengan eluen n-heksana-etil asetat 80:20 menggunakan kromatografi lapis tipis



Keterangan: A = arah elusi I menggunakan eluen diklorometana-metanol dengan perbandingan 96:4; B = arah elusi II menggunakan eluen n-heksana-etil asetat dengan perbandingan 90:10

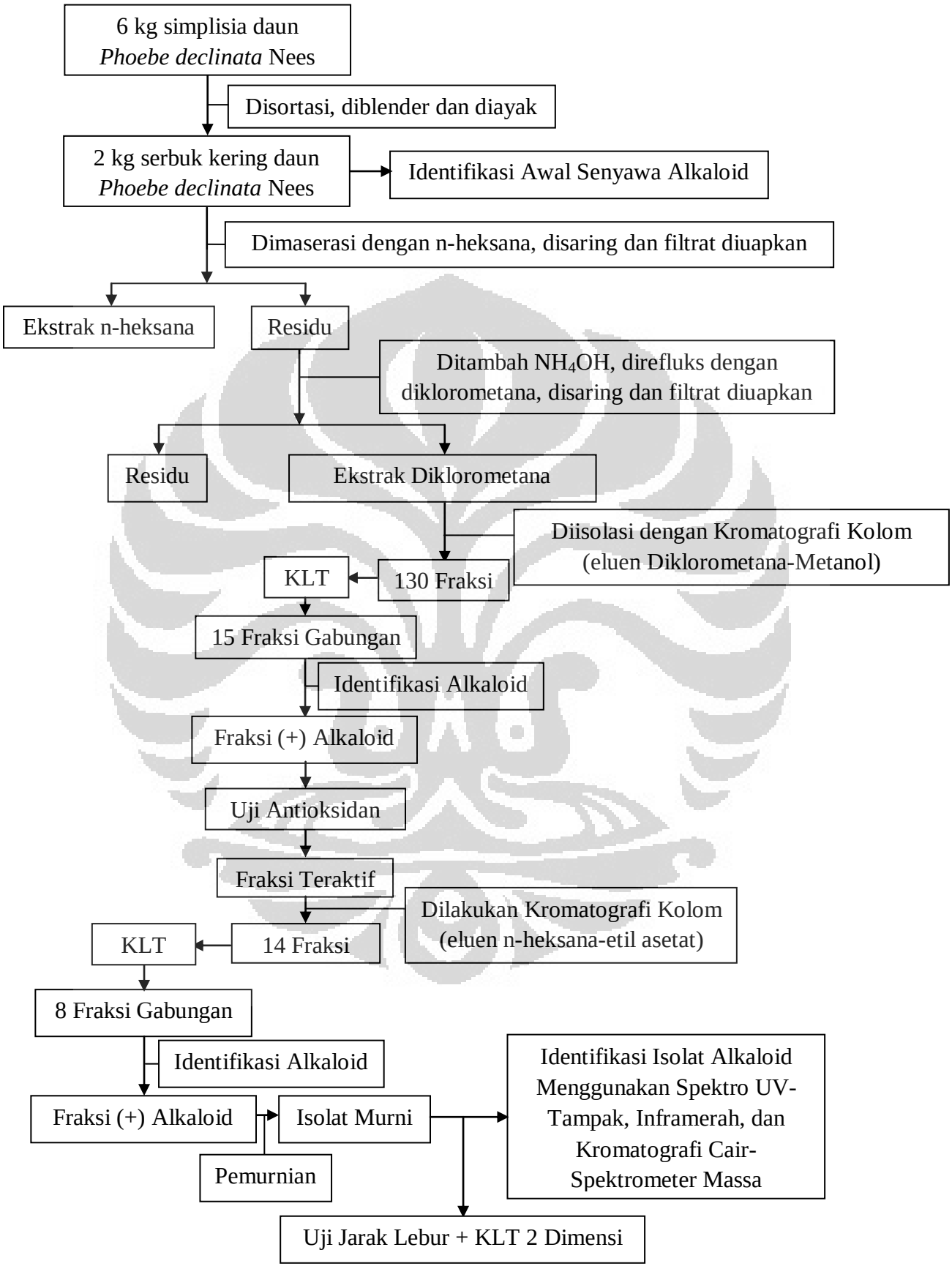
Gambar 4.9 Hasil uji kemurnian dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi



Gambar 4.10 Spektrum serapan inframerah kristal fraksi C dalam pelarut $CHCl_3$

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja



Lampiran 2. Surat Determinasi Tumbuhan

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

Bogor, 15 Juni 2012

No. : [illegible] /IPH.3.02/KS/VI/2012
Lampiran : -
Hal : Keterangan determinasi

Kepada Yth.:
Ryan Adi Candra
NPM. 0806328051
Fakultas Farmasi
Universitas Indonesia
Depok

Dengan hormat,

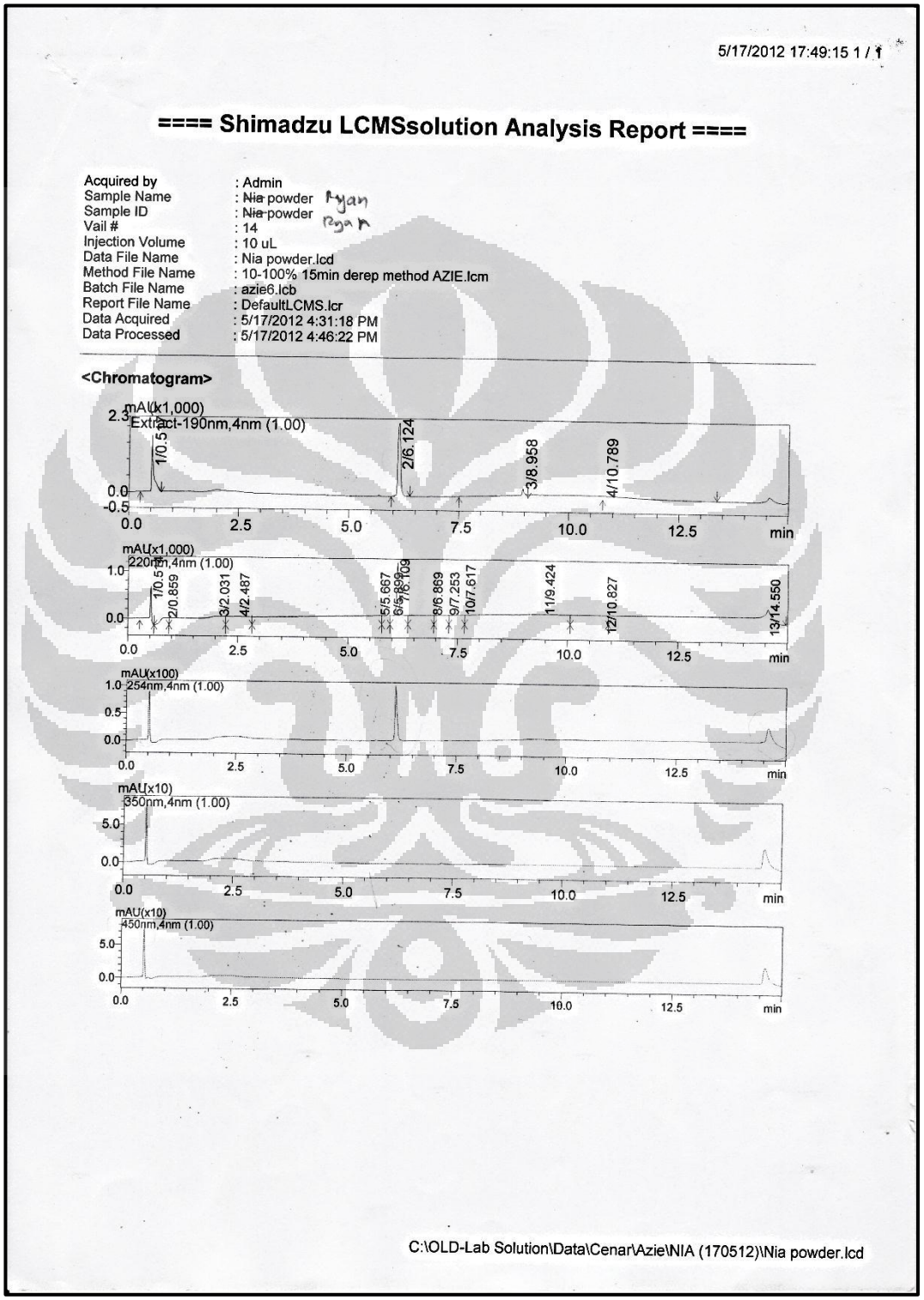
Dengan ini kami sampaikan bahwa spesimen tumbuhan yang diambil dari Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, LIPI adalah dari jenis daun ***Phoebe declinata*** **(Blume) Nees,** yang merupakan anggota Suku Lauraceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

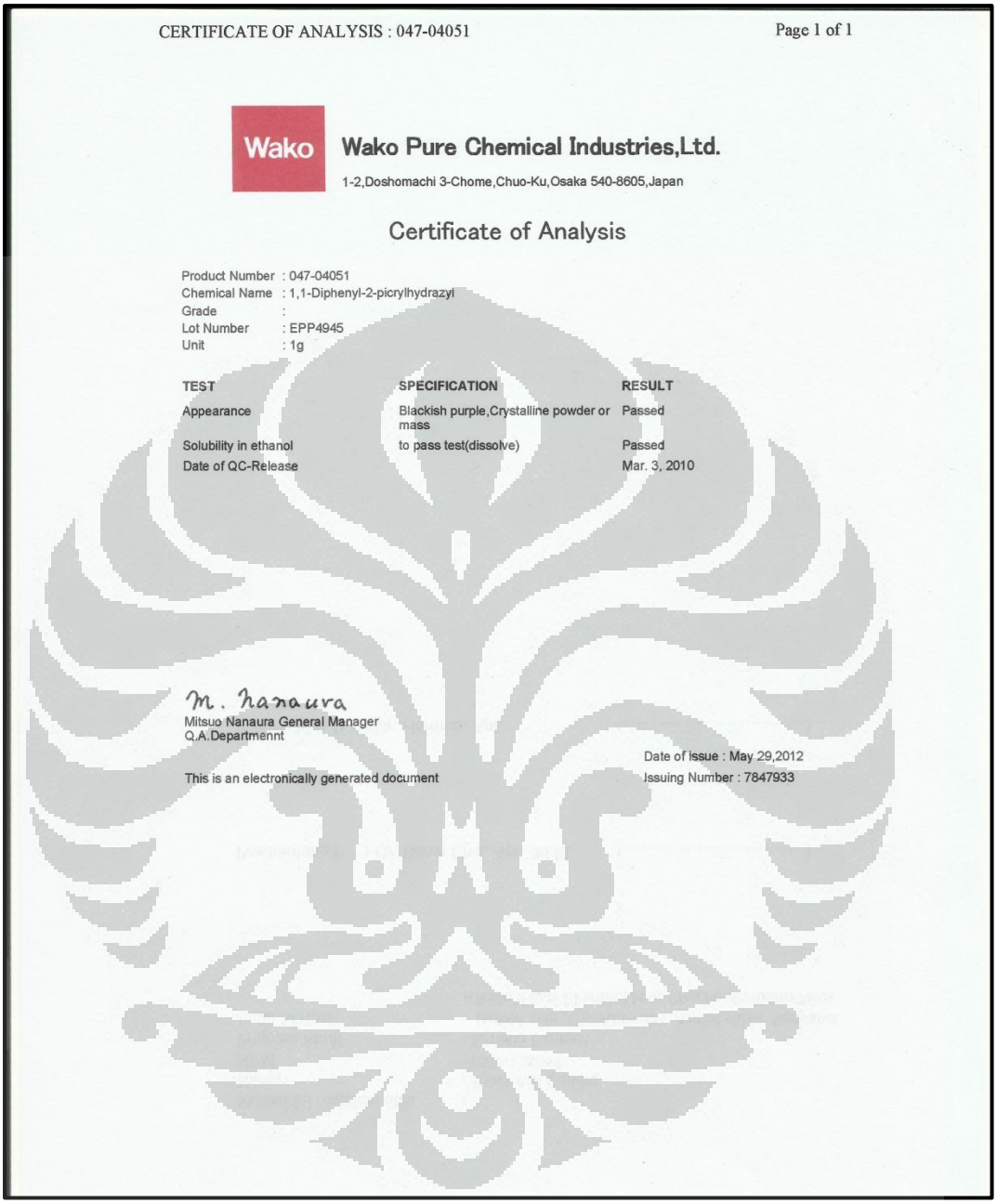
a.n. KEPALA
Kepala Bidang Konservasi Ex-situ

Dr. Joko Ridho Witono
NIP. 197010091994031004

Lampiran 3. Kromatogram Kristal Fraksi C dalam Pelarut Metanol Menggunakan Alat Kromatografi Cair-Spektrometri Massa, Kolom C-18 2,5 µm (2,1 x 50 mm) kecepatan alir 0,5 mL/menit.



Lampiran 4. Sertifikat Analisis 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

M. Nanaura
Mitsuo Nanaura General Manager
Q.A.Departmennt

This is an electronically generated document

Date of issue : May 29,2012
Issuing Number : 7847933

Lampiran 5. Sertifikat Analisis Boldin

SIGMA-ALDRICH®

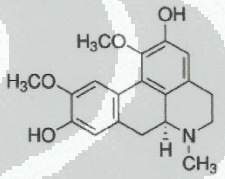
sigma-aldrich.com

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 Brown-Yellow to Brown-Yellow and Faint Brown to Brown	Faint Yellow to Yellow and	Light Brown-Yellow
Solubility (Turbidity) 50 mg/mL, EtOH	Clear	Clear
Solvent Content (by GC) Isopropanol	≤ 1 %	0 %
% Purity (TLC)	≥ 98	99

Rodney Burbach

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