



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI  
EKSTRAK DAUN CABE RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA  
DARI FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

**YUNITA  
0806328202**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI  
EKSTRAK DAUN CABE RAWIT (*Capsicum frutescens* L.) DAN  
IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA  
DARI FRAKSI TERAKTIF**

**SKRIPSI**

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

**YUNITA  
0806328202**

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


ii

## **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, 28 Juni 2012




Yunita

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : Yunita  
NPM : 0806328202  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 28 Juni 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Yunita  
NPM : 0806328202  
Program Studi : Farmasi S1 Reguler  
Judul Sripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak  
Daun Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.) dan  
Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif

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. Katrin, M. S (  )  
Penguji I : Dr. Berna Elya, M. Si (  )  
Penguji II : Drs. Hayun, M. Si (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus yang telah membimbing penulis hingga berada di tahun keempat perkuliahan dan menyelesaikan penelitian dalam bidang fitokimia ini. Penulis mensyukuri hikmat pengetahuan dan kesadaran iman yang diberikan-Nya sehingga dapat mempertanggungjawabkan penelitian yang telah dilakukan selama bulan Januari hingga Juni 2012 ini.

Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis menyadari tanpa adanya bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Ibu Dr. Katrin, MS selaku pembimbing I yang telah menyediakan kasih dalam bentuk pemberian waktu, pikiran, tenaga, ilmu, perhatian, dan dukungan moril kepada penulis sebelum penelitian dimulai hingga penelitian berakhir dan selama proses penyusunan skripsi.
- (2) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, Apt., M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (3) Ibu Dr. Berna Elya, Apt., M.Si. selaku Koordinator Pendidikan Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan berbagai pengarahan serta diskusi yang hangat.
- (4) Bapak Dr. Abdul Mun'im selaku Pembimbing Akademis yang telah membimbing penulis selama empat tahun perkuliahan dan juga memberikan berbagai pengarahan, khususnya dalam penelitian ini.
- (5) Mbak Zakiyah Ulfa dan Mas Agus selaku laboran dan teknisi laboratorium Fitokimia yang telah membantu proses penelitian sehingga berjalan dengan lancar.
- (6) Seluruh staf dan dewan pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan, ilmu, dan dukungan moril yang dibagikan dalam perkuliahan

sehingga penulis memahami gambaran tentang dunia kerja yang sebenarnya.

- (7) Kak Putu, Kak Atika, Kartika Febriani, dan Ali Muhamad Shodiq yang telah memberikan dukungan dan perhatian selama proses penelitian.
- (8) Mama, Bapak, dan Daniel yang selalu mencurahkan perhatian dalam kesibukan penelitian ini dan mendukung dalam doa.
- (9) Kak Abigail Bakkula, Aditya Retno, Evennia, Grace Natalia Daryana, Lidya Romito Tambunan, Melda Silvia Sari Silalahi, Patricia Simon, Tan Jenifer Laurensius, dan Vany Priskila yang telah menjadi teman KTB yang baik dalam kehidupan saya.
- (10) Tris Febriana Chantika dan Yiska Nathasa Situmorang yang telah menjadi sahabat dan memberikan semangat dalam kesibukan penelitian masing-masing.
- (11) Enda Kristiana Ivena, Diana Wangsa, dan Indra Tanuwijaya yang telah memberikan kasih dan doa selama pelayanan di gereja GKI Samanhudi.

Kiranya Tuhan selalu memberkati dalam tiap segi kehidupan. Akhir kata, saya berharap semoga skripsi ini bermanfaat di masa mendatang serta menjadi bagian yang memperkaya bidang ilmu kefarmasian.

Penulis  
2012

## HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

---

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

Nama : Yunita  
NPM : 0806328202  
Program Studi : Sarjana S1 Reguler  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

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

“Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif”

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 28 Juni 2012  
Yang menyatakan



(Yunita)



## ABSTRAK

Nama : Yunita  
Program Studi : Reguler  
Judul : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.) dan Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi Teraktif

Antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah atau menunda waktu timbulnya penyakit degeneratif melalui mekanisme penghambatan proses oksidasi yang menyebabkan penyakit kronik dan menunda waktu terjadinya *aging*. Reaksi antara antioksidan dengan radikal bebas dapat menghentikan reaksi berantai radikal bebas sehingga mencegah pembentukan senyawa radikal baru. Buah cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.) telah diketahui aktivitas antioksidannya melalui penelitian-penelitian ilmiah. Senyawa beraktivitas antioksidan pada buah cabe rawit dapat tersebar pula di bagian daun. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi ekstrak daun cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.) dan mengidentifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif. Ekstraksi daun *Capsicum frutescens* L. dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Aktivitas antioksidan daun *Capsicum frutescens* L. diuji dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol menunjukkan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut 160,81; 105,08 dan 48,28  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak metanol sebagai ekstrak teraktif kemudian difraksinasi dengan kromatografi kolom dipercepat. Fraksi teraktif dari ekstrak metanol adalah fraksi keenam ( $CM_6$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 72,07  $\mu\text{g/mL}$ . Golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi teraktif ini adalah flavonoid dan glikon.

Kata Kunci : DPPH, antioksidan, *Capsicum frutescens* L.  
xvi + 77 halaman : 15 gambar; 5 tabel; 3 lampiran  
Daftar Acuan : 33 (1958-2011)

## ABSTRACT

Name : Yunita  
Program Study : Reguler  
Title : Antioxidant Activity Test of Hot Short Pepper Leaves (*Capsicum frutescens* L.) Extracts and Extract Fractions and Identification of Compounds Group of The Most Active Fraction

Antioxidant has important role in preventing or delaying degenerative disease by inhibiting oxidation that causes chronic disease and delaying aging. Reaction of antioxidant and free radicals stop the chain reaction of free radicals so it prevents formation of new radicals. Antioxidant activity of hot short pepper fruit (*Capsicum frutescens* L.) has been known by scientific research. Antioxidant compounds of hot short pepper fruit may be found in its leaves. This research aims to test the antioxidant activity of hot short pepper leaves (*Capsicum frutescens* L.) extracts and extract fractions and identify compounds group of the most active fraction. Extraction method of *Capsicum frutescens* L. leaves is maceration using n-hexane, ethyl acetate, and methanol solvent. Antioxidant activity of *Capsicum frutescens* L. leaves tested by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. Result of antioxidant activity test in extract of n-hexane, ethyl acetate, and methanol show that  $IC_{50}$  value are 160,81; 105,08 and 48,28  $\mu\text{g/mL}$ . Most active extract or methanol extract then fractionized by accelerated column chromatography. The most active fraction of methanol extract is sixth fraction ( $CM_6$ ) which has  $IC_{50}$  value 72,07  $\mu\text{g/mL}$ . Groups of compounds contained in the most active fraction are flavonoid and glycon.

Keywords : DPPH, antioxidant, *Capsicum frutescens* L.  
xvi + 77 pages : 15 pictures; 5 tables; 3 appendixes  
Bibliography : 33 (1958-2011)

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Ruang Lingkup.....	3
1.4 Jenis Penelitian .....	4
1.5 Tujuan Penelitian.....	4
1.6 Manfaat Penelitian.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Capsicum frutescens</i> L.....	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Nama Lain .....	5
2.1.3 Deskripsi Tanaman .....	5
2.1.4 Kandungan Kimia.....	7
2.1.5 Khasiat dan Penggunaan.....	8
2.1.6 Data Penelitian Antioksidan dari Buah Cabe Rawit.....	8
2.2 Simplisia.....	9
2.3 Metode Ekstraksi.....	10
2.3.1 Cara Dingin.....	11
2.3.1.1 Maserasi.....	11
2.3.1.2 Perkolasi .....	11
2.3.2 Cara Panas .....	11
2.3.2.1 Refluks.....	11
2.3.2.2 Soxhlet.....	11
2.3.2.3 Digesti.....	12
2.3.2.4 Infus .....	12
2.3.2.5 Dekok.....	12
2.4. Spektrofotometer UV-Vis.....	12
2.5 Fraksinasi.....	14
2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis .....	14
2.5.1.1 Fase Diam .....	15
2.5.1.2 Fase Gerak .....	16
2.5.1.3 Penyiapan dan Penotolan Sampel.....	16
2.5.1.4 Pengembangan.....	17

2.5.1.5 Metode Deteksi.....	17
2.5.2 Kromatografi Kolom .....	18
2.6 Penapisan Fitokimia.....	19
2.6.1 Alkaloid .....	19
2.6.2 Flavonoid .....	20
2.6.3 Terpenoid.....	20
2.6.4 Tanin.....	20
2.6.5 Saponin .....	21
2.6.6 Glikosida.....	21
2.6.7 Kuinon dan Antrakuinon .....	21
2.7 Radikal Bebas.....	22
2.8 Antioksidan.....	24
2.8.1 Antioksidan Sintetik .....	24
2.8.2 Antioksidan Alami.....	24
2.8.3 Metode Uji Aktivitas Antioksidan secara In Vitro .....	25
2.8.3.1 Metode Peredaman Radikal DPPH.....	25
2.8.3.2 Metode Reducing Power .....	26
2.8.3.3 Metode Uji Kapasitas Peredaman Radikal Kation ABTS ...	27
2.8.3.4 Metode Uji Kapasitas Penyerapan Radikal Oksigen .....	28
2.8.3.5 Metode Uji Aktivitas Penghambatan Radikal Superoksida .....	28
2.8.3.6 Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil .....	29
<b>3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
3.1 Tempat dan Waktu.....	30
3.2 Alat.....	30
3.3 Bahan.....	30
3.3.1 Bahan Uji .....	30
3.3.2 Bahan Kimia .....	30
3.4 Cara Kerja.....	31
3.4.1 Penyiapan Simplisia .....	31
3.4.2 Ekstraksi Simplisia .....	32
3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan secara Kualitatif.....	33
3.4.4 Uji Aktivitas Antioksidan secara Kuantitatif .....	33
3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH .....	34
3.4.4.2 Optimasi Panjang Gelombang DPPH .....	34
3.4.4.3 Pembuatan Larutan Blanko .....	34
3.4.4.4 Persiapan Larutan Uji.....	34
3.4.4.5 Penghitungan Nilai IC <sub>50</sub> .....	35
3.4.5 Fraksinasi Ekstrak Aktif .....	36
3.4.6 Penapisan Fitokimia .....	37
3.4.6.1 Penapisan Fitokimia dengan Pereaksi Kimia .....	37
3.4.6.2 Penapisan Fitokimia secara KLT.....	39
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>41</b>
4.1 Penyiapan Bahan .....	41
4.2 Ekstraksi Simplisia .....	41
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak.....	42

4.4 Fraksinasi Ekstrak Aktif .....	44
4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Ekstrak.....	46
4.6 Penapisan Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Ekstrak .....	48
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>53</b>
5.1 Kesimpulan.....	53
5.2 Saran .....	53
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>54</b>

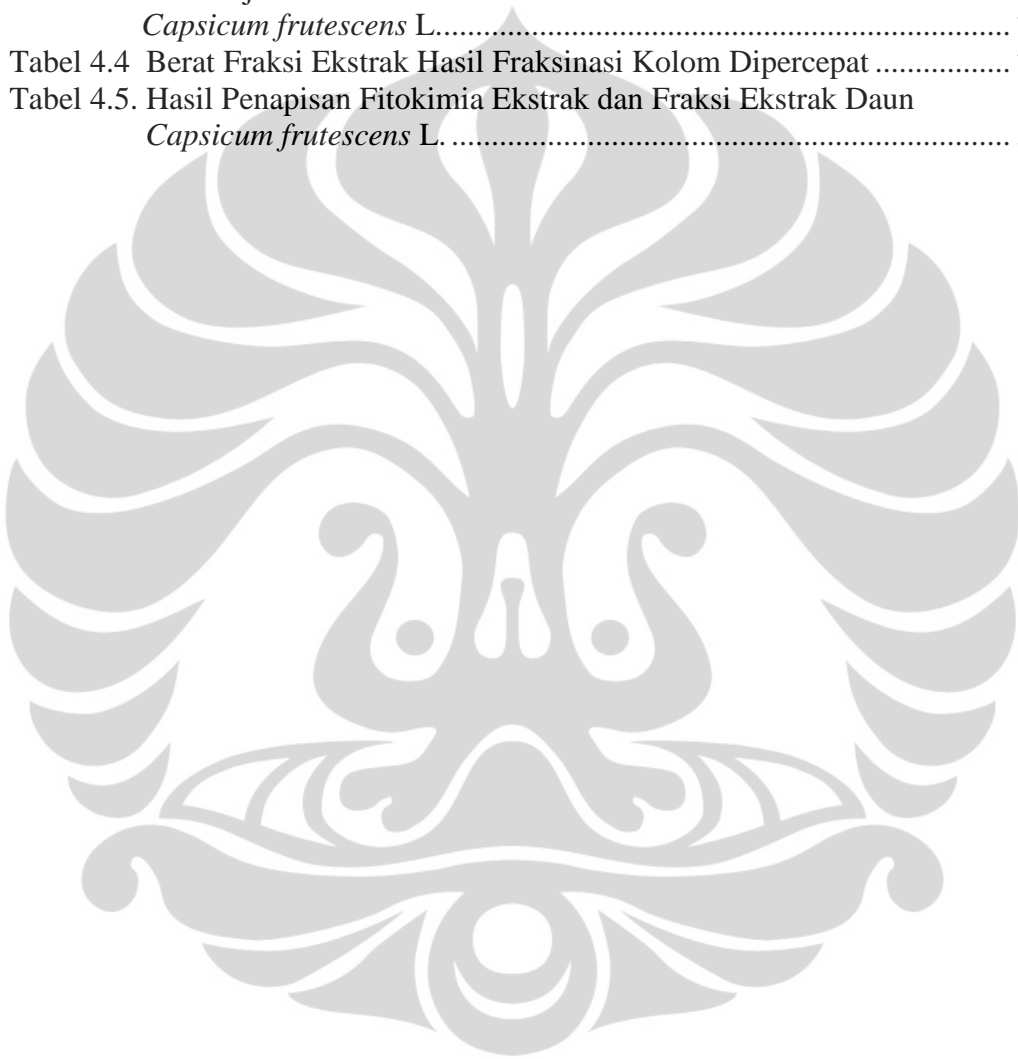


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	6
Gambar 2.2 Struktur Kimia (a) Kapsaisin, (b) Dihidro-kapsaisin, dan (c) Nordihidro-kapsaisin .....	58
Gambar 2.3 Struktur Radikal DPPH .....	26
Gambar 2.4 Struktur ABTS dan Radikal Kation ABTS .....	27
Gambar 4.1 Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Setelah Disemprot DPPH .....	59
Gambar 4.2 Mekanisme Penangkapan Radikal DPPH oleh Antioksidan Berupa Donasi Proton .....	43
Gambar 4.3 Profil KLT Fraksi Ekstrak Metanol dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Penampak Bercak Sinar UV 366 nm .....	60
Gambar 4.4 Hasil Uji Kualitatif Sembilan Fraksi Ekstrak Gabungan .....	61
Gambar 4.5 Spektrum Serapan Larutan DPPH pada Panjang Gelombang Optimum (517 nm) .....	62
Gambar 4.6 Pola Kromatogram Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen n-Heksana-Etil Asetat 3:7 .....	63
Gambar 4.7 Hasil Identifikasi Golongan Alkaloid Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen Diklormetan-Metanol 85:15 .....	64
Gambar 4.8 Hasil Identifikasi Golongan Flavonoid Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen BAW 4:1:5 .....	65
Gambar 4.9 Hasil Identifikasi Golongan Terpen Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen n-Heksana-Etil Asetat 7:3 .....	66
Gambar 4.10 Hasil Identifikasi Golongan Fenol Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen BAW 4:1:5 .....	67
Gambar 4.11 Hasil Identifikasi Golongan Saponin Fraksi CM <sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F <sub>254</sub> dan Eluen BAW 5:1:4 .....	68

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Data Rendemen Ekstrak Daun <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	70
Tabel 4.2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	70
Tabel 4.3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	71
Tabel 4.4. Berat Fraksi Ekstrak Hasil Fraksinasi Kolom Dipercepat .....	72
Tabel 4.5. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun <i>Capsicum frutescens</i> L. ....	52



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi <i>Capsicum frutescens</i> L.....	74
Lampiran 2. Bagan Ekstraksi dan Fraksinasi Daun <i>Capsicum frutescens</i> L.....	75
Lampiran 3. Sertifikat Analisis DPPH.....	77





# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Sejalan dengan perkembangan zaman, aktivitas manusia terus mengalami perkembangan. Di tengah dinamika kehidupan yang dijalani manusia, tak dapat dielakkan adanya tantangan dan hambatan yang dapat mengganggu produktivitas manusia, antara lain yang disebabkan oleh penyakit. Penyakit ini sendiri memicu sistem homeostatis tubuh di mana tubuh akan berupaya mengembalikan ke kondisi normal sehingga kembali menjadi sehat. Kebutuhan untuk mengatasi penyakit juga dapat diperoleh melalui penggunaan obat sehingga pengembangan obat masih perlu dilakukan seiring dengan kebutuhan akan berbagai efek terapeutik yang diperlukan masyarakat.

Preparasi medisinal yang berasal dari sumber alam, khususnya dari tanaman telah mengalami perkembangan pesat. Keberadaan tanaman meliputi sebagian besar proporsi populasi dunia sehingga tanaman menjadi sumber pengobatan utama di tengah perkembangan dunia, meskipun selama awal abad ke-20 dunia kimia farmasi menunjukkan kemampuannya dalam mensintesis banyak variasi molekul obat, baik untuk penyakit yang sebelumnya tak dapat disembuhkan dan atau penyakit yang diobati seumur hidup. Obat yang disintesis secara kimia menjadi populer dan menempati posisi basis industri farmasetika. Setelah kurun waktu tertentu, obat sintetik ini ditemukan memiliki efek samping serta menyebabkan toksisitas. Seiring dengan perkembangan berbagai penyakit, seperti penyakit infeksi, kelainan proliferasi seperti kanker, serta adanya peristiwa resistensi multiobat dalam mikroorganisme patogen mendorong minat penelitian akan molekul obat potensial dari tanaman (Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil dan Mohammad Owais, 2006).

Kehidupan manusia sehari-hari tak dapat dielakkan dari kehadiran radikal bebas. Radikal bebas ini dapat berada di udara lingkungan sekitar tempat tinggal manusia. Secara alamiah radikal bebas dan oksidan terbentuk di dalam tubuh melalui proses metabolisme normal maupun fagositosis yang melibatkan sel-sel radang. Stres oksidatif jaringan menyebabkan proses penuaan sel tubuh atau

*aging*. Akibatnya, pada beberapa bagian kulit tampak warna lebih gelap, timbul kerutan yang dalam akibat penebalan epidermis kulit dan terasa kasar. Kehadiran radikal bebas dari luar tubuh, seperti cahaya ultraviolet mengakselerasi proses ini, dinamakan sebagai *photoaging*, sehingga *aging* dapat terjadi pada usia yang relatif muda.

Antioksidan memiliki peranan penting, yaitu memberikan perlindungan bagi keseluruhan tubuh terhadap stres oksidatif yang terjadi pada sel organ dalam maupun kulit tubuh. Kulit yang terlindungi akan memiliki kualitas yang lebih baik dan memberikan kenyamanan estetika bagi pribadi yang bersangkutan. J. S. Weiss et al (1988) melaporkan bahwa penggunaan vitamin A dapat menghilangkan kerutan dan mengubah kulit menjadi tampak lebih muda pada kulit yang mengalami *photoaging* (Takeo Mitsui, 1997).

Penggunaan herbal untuk khasiat antioksidan telah banyak dilakukan oleh berbagai peneliti. Berbagai penelitian pernah dilakukan untuk menguji aktivitas antioksidan dari buah cabe, seperti cabe merah (*Capsicum annum*, L) dan cabe rawit (*C. frutescens* L.). Perucka dan Materska (2000) menemukan bahwa fraksi flavonoid dan kapsaisinoid dalam buah segar *Capsicum annum* L. memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan nilai persen inhibisi sampel uji dalam sistem beta karoten, asam linoleat dan hidrogen peroksida, dibandingkan terhadap kontrol. Selain itu, Ganiyu Oboh dan Omodesola O. Ogunraku (2009) menyatakan bahwa daging buah dan biji *C. frutescens* var. *abbreviatum* memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan percobaan *in vitro* dan *in vivo*. Aktivitas antioksidan ini diukur berdasarkan jumlah malondialdehida (MDA) di otak tikus. Tikus yang telah diberi diet *C. frutescens* var. *abbreviatum* dan mendapat injeksi intra peritoneal siklofosfamida (75 mg/ kg BB) menunjukkan tingkat MDA yang lebih rendah dibandingkan tikus kontrol.

Berbagai penelitian ilmiah yang menguji aktivitas antioksidan di dalam buah cabe telah dilakukan dalam beberapa variabel uji, seperti varietas dan tingkat kematangan. Perucka dan Materska (2000) membandingkan aktivitas antioksidan senyawa kapsaisin dan dihidrokapsaisin terhadap fraksi flavonoid buah *Capsicum annum* L., var. *Cyklon* dan *Bronowicka Ostra* pada tahap yang belum matang (berwarna hijau) dan yang matang (berwarna merah). Hal ini menyebabkan

informasi aktivitas antioksidan buah cabe rawit berkembang pesat. Namun, bagian-bagian lain dari tanaman cabe rawit belum diteliti secara mendalam, khususnya bagian daunnya. Berdasarkan penelusuran literatur yang dilakukan, informasi serta penelitian mengenai daun cabe rawit sangat sedikit. Dalam upaya pemanfaatan daun yang belum digunakan secara maksimal oleh masyarakat, maka masih diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap daun ini. Tanaman cabe rawit sendiri merupakan tanaman yang mudah dicari dan dapat dibudidayakan dengan syarat tertentu. Hal ini memudahkan proses penelitian yang terkadang membutuhkan simplisia dalam jumlah banyak. Senyawa kimia beraktivitas antioksidan yang terkandung di dalam buah cabe rawit dapat tersebar pula di bagian tanaman lainnya, yaitu daun yang rasa dan baunya tidak sepedas dan sehangat buahnya. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi ekstrak daun cabe rawit (*C. frutescens* L.) menggunakan metode peredaman radikal DPPH. Melalui penelitian ini, diharapkan dapat ditemukan sumber daya antioksidan alam yang potensial dan bermanfaat bagi kualitas kehidupan manusia.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Penelitian uji aktivitas antioksidan pada daun cabe rawit perlu dilakukan dalam upaya pemanfaatan daun yang belum digunakan secara maksimal oleh masyarakat dengan harapan menemukan sumber daya antioksidan alam, dari daun yang rasa dan baunya tidak sepedas dan sehangat buahnya, yang bermanfaat, khususnya bagi kulit. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang didasarkan atas reduksi elektron ganjil pada radikal DPPH oleh hidrogen senyawa peredam radikal sehingga larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna ungu akan berubah menjadi kuning yang menunjukkan terbentuknya DPP tereduksi atau DPP Hidrazin yang stabil. Golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi ekstrak teraktif diidentifikasi menggunakan pereaksi kimia dan Kromatografi Lapis Tipis.

## **1.3 Ruang Lingkup**

Ruang lingkup penelitian ini adalah fitokimia (biologi farmasi).

#### 1.4 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian tipe eksplorasi.

#### 1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol, dan fraksi ekstrak daun *Capsicum frutescens* L.
- b. Mengidentifikasi golongan senyawa dari fraksi ekstrak daun *Capsicum frutescens* L. yang paling aktif.

#### 1.6 Manfaat Penelitian

- a. Penelitian ilmiah yang dilakukan akan menambah informasi ilmiah mengenai daun cabe rawit yang selama ini belum dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat.
- b. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi ekstrak yang diukur berdasarkan nilai  $IC_{50}$  menjadi parameter kekuatan antioksidan ekstrak dan fraksi ekstrak. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak dan fraksi yang diperoleh dapat menjadi dasar pertimbangan bagi penelitian ilmiah selanjutnya. Fraksi ekstrak teraktif yang telah diketahui golongannya dapat diteliti lebih lanjut melalui pemurnian dalam rangka memperoleh isolat yang memiliki karakteristik dan kekuatan antioksidan tertentu.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Capsicum frutescens* L.

#### 2.1.1 Klasifikasi

Menurut Samuel B. Jones dan Arlene E. Luchsinger (1987), klasifikasi tanaman cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.) adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Subkelas	: Asteridae
Bangsa	: Solanales
Suku	: Solanaceae
Marga	: Capsicum
Jenis	: <i>Capsicum frutescens</i> L.
Sinonim	: <i>Capsicum fastigiatum</i> Blume. <i>Capsicum minimum</i> Roxb.

#### 2.1.2 Nama Lain

*C. frutescens* L. dikenal dengan nama daerah leudeu jarum (Sumatra), cabe rawit (Sunda), lombok rawit (Jawa), cabhi letek (Madura), lada marica (Makasar), dan berbagai nama daerah lainnya. Penggunaan nama nasional Indonesia untuk *C. frutescens* adalah cabe rawit. Nama nasional *C. frutescens* di negara lain, yaitu silleng labuyo (Filipina), phrikkhinu (Thailand) dan nama internasionalnya adalah chilli (Inggris).

#### 2.1.3 Deskripsi Tanaman

Tanaman cabe rawit berupa terna perdu setinggi 50 cm sampai 150 cm, batang berbiku-biku atau bagian atasnya bersudut, tidak berbulu. Daun berbentuk bundar telur sampai lonjong atau bundar telur meruncing, 1 cm sampai 12 cm, tidak berbulu atau 2 sampai 3 bunga letaknya berdekatan. Mahkota bunga berbentuk bintang, berwarna putih, putih kehijauan atau kadang-kadang ungu,

garis tengahnya 1,75 mm sampai 2 mm. Kelopak bunga berbulu dan tidak berbulu, panjang 2 mm sampai 3 mm. Buah tegak kadang-kadang pada tanaman hibrid buah merunduk, berbentuk bulat telur, jorong panjang 0,75 mm sampai 1,50 mm, lebar 2,5 cm sampai 12 cm, buah muda berwarna hijau tua putih kehijauan dan putih, apabila masak berwarna merah terang. Cabe rawit diperbanyak dengan biji.



Keterangan:

- (a) Tanaman *Capsicum frutescens* L.
- (b) Simplisia Kering Daun *Capsicum frutescens* L.
- (c) Tanaman *Capsicum frutescens* L. (tampak dekat)

**Gambar 2.1** *Capsicum frutescens* L.

Dikenal tiga varietas cabe rawit, yakni: (1) cabe rawit atau cengek leutik: buahnya kecil, berdiri tegak pada tangkainya, yang muda berwarna hijau, setelah tua berubah jadi merah; (2) cengek domba atau cengek bodas: buahnya lebih besar dari cengek leutik, yang muda berwarna putih setelah tua berubah jadi jingga; (3) ceplik: buahnya besar, yang muda berwarna hijau setelah tua berubah jadi merah.

Tanaman cabe rawit berasal dari Amerika di daerah tropik. Tumbuh di Pulau Jawa dan daerah lainnya di Indonesia. Di Jawa tumbuh di daratan rendah hingga pegunungan, pada ketinggian tempat 0,5 m sampai 1.250 m di atas permukaan laut. Sering ditanam orang atau tumbuh liar di tepi tegalan, di pekuburan, di desa, dan di hutan yang terbuka.

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

Genus *Capsicum* merupakan sumber utama senyawa fenol (Howard, Talcott, Brenes dan Villalon, 2000). Tanaman cabe sendiri banyak mengandung flavonoid, yang belakangan ini banyak diteliti aktivitas antioksidannya. Senyawa kimia yang terdapat banyak dalam buah cabe rawit adalah vitamin C, vitamin E, beta karoten, dan pigmen karotenoid. Karotenoid seperti kapsantin, kapsorubin, dan kriptokapsin secara khusus terdapat dalam genus ini, mempengaruhi terbentuknya warna merah pada buah dan telah diketahui memiliki kemampuan peredaman radikal bebas yang efektif (Matsufuji, Nakamuro, Chino, dan Takeda, 1998). Menurut Fuwei Li et al. (2009), kapsaisinoid adalah alkaloid yang ditemukan banyak dalam buah *Capsicum* dengan kandungan utama kapsaisin dan dihidrokapsaisin. Struktur kimia kapsaisinoid ditunjukkan pada Gambar 2.2.

Berikut ini senyawa antioksidan yang terdapat dalam bagian-bagian tanaman *C. frutescens* L. (USDA, 2003):

- a. Bagian buah mengandung alanin, asam askorbat, beta karoten, asam kafeat, kampesterol, kapsaisin, kapsantin, hesperidin, histidin, lutein, metionin, mirsen, asam miristat, asam p-kumarat, asam palmitat, asam pentadekanoat, kuersetin, skopoletin, stigmasterol, terpinen-4-ol, tokoferol, triptofan.
- b. Bagian batang mengandung asam klorogenat.
- c. Bagian biji mengandung asam miristat dan asam palmitat.



d. Resin mengandung asam laurat.

#### 2.1.5 Khasiat dan Penggunaan

Menurut J. Lopez-Hernandez, M. J. Oruna-Concha, J. Simal-Lozano, M. J. Gonzalez-Castro, dan M. E. Vazquez-Blanco (1996), kapsaisin dan dihidrokapsaisin merupakan komponen penyusun kapsaisinoid dalam jumlah lebih dari 80% (Perucka dan Materska, 2001). Sifat analgesik kapsaisinoid digunakan dalam produksi sediaan seperti salep ataupun plester untuk mengatasi iritasi, pada reumatik, lumbago, dan lain-lain. Krim kapsaisin mampu mengatasi sakit pada osteoarthritis, pascaneuralgia herpes, dan neuropati diabetik. Penggunaan internal cabe rawit sebagai atonik dispepsia dan flatulensi (Trease dan Evans, 1978).

Govindarajan dan Sathyanarayana (1991) dan Contreras-Padilla dan Yahia (1998) menyatakan bahwa kapsaisinoid dosis rendah dalam diet secara signifikan menurunkan total kolesterol serum, miokardial, dan aorta. Selain itu, kapsaisinoid mempengaruhi metabolisme lemak, yang penting terutama dalam diet kaya lemak dan karbohidrat (Perucka dan Materska, 2001). Menurut Uhl (2000), ketika cabe rawit dimakan, kapsaisin menstimulasi pelepasan endorfin yang menimbulkan perasaan senang. Selain itu, cabe rawit dipercaya meningkatkan sirkulasi serta membantu pencernaan melalui stimulasi saliva dan aliran gastrik (Wiwat Wangcharoen dan Wallaya Morasuk, 2007).

#### 2.1.6 Data Penelitian Antioksidan dari Buah Cabe Rawit

Pada buah tanaman bermarga sama, yaitu *Capsicum annum*, L aktivitas antioksidan ditunjukkan senyawa kapsaisinoid dan flavonoid. Aktivitas antioksidan kapsaisinoid dan flavonoid yang lebih tinggi dimiliki buah yang berada dalam tingkat kematangan lebih tinggi. Tingkat kematangan buah yang diuji dalam penelitian ini dibedakan berdasarkan warnanya, yaitu buah berwarna hijau kecil, hijau, dan merah (Perucka dan Materska, 2000).

Penelitian yang berkaitan dengan aktivitas antioksidan buah *C. frutescens* L. sendiri telah banyak dilakukan. Saidu A. N dan Garba R. (2011) melakukan analisa statistik yang menunjukkan bahwa ada hubungan linear yang positif dan kuat antara jumlah total fenol dan aktivitas antioksidan, maka aktivitas



antioksidan dalam cabe sebagian besar disebabkan komponen fenol. Studi belakangan ini menyatakan bahwa aktivitas antioksidan berkorelasi dengan jumlah gugus hidroksil. Sifat redoks gugus hidroksil ini menjadikan senyawa polifenol sebagai antioksidan yang kuat (Materska dan Perucka, 2005). Oboh (2006) menyatakan bahwa polifenol alami mampu mengatasi radikal bebas, mengkelat katalis logam, mengaktivasi enzim antioksidan, menurunkan radikal alfa tokoferol, dan menghambat reaksi oksidasi. Antioksidan dalam ekstrak disebabkan komponen kimia seperti flavonoid ataupun tanin. Menurut Raj dan Shalini (1999), banyak flavonoid telah menunjukkan sifat antioksidan yang kuat (Saidu A. N dan Garba R., 2011)

Ganiyu Oboh dan Omodesola O. Ogunraku (2009) menemukan bahwa ekstrak fenol dari daging buah (perikarp) dan biji *C. frutescens* var. *abbreviatum* memiliki aktivitas antioksidan dalam penelitian *in vitro* dan *in vivo*. Studi ini membuktikan bahwa injeksi intraperitoneal siklofosfamida (75 mg/kg BB) meningkatkan jumlah MDA (malondialdehida) di otak tikus. Jumlah MDA dalam otak tikus ini mengalami penurunan signifikan pada tikus yang telah diberi diet mengandung ekstrak cabe rawit, di mana ekstrak dari buah menunjukkan efek hambatan lebih tinggi terhadap pembentukan MDA. Dengan demikian, disimpulkan bahwa diet *C. frutescens* L. var. *abbreviatum* dapat mencegah stres oksidatif yang diinduksi siklofosfamida pada otak.

## **2.2 Simplisia (Departemen Kesehatan RI, 2000)**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Dengan kata lain, simplisia merupakan bahan baku proses pembuatan ekstrak, baik sebagai bahan obat atau produk. Simplisia dibedakan atas 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 berupa suatu senyawa nabati yang dikeluarkan dari sel tumbuhan, baik secara spontan atau dengan cara tertentu. Eksudat ini belum berupa senyawa kimia murni.

Sebagai produk hasil pertanian atau pengumpulan tumbuhan liar, kandungan kimia simplisia tidak dapat dijamin selalu konstan. Hal ini disebabkan adanya variable bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara) panen, proses pasca panen dan preparasi akhir. Ada pendapat bahwa variabel tersebut tidak berpengaruh besar pada mutu ekstrak nantinya dan dapat dikompensasi dengan penambahan atau pengurangan bahan setelah sedikit prosedur analisis kimia dan inovasi teknologi farmasi lanjutan sehingga khasiat produk tidak terlalu dipengaruhi. Usaha untuk mengonstankan variabel di atas dapat dianggap sebagai usaha untuk menjaga mutu simplisia konstan.

Sebagai bahan baku (awal) ataupun produk yang siap dikonsumsi langsung, dapat dipertimbangkan tiga konsep untuk menyusun parameter standar umum, yaitu:

- (a) Simplisia sebagai bahan kefarmasian seharusnya memenuhi tiga parameter mutu umum suatu bahan (material), yaitu kebenaran jenis (identifikasi), kemurnian (bebas dari kontaminasi kimia dan biologis), serta aturan penstabilan (wadah, penyimpanan, dan transportasi).
- (b) Simplisia sebagai bahan dan produk konsumsi manusia sebagai obat tetap diupayakan memenuhi tiga paradigma, yaitu *quality-safety-efficacy* (mutu-aman-manfaat) seperti produk kefarmasian lainnya.
- (c) Simplisia sebagai bahan dengan kandungan kimia yang bertanggung jawab terhadap respon biologis harus mempunyai spesifikasi kimia, yaitu informasi komposisi (jenis dan kadar) senyawa kandungan.

### **2.3 Metode Ekstraksi (Departemen Kesehatan RI, 2000)**

Ekstraksi adalah suatu proses penyarian senyawa kimia yang terdapat di dalam bahan alam atau berasal di dalam sel dengan menggunakan pelarut dan metode yang tepat. Sedangkan ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Departemen Kesehatan RI, 1995). Terdapat dua cara ekstraksi dengan menggunakan pelarut, yaitu:

### 2.3.1 Cara dingin

#### 2.3.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

#### 2.3.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap meserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penambungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

### 2.3.2 Cara panas

#### 2.3.2.1 Refluks

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

#### 2.3.2.2 Soxhlet

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

### 2.3.2.3 Digesti

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

### 2.3.2.4 Infus

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

### 2.3.2.5 Dekok

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

## 2.4 Spektrofotometer UV-Vis (Douglas A. Skoog dan Donald M. West, 1971)

Spektrofotometri serapan merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Spektrofotometer UV-Vis ini hanya dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa yang memiliki gugus kromofor. Kromofor adalah gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan tampak jika gugus ini diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Hampir semua kromofor mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi (diena, dienon, benzen, dan lain-lain). Sedangkan auksokrom adalah gugus fungsional seperti -OH, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -X, yaitu gugus yang mempunyai elektron nonbonding dan tidak mengabsorpsi radiasi UV jauh ( $n \rightarrow \sigma^*$ ).

Suatu kromofor pada senyawa dapat muncul atau memberikan serapan pada spektrum serapan UV-Vis jika senyawa tersebut memiliki panjang gelombang maksimum yang lebih besar dari 190 nm dan daya serap molarnya lebih besar dari 1000 agar konsentrasi yang digunakan tidak terlalu besar. Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet

dan cahaya tampak terdiri dari suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan cahaya monokromatik dalam jangkauan 200 nm hingga 800 nm dan suatu alat yang sesuai untuk menetapkan serapan. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk analisa kualitatif dan terutama untuk analisa kuantitatif. Ketepatan analisa oleh spektrofotometer UV-Vis ini dipengaruhi juga oleh spektrum serapan yang terbentuk. Spektrum serapan adalah suatu penampilan dalam bentuk grafik dari serapan atau fungsi dari serapan terhadap panjang gelombang atau suatu fungsi dari panjang gelombang (Departemen Kesehatan RI, 1995). Pembentukan spektrum serapan dipengaruhi berbagai faktor, yaitu:

(a) Jenis pelarut

Pelarut yang digunakan tidak boleh mengabsorpsi cahaya pada daerah panjang gelombang dimana dilakukan pengukuran sampel. Pelarut yang umum digunakan adalah air, etanol, metanol, dan n-heksana karena pelarut ini transparan pada daerah UV.

(b) pH larutan

Cara pembuatan pelarut yang tidak tepat sama dari waktu ke waktu terkadang mempengaruhi panjang gelombang maksimum atau daya serapnya (a), maka hasil pengukuran dapat menyimbang karena adanya perubahan pH ini. Pada senyawa yang sangat sensitif oleh pengaruh pH, penetapan kadar senyawa dilakukan pada titik isobestis (panjang gelombang dimana suatu senyawa dengan konsentrasi sama, tetapi pH tidak sama, namun memberikan serapan yang sama).

(c) Kadar larutan

Jika konsentrasi tinggi akan terjadi polimerisasi yang menyebabkan panjang gelombang maksimum berubah sama sekali.

(d) Tebal larutan

Jika digunakan kuvet dengan tebal berbeda akan memberikan spektrum serapan yang berbeda

(e) Lebar celah

Makin lebar celah (*slit width*), maka makin lebar pula serapan (*band width*) dimana cahaya makin polikromatis sehingga resolusi dan puncak-puncak kurva tidak sempurna.

## 2.5 Fraksinasi (J. B. Harborne, 1987)

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa tertentu dari campuran senyawa kompleks yang terdapat di dalam suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur dalam rangka penyederhanaan keanekaragaman senyawa. Terkadang dengan satu kali saja dilakukan fraksinasi, yaitu dengan penggunaan teknik ekstraksi cair-cair, dapat diperoleh suatu senyawa dengan jumlah besar yang selanjutnya tinggal dimurnikan saja, misalnya dengan rekristalisasi sederhana. Namun, pada umumnya memerlukan fraksinasi yang berulang-ulang, baik dengan teknik yang sama atau kombinasi dengan teknik fraksinasi lain. Pelarut yang umumnya dipakai untuk fraksinasi adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol. Berbagai pelarut ini memiliki tingkat kepolaran berbeda sehingga digunakan untuk tujuan penarikan senyawa yang berbeda. Hal ini sejalan dengan tujuan fraksinasi yaitu untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lainnya. Pelarut n-heksana mampu menarik senyawa nonpolar seperti asam-asam lemak, etil asetat mampu menarik senyawa semipolar sedangkan metanol mampu menarik senyawa bersifat polar. Hasil tiap fraksinasi diuapkan sampai kental dengan penguapan putar pada suhu kurang lebih 50°C.

Fraksinasi kemudian dilanjutkan dengan proses pemisahan. Proses pemisahan merupakan suatu cara untuk mengisolasi sejumlah komponen kimia dalam keadaan murni dari suatu campuran. Proses pemisahan dilakukan untuk dua tujuan, yaitu kualitatif dan kuantitatif. Banyak analisis tumbuhan yang dicurahkan pada isolasi dan identifikasi kandungan sekunder dalam sekelompok jenis tumbuhan tertentu dengan harapan menemukan beberapa kandungan yang strukturnya baru atau tidak biasa. Penentuan kuantitas komponen yang ada dalam ekstrak tumbuhan sama pentingnya dengan penentuan kualitatif ekstrak tumbuhan tersebut, di mana masing-masing komponen dapat ditentukan kuantitasnya dengan mudah secara KGC atau KCKT.

### 2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode yang umumnya digunakan untuk proses pemisahan senyawa adalah metode kromatografi. Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran

yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut di antara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*).

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan atas penyerapan, partisi (pembagian) atau gabungannya. Kromatografi Lapis Tipis sendiri banyak digunakan baik untuk tujuan kualitatif, kuantitatif, maupun preparatif/analitik. Kromatografi analitik biasanya dipakai pada tahap permulaan untuk semua cuplikan sebagai orientasi awal dan kromatografi preparatif untuk memperoleh fraksi murni dari campuran.

Teknik KLT sangat bermanfaat untuk analisis obat dan bahan lain dalam laboratorium karena hanya memerlukan peralatan sederhana, waktu yang cukup singkat (15-60 menit), dan jumlah zat yang diperiksa cukup kecil, yaitu kira-kira 0,01 g senyawa murni ataupun 0,1 g simplisia. KLT adalah salah satu subdivisi kromatografi liquid dimana fase gerak berupa cairan dan fase stasioner berupa lapisan tipis pada permukaan pelat yang datar (Bernard Fried dan Joseph Sherma, 1999).

#### 2.5.1.1 Fase Diam

Fase diam adalah lapisan tipis penyerapan yang seragam atau media terpilih yang digunakan sebagai media pembawa. Penjerap dilekatkan pada penyangga sebagai pelapis untuk mendapatkan lapisan yang stabil dengan ukuran yang sesuai. Penyangga yang sering digunakan adalah lempeng gelas juga lembaran plastik dan aluminium, sedangkan penjerap yang paling sering digunakan antara lain silika gel, alumina, kieselguhr, dan selulosa (Touchstone dan Dobbins, 1983).

Ukuran pelat lempeng KLT umumnya 20 x 20 cm atau 10 x 20 cm. Selain itu, pelat KLT dapat dibuat dari kaca objek. Ada tidaknya air dalam penjerap kromatografi sangat penting. Lapisan alumina atau silika gel yang digunakan untuk penjerapan harus sesedikit mungkin mengandung air. Air dapat menempati semua titik penjerapan sehingga tidak akan ada linarut yang melekat. Cara

mengaktifkan lapisan yang mengandung air sedikit itu adalah dengan pemanasan pada 100° C selama satu hingga tiga jam, dan jika suhu di atas 110° C mungkin terjadi dehidrasi yang tidak bolak balik pada penjerap sehingga pemisahan menjadi kurang efektif.

#### 2.5.1.2 Fase Gerak

Fase gerak adalah medium transport untuk memisahkan zat terlarut (*solute*) berdasarkan pergerakan/ migrasi sepanjang fase stasioner/ diam melalui gaya kapiler (Bernard Fried dan Joseph Sherma, 1999).

Sifat dan komposisi kimia fase gerak ditentukan oleh jenis zat yang dipisahkan dan jenis penjerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi fase gerak dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut (Touchstone dan Dobbins, 1983). Pelarut sendiri diurutkan sesuai dengan efek eluasinya (*eluotropic series*). Dalam urutan ini kekuatan eluasi bertambah bila pelarut makin polar (tetapan dielektris makin tinggi atau bila tegangan interfasial dengan air makin rendah).

#### 2.5.1.3 Penyiapan dan Penotolan Sampel

Sampel atau cuplikan harus dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Sejumlah tertentu cuplikan padat dilarutkan dalam pelarut yang mudah menguap. Larutan sampel yang ditotolkan umumnya antara 0,1 hingga 1 % sebanyak 1 hingga 20 µL. Pelarut yang sangat polar atau tidak menguap sebaiknya tidak digunakan pada KLT karena akan menghasilkan titik mulai yang besar. Jika memang benar-benar diperlukan, gunakan volume yang sangat kecil dan diaplikasikan dengan baik kemudian pelarut dihilangkan dengan bantuan udara hangat. Hal ini harus dilakukan dengan hati-hati untuk memastikan zat tidak mengkristal pada garis mulai (Stahl, 1969).

Jumlah cuplikan yang ditotolkan harus sangat diperhatikan karena berkaitan dengan kapasitas pelarut untuk menggerakkannya, di dalam cuplikan itu terkandung konsentrasi optimum yang diperlukan untuk analisis kuantitatif, dan waktu pengembangan yang efektif. Pipa kapiler dapat digunakan sebagai alat penotolan cuplikan. Bentuk totolan cuplikan dapat berupa titik atau pita dengan



diameter totolan antara 2 mm hingga 5 mm dan volume cairan yang ditotolkan dapat berkisar antara 1 hingga 2  $\mu\text{L}$  atau lebih untuk mencegah terdifusinya cairan totolan tersebut. Agar diameter penotolannya tidak terlalu besar, tetes demi tetes larutan cuplikan ditotolkan setelah pelarut tetesan sebelumnya menguap. Penguapan dapat dipercepat menggunakan udara panas atau aliran nitrogen.

#### 2.5.1.4 Pengembangan

Pergerakan substansi sepanjang KLT merupakan hasil dari dua gaya yang berlawanan, yaitu gaya gerak fase gerak dan gaya bertahan sorben (lapisan penjerap). Gaya gerak cenderung memindahkan substansi dari tempat semula seturut aliran fase gerak. Gaya bertahan menjaga pergerakan substansi melalui penahanan pada sorben. Pada akhir pengembangan, setiap zona telah menempuh jarak migrasi tertentu dan menyebar seturut fluktuasi pergerakan molekul itu dalam zona oleh karena ukuran partikel dan keseragaman dalam lapisan. Jarak yang ditempuh pusat tiap zona terlarut adalah hasil dari kedua gaya ini. Substansi yang bergerak lebih lambat dan lebih terikat pada lapisan akan dibandingkan dengan substansi yang bergerak lebih cepat dan kurang terikat pada lapisan, disebabkan afinitas yang lebih kecil dan kelarutan yang lebih baik dalam fase gerak (Bernard Fried dan Joseph Sherma, 1999).

#### 2.5.1.5 Metode Deteksi

Setelah pengembangan, lapisan ini dipindahkan dari bejana, dan fase gerak diuapkan dalam ruang bersirkulasi baik, dilengkapi udara hangat atau panas yang berasal dari pengering rambut atau di dalam oven. Proses penguapan tidak boleh menyebabkan hilangnya *solute* yang mudah menguap dari lapisan serta tidak boleh dilakukan pada temperatur yang cukup tinggi untuk menyebabkan dekomposisi komponen. Bercak kemudian dideteksi dengan berbagai cara. Substansi berwarna dapat dilihat dengan cahaya biasa tanpa perlakuan khusus. Sedangkan, deteksi substansi tak berwarna dapat dilakukan secara sederhana jika komponen mengabsorpsi di daerah sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau jika komponen dapat tereksitasi menghasilkan fluoresensi melalui radiasi UV gelombang pendek dan atau gelombang panjang (366 nm). Idealnya, reagen

pendeteksi menghasilkan bercak yang kontras, sensitivitas tinggi yang stabil (kecuali jika metode bersifat nondestruktif atau reversibel) dan proporsional dengan kuantitas yang ada pada lapisan. Metode yang bersifat langsung dan nondestruktif melalui penggunaan autoradiografi, fluorografi, teknik scanning untuk mengukur *solute* terlabel radioaktif (Bernard Fried dan Joseph Sherma, 1999).

Derajat retensi, dinyatakan dengan  $R_f$ , digunakan untuk menyatakan posisi zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan rumus:

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

#### 2.5.2 Kromatografi Kolom (R. J. Gritter, J. M. Bobbit dan A. E. Schwarting, 1991)

Kromatografi kolom digunakan untuk melakukan pemisahan senyawa kimia dalam jumlah besar dari campurannya. Pada proses pemisahan ini campuran diletakkan pada bagian atas kolom adsorben yang berada dalam satu tabung. Tabung atau kolom dapat dibuat dari gelas, logam atau plastik. Sama seperti kromatografi lapis tipis, terdapat fase gerak dan fase diam dalam sistem kromatografi. Pelarut sebagai fase gerak atau eluen melalui gaya berat atau dorongan dengan tekanan tertentu dibiarkan mengalir melalui kolom membawa pita linarut yang bergerak dengan kecepatan berbeda. Linarut yang telah memisah keluar dari bagian bawah kolom dalam bentuk fraksi-fraksi. Masing-masing fraksi ekstrak ini dibedakan berdasarkan tingkat kepolarannya.

Pemilihan fase gerak sangat penting karena selain memisahkan komponen-komponen senyawa berdasarkan kepolaran, pelarut digunakan untuk membuat larutan cuplikan dan mengelusi komponen senyawa yang telah terpisah. Fase gerak yang digunakan dimulai dari pelarut non polar, kemudian kepolaran ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Sedangkan jenis adsorben yang dipilih dipertimbangkan berdasarkan faktor-faktor sebagai berikut:

- (a) Tidak boleh bereaksi dengan senyawa yang akan dianalisis.

- (b) Tidak bersifat sebagai katalis yang akan menyebabkan dekomposisi zat.
- (c) Tidak larut dalam pelarut yang digunakan.
- (d) Sedapat mungkin tidak berwarna, mempunyai sifat yang stabil selama berlangsungnya proses pemisahan.
- (e) Mempunyai ukuran partikel yang seragam, ukuran partikel biasanya lebih besar daripada KLT.

Fraksi-fraksi yang telah dipisahkan dan ditampung oleh kolom selanjutnya dianalisis dengan cara kromatografi lapis tipis untuk setiap lima atau sepuluh fraksi yang diperoleh. Beberapa fraksi yang menunjukkan jumlah dan komposisi komponen senyawa yang sama dapat disatukan. Pada keadaan yang sangat menguntungkan beberapa fraksi dapat terdiri dari komponen senyawa yang sudah murni.

## **2.6 Penapisan Fitokimia**

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan atau identifikasi kandungan kimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Setelah golongan ditentukan, kemudian ditentukan jenis senyawa dalam golongan tersebut (Harborne, 1987). Golongan senyawa yang diperiksa adalah senyawa metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon.

### **2.6.1 Alkaloid**

Alkaloid adalah konstituen dasar tanaman yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta bereaksi dengan pereaksi alkaloid. Kebiasaan alkaloid biasanya disebabkan nitrogen amino. Menurut sifatnya alkaloid umumnya berbentuk kristal padat dan sebagian kecil bersifat cair, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit (Harborne, 1987). Alkaloid umumnya tidak larut dalam air dan larut dalam eter atau kloroform dan pelarut nonpolar lainnya. Alkaloid basa yang bereaksi dengan asam akan membentuk garam yang larut air (Frank S. D' Amelio, 1999).

### 2.6.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya terdapat pada tumbuhan berpembuluh. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, maka menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Flavonoid yang terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida. Oleh karena itu, biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis (Harborne, 1987).

### 2.6.3 Terpenoid

Terpenoid adalah senyawa yang tersusun dari molekul isopren  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit  $\text{C}_5$ . Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, seperti monoterpena dan seskuiterpena yang mudah menguap ( $\text{C}_{10}$  dan  $\text{C}_{15}$ ), diterpena yang lebih sukar menguap ( $\text{C}_{20}$ ), yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol ( $\text{C}_{30}$ ), serta pigmen karotenoid ( $\text{C}_{40}$ ). Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform (Harborne, 1987).

### 2.6.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa umum yang terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air, memiliki rasa sepat, dan mampu mengubah kulit hewan yang mentah menjadi kulit siap pakai karena kemampuannya menyambung-silang protein. Jika bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air.

Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin

terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987).

#### 2.6.5 Saponin

Saponin terdistribusi luas dalam tanaman dan merupakan salah satu bentuk khusus glikosida. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun yang jika dikocok kuat akan menimbulkan busa. Saponin memiliki efek hemolitik dan sangat toksik jika diinjeksikan ke dalam aliran darah. Berdasarkan struktur aglikon atau sapogenin, ditemukan dua jenis saponin, yaitu tipe steroid dan triterpenoid (Manuchair Ebadi, 2007).

#### 2.6.6 Glikosida

Glikosida adalah substansi nonpereduksi, jika dihidrolisis oleh reagen atau enzim, menghasilkan satu atau lebih gula pereduksi di antara produk hidrolisis lainnya. Bagian bukan gula dari molekul disebut aglikon atau genin; bagian gula disebut glikon. Fungsi glikosida dalam tanaman adalah sebagai cadangan gula, peran pengaturan, detoksifikasi, dan pertahanan. Glikosida dapat menyatakan efek farmakologis yang penting; misalkan digitoksin, stropantin, dan ouabain sebagai stimulant jantung; senosida, kaskarosida, dan barbaloin sebagai laksatif; sinigrin (setelah dihidrolisis) sebagai iritan lokal; salisin sebagai analgesik; dan hesperidin digunakan untuk ketahanan kapiler (Frank S. D' Amelio, 1999).

#### 2.6.7 Kuinon dan Antrakuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar. Kuinon dapat dipilah menjadi empat kelompok untuk tujuan identifikasi, yaitu benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. Sedangkan kuinon isoprenoid yang terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis memerlukan cara khusus untuk dipisahkan dari bahan lipid lain (Harborne, 1987).

## 2.7 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa yang terbentuk dari molekul yang kehilangan satu elektron pada bagian terluar orbitalnya sehingga bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Setiap orbital yang mengelilingi inti atom terisi oleh sepasang elektron. Satu elektron yang hilang menyebabkan kecenderungan elektron untuk membentuk pasangan dengan menarik elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal bebas baru. Kemudian, radikal bebas baru ini dapat menginisiasi reaksi lainnya sehingga dinamakan reaksi berantai. Reaksi berantai ini terhenti, baik melalui reaksi radikal bebas dengan radikal bebas lainnya, yang menghasilkan pembentukan molekul berikatan kovalen, ataupun melalui reaksi radikal bebas dengan suatu antioksidan, enzim antioksidan, ataupun keduanya. Oleh karena pertahanan dari antioksidan tidak cukup efisien, peningkatan terbentuknya radikal bebas dalam tubuh mungkin meningkatkan kerusakan, yang seringkali dimaksudkan sebagai stres oksidatif. Jika stres oksidatif tingkat sedang terjadi, jaringan seringkali merespons dengan meningkatkan pertahanan antioksidannya. Namun, stres oksidatif yang berat dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Pamela Mason, 2007).

Radikal bebas dapat dihasilkan oleh sumber endogen maupun eksogen. Tubuh merupakan sumber endogen penghasil radikal bebas. Tubuh menghasilkan radikal bebas melalui berbagai proses, yaitu autooksidasi, oksidasi enzimatik, fagositosis, dan ion logam transisi. Reaksi-reaksi dalam tubuh ini juga menghasilkan oksidan. Oksidan memiliki sifat yang sama seperti radikal bebas, yaitu cenderung menarik elektron dari suatu molekul senyawa. Namun, radikal bebas lebih berbahaya jika dibandingkan dengan oksidan yang bukan radikal dalam hal reaktivitasnya yang tinggi untuk menarik elektron. Secara umum, ada tiga kelompok radikal bebas, antara lain:

- a. Radikal bebas turunan *Reactive Oxygen Species* (ROS) akibat oksidasi dalam tubuh, yaitu superoksida, hidroksil, oksida nitrit, peroksi nitrit, asam hipoklorit, dan hidrogen peroksida.
- b. Radikal dengan inti karbon  $\text{CCl}_3$
- c. Tipe lain dengan inti hidrogen, inti sulfur, dan lain-lain (Fouad, 2005).

Selama proses respirasi aerob, atom oksigen akan menerima dua elektron dan bersama hidrogen membentuk air ( $H_2O$ ). Hasil reduksi oksigen ini menghasilkan senyawa yang tidak reaktif. Namun pada beberapa reaksi, reduksi oksigen dapat menghasilkan senyawa yang reaktif, yaitu senyawa oksigen dengan satu atau lebih elektron yang tak berpasangan dan disebut sebagai *Reactive Oxygen Species*. ROS merupakan salah satu golongan radikal bebas yang berbahaya di tubuh manusia. ROS dapat merusak secara oksidatif struktur lipid, protein dan DNA melalui proses peroksidasi lipid, peroksidasi protein dan/atau kerusakan DNA/RNA. Kerusakan tersebut akan menyebabkan berubahnya fungsi makromolekul, organel, sel dan sistem biologis di tubuh manusia. Pada akhirnya, kerusakan oksidatif dapat menyebabkan beberapa penyakit berbahaya seperti aterosklerosis, katarak, penuaan dini, serangan jantung, dan juga kanker (Barry Halliwell, 2002).

*Aging* seluler merupakan salah satu dampak kerusakan yang disebabkan radikal bebas. Radikal bebas ini terbentuk melalui reaksi biokimia maupun paparan eksogen. Contoh paparan eksogen yang berperan dalam *aging* adalah sinar ultraviolet. *Aging* menyebabkan kulit terlihat menggelap, terasa kasar, dan timbul kerutan yang dalam akibat penebalan epidermis kulit. Respons kulit terhadap sinar ultraviolet dapat dibedakan atas dua bentuk. Pertama, respon akut berupa pembentukan eritema. Kedua, respon kronik yang teramati dalam *photoaging* dan sistem imun. *Photoaging* berbeda dengan proses *aging* yang terjadi secara alamiah. *Photoaging* atau *dermatoheliosis* adalah kondisi di mana *aging* terjadi pada tubuh melalui paparan cahaya ultraviolet. Lipid yang mengalami peroksidasi berperan dalam terjadinya *aging*. Akibatnya, kulit terlihat menggelap, kulit terasa kasar, dan timbul kerutan yang dalam akibat penebalan epidermis kulit. *Photoaging* sendiri diyakini terjadi karena disebabkan oleh sinar UV A. Berdasarkan pemeriksaan histopatologis, kulit yang mengalami *photoaging* mengalami pelebaran (dilatasi) arteri dan peningkatan jumlah serat elastin dibandingkan kulit yang mengalami proses penuaan yang alamiah. Respon kronik sinar UV yang lain terjadi dalam sistem imun. Hal ini menunjukkan dampak sinar UV tidak hanya terhadap kulit tetapi juga keseluruhan tubuh (Takeo Mitsui, 1997).

## 2.8 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dalam jumlah kecil dapat menghentikan, menghambat atau mengurangi reaksi yang ditimbulkan oleh radikal bebas yang menghasilkan kerusakan oksidatif pada tubuh manusia. Menurut asalnya, terdapat dua golongan antioksidan, yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen (senyawa yang dihasilkan oleh tubuh yang memiliki sifat antioksidatif) adalah asam urat, bilirubin, protein plasma, dan enzim superoksida dismutase, glutathion peroksidase dan katalase. Sementara itu, antioksidan eksogen seperti vitamin E, vitamin C, dan flavonoid, didapatkan dari diet makanan (Barry Halliwell, 2002). Menurut Donald Armstrong (2002), berdasarkan sumbernya, terdapat dua kelompok antioksidan, yaitu:

### 2.8.1 Antioksidan Sintetik

Contoh antioksidan sintetik antara lain, antioksidan dari golongan fenol seperti *butylated hydroxyanisol* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tersier butylhydroquinone* (TBHQ), dan ester dari asam galat seperti propil galat (PG). BHA dan BHT digunakan sebagai antioksidan dalam industri terutama ditambahkan pada bahan yang mengandung lemak atau minyak untuk mencegah proses oksidasi reduksi pada bahan tersebut yang akan menghasilkan bau tengik. Antioksidan sintetik telah sepenuhnya diuji reaksi toksisitasnya, tapi beberapa menjadi toksik setelah penggunaan dalam waktu lama.

### 2.8.2 Antioksidan Alami

Antioksidan yang berasal dari alam dapat dikelompokkan ke dalam tiga bagian besar, yaitu:

- (a) Antioksidan larut air, meliputi asam askorbat, antosianidin, katekin, epikatekin, flavonoid, dan glikosida fenol lainnya. Antioksidan larut air seperti asam askorbat (vitamin C) merupakan antioksidan yang paling banyak ada dalam buah jeruk. Dalam tanaman, vitamin ini disintesis dari glukosa. Ketiadaan suatu enzim dalam tubuh manusia menyebabkan vitamin ini tak dapat disintesis oleh manusia. Glikosida fenol seperti flavonoid memiliki



banyak aktivitas terapi meliputi peningkatan sistem imun, sitotoksik, dan antioksidan yang kuat.

- (b) Antioksidan larut lemak, meliputi vitamin A dan E, karotenoid; seperti beta karoten, likopen, dan komponen kuinoid lainnya. Banyak dari senyawa ini memiliki hidrokarbon rantai panjang dengan ikatan rangkap dua terkonjugasi dan cincin beta ionon.
- (c) Antioksidan logam seperti selenium juga ditemukan dalam banyak tanaman, seperti bawang.

Antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah atau menunda waktu timbulnya penyakit degeneratif melalui mekanisme penghambatan proses oksidasi yang menyebabkan penyakit kronik dan menunda waktu terjadinya *aging*. Walaupun antioksidan tidak mampu memperpanjang kehidupan, antioksidan mampu meningkatkan kualitas hidup pasien yang menderita kanker, aterosklerosis, neurodegeneratif, dan penyakit okular melalui pencegahan proses oksidasi lebih lanjut (Sandor PS, Di Clemente L, Coppola G et al., 2005).

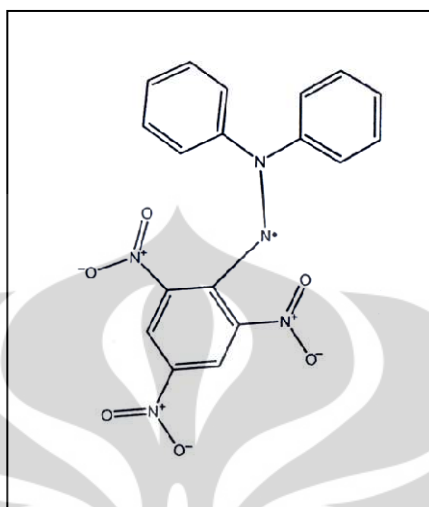
### 2.8.3 Metode Uji Aktivitas Antioksidan secara In Vitro

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan suatu zat, dapat dilakukan beberapa uji baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan beberapa metode, antara lain:

#### 2.8.3.1 Metode Peredaman Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil)

Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya mendonorkan atom hidrogen pada molekul radikal. Radikal bebas yang digunakan sebagai model adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Radikal DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang berpusat pada nitrogen organik yang stabil dan berwarna ungu gelap. Antioksidan dapat mereduksi radikal bebas ini menjadi nonradikal sehingga berubah menjadi tidak berwarna sampai kuning. Uji perendaman radikal DPPH adalah suatu uji dekolorisasi yang mengukur kapasitas antioksidan untuk bereaksi secara langsung dengan (meredam) radikal DPPH melalui monitoring absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer (Liangli

Yu, 2008). Jika disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik akan stabil selama bertahun-tahun (Packer, 1999).



[Sumber: Liangli Yu, 2008]

**Gambar 2.3** Struktur Radikal DPPH

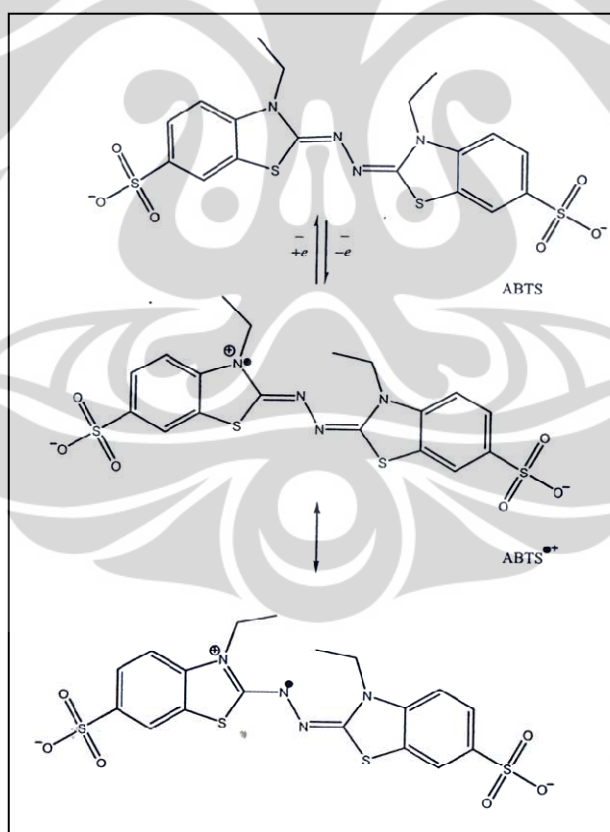
Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang mana sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke larutan reagen DPPH. Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai konsentrasi efektif (*Effective Concentration*) atau  $EC_{50}$  (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar, dan Lakshman, 2005).

#### 2.8.3.2 Metode *Reducing Power*

Metode ini berprinsip pada kenaikan serapan dari campuran reaksi. Peningkatan pada serapan campuran reaksi menunjukkan kekuatan sampel sebagai pereduksi yang linier dengan peningkatan aktivitas antioksidan. Dalam metode ini antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferrisianida, asam trikloroasetat, dan besi (III) klorida yang diukur pada 700 nm. (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar, & Lakshman, 2005).

### 2.8.3.3 Metode Uji Kapasitas Peredaman Radikal Kation ABTS (2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

Uji kapasitas peredaman radikal kation ABTS adalah uji dekolorisasi yang mengukur kapasitas antioksidan untuk bereaksi secara langsung dengan (meredam) radikal kation ABTS yang dihasilkan metode kimia. Radikal ABTS diperoleh dengan mereaksikan ABTS dengan kalium persulfat dalam air selama semalam, lalu diikuti dengan pengenceran dalam etanol (Yuan, 2005). Radikal ABTS adalah radikal yang berpusat pada nitrogen dengan karakteristik warna hijau kebiruan, yang jika direduksi antioksidan ke bentuk nonradikalnya menjadi tak berwarna. Metode ini mengukur secara kuantitatif kapasitas peredaman dengan mengukur absorbansi campuran reaksi radikal-antioksidan pada 734 nm pada waktu yang telah ditentukan dengan spektrofotometer. Hasilnya secara umum dinyatakan relatif terhadap standar, umumnya trolox (Liangli Yu, 2008).



[Sumber: Liangli Yu, 2008]

**Gambar 2. 4** Struktur ABTS dan Radikal Kation ABTS

#### 2.8.3.4 Metode Uji Kapasitas Penyerapan Radikal Oksigen atau *Oxygen Radical Absorbing Capacity (ORAC)*

Pada mulanya, uji ORAC dikembangkan untuk mengukur kapasitas antioksidan dalam memutuskan rantai hidrofilik radikal peroksil dengan menggunakan  $\beta$ -psikoeritrin sebagai medan molekular. Medan molekular adalah target perusakan radikal bebas. Uji ORAC menggunakan kinetik kompetitif untuk melihat kemampuan antioksidan yang diukur oleh medan molekular, fluoresein (FL), untuk meredam radikal peroksil yang berasal dari APPH (2,2-azobis-2-amido propan dihidroklorida), suatu komponen azo. Reaksi radikal peroksil dengan FL menghasilkan produk nonfluoresen dan dapat dilihat melalui pengukuran kehilangan fluoresensi FL dengan fluorometer. Nilai ORAC untuk antioksidan terpilih ditentukan berdasarkan area di bawah kurva reaksi kinetik sampel antioksidan, sedikitnya 4-5 konsentrasi standar antioksidan dan sebuah blanko (Liangli Yu, 2008).

Tes dilakukan dengan menggunakan Trolox (analog vitamin E yang larut dalam air), sebagai standar untuk menentukan *Trolox Equivalent (TE)*. TE merupakan nilai ekuivalen mikromol trolox per unit sampel. Nilai ORAC dihitung dari TE. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar aktivitas antioksidan.

#### 2.8.3.5 Metode Uji Aktivitas Penghambatan Radikal Superoksida atau *Superoxide Anion Radical Scavenging Capacity Assay*

Uji aktivitas penghambatan radikal superoksida dikembangkan untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan hidrofilik untuk bereaksi secara langsung dengan radikal fisiologis ini. Uji ini mengukur kemampuan antioksidan terpilih menggunakan medan molekular, *nitroblue tetrazolium (NBT)*, dalam meredam radikal superoksida yang dihasilkan sistem enzimatis hipoxantin-xantin oksidase (HPX-XOD). Selain itu, radikal superoksida dihasilkan dari reaksi autooksidasi riboflavin dengan adanya cahaya. NBT memiliki warna kuning yang melalui reduksi oleh radikal superoksida membentuk formazan, yang berwarna biru dan terukur pada 560 nm dengan spektrofotometer. Uji ini melaporkan kapasitas peredaman superoksida sebagai persen superoksida yang tersisa. Kapasitas ekstrak untuk penghambatan warna hingga 50% diukur dalam  $EC_{50}$  (Liangli Yu, 2008).

### 2.8.3.6 Metode Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil atau *Hydroxyl Radical Scavenging Capacity* (HOSC)

Radikal hidroksil adalah salah satu spesies yang diketahui paling reaktif yang dihasilkan sistem biologis. Spesies ini diduga dihasilkan secara *in vivo* melalui serangkaian reaksi yang meliputi reaksi Fenton, reaksi menyerupai Fenton, reaksi Haber-Weiss yang dikendalikan superoksida atau dikatalis besi, dan secara fotodinamis. Radikal ini diduga terlibat dalam kerusakan oksidatif seluler yang dapat menyebabkan sejumlah penyakit kronik.

Uji HOSC dikembangkan untuk evaluasi kemampuan antioksidan hidrofilik dalam meredam radikal yang sangat reaktif ini. Uji ini melihat kemampuan sampel antioksidan menggunakan medan molekular, fluoresen (FL), dan meredam radikal hidroksil murni yang dihasilkan sistem Fenton menyerupai  $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Reaksi radikal hidroksil dengan FL menghasilkan produk nonfluoresen yang dapat dilihat melalui pengukuran reduksi fluoresensi FL dengan fluorometer. Nilai HOSC untuk antioksidan terpilih ditentukan berdasarkan area di bawah kurva reaksi kinetik sampel antioksidan, sedikitnya 4-5 konsentrasi standar antioksidan dan sebuah blanko. Trolox menjadi standar di mana hasil dinyatakan sebagai ekuivalen mikromol trolox per unit sampel (Liangli Yu, 2008).

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Kimia Farmasi Kualitatif Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok selama bulan Februari hingga Mei 2012.

### **3.2 Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat destilasi, alat-alat gelas, vial dan botol penampung berbagai ukuran, blender, peralatan maserasi, penguap putar (*rotary evaporator buchii dan IKA dest*), spektrofotometer UV-Vis 1601(Shimadzu), penangas air, refluks, pipet mikro, bejana KLT, peralatan kromatografi kolom berbagai ukuran (Pyrex), peralatan kolom kromatografi vakum (Buchii), timbangan analitik, lemari pendingin, vortex, termometer, pemanas listrik, ayakan B30, kertas saring, kertas kromatogram, kertas alumunium, penyemprot KLT.

### **3.3 Bahan**

#### **3.3.1 Bahan Uji**

Tanaman yang diteliti adalah *C. frutescens* L. yang diperoleh melalui Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro). Adapun bagian yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman tersebut dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

#### **3.3.2 Bahan Kimia**

Bahan Kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah n-heksana, etil asetat, metanol, etanol, dan butanol teknis yang telah didestilasi; *aquadest*; lempeng KLT silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck); DPPH (Wako); kuersetin (Sigma-Aldrich); asam klorida p.a (Merck); petroleum eter (Merck); eter p.a (Merck); asam borat; asam oksalat; asam asetat glasial p.a. (Merck); asam sulfat p.a

(Merck); benzen p.a (Merck); besi (III) klorida (Merck); alumunium (III) klorida (Merck); aseton p.a (Merck); asetat anhidrida p.a (Mallinckordt); natrium hidroksida (Mallinckordt); kalium hidroksida (Mallinckordt); serbuk magnesium (Merck); serbuk seng (Merck); gelatin; natrium klorida (Mallinckordt); anisaldehyd (Merck); silika gel 60 (Merck); silika gel 60 H (Merck); Mayer LP; Dragendorff LP; Bouchardat LP; Molisch LP.

Berikut ini adalah cara pembuatan beberapa reagen pereaksi di atas, antara lain (Departemen Kesehatan RI, 1979):

(a) Bouchardat LP

Tiap 100 ml larutan Bouchardat LP terdiri dari 2 gram yodium P dan 4 gram kalium yodida P dalam air.

(b) Dragendorff LP

Campur 20 ml larutan bismuth nitrat P 40% b/v dalam asam nitrat P dengan 50 ml larutan kalium yodida P 54,4% b/v, diamkan sampai memisah sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml.

(c) Mayer LP

Campuran 60 ml larutan raksa (II) klorida P 2,266 % b/v dan 10 ml larutan kalium yodida P 50 % b/v, tambahkan air secukupnya hingga 100 ml.

(d) Mollisch LP

Larutan alfa naftol P 3 % b/v dalam asam nitrat 0,5 N.

### 3.4 Cara Kerja

Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun *C. frutescens* L. dilakukan melalui beberapa tahapan di antaranya penyiapan simplisia, ekstraksi simplisia, uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi ekstrak, fraksinasi ekstrak aktif, serta penapisan fitokimia ekstrak dan fraksi ekstrak.

#### 3.4.1 Penyiapan Simplisia

Daun *C. frutescens* L. yang digunakan pada penelitian ini diperoleh pada bulan Januari 2012 dari Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) sebanyak 1

kg berupa daun yang telah dikeringkan. Daun yang telah dikeringkan ini berasal dari 15 kg daun segar cabe rawit. Tahapan kerja pembuatan simplisia daun cabe rawit sebagai berikut: pertama, pengambilan atau pemetikan daun segar dimulai dari pukul 6.00. Daun yang diambil terletak pada posisi ketiga dari pucuk hingga sebelum daun yang paling bawah. Lalu, daun dipisahkan dari bagian batang dan ranting. Pada daun dilakukan sortasi atau pemisahan daun segar dari kotoran-kotoran yang masih melekat. Daun segar ditimbang sebanyak 15 kg. Selanjutnya, daun direndam dalam air untuk membersihkan daun dari tanah atau kotoran lain. Daun diangkat dari air, lalu dibiarkan mengering. Setelah ditiriskan, daun dihamparkan di atas wadah lebar, lalu dibiarkan semalaman. Penjemuran daun dilakukan di atas tampah dengan ditutupi kain hitam dari pukul 8.00 hingga pukul 12.00. Tiap jam dari pukul 08.00 hingga 12.00 daun yang dijemur harus dibolak-balikkan sisinya terhadap cahaya matahari. Setelah pukul 12.00 daun diangkat dan disimpan di tempat teduh yang terlindung/ di bawah naungan di mana kain hitam dibuka. Proses penjemuran dan penyimpanan daun ini diulang selama lima hari. Lalu, daun yang telah kering ditimbang kembali. Berdasarkan pengerjaan tahapan-tahapan ini, daun segar cabe rawit sebanyak 15 kg dikeringkan menjadi 1,2 kg daun. Selanjutnya dilakukan sortasi untuk memisahkan kembali daun kering dari kotoran atau bahan-bahan asing yang ikut terbawa dalam proses pengolahan bahan uji. Setelah itu, daun dihaluskan dengan blender dan diayak dengan ayakan B30. Serbuk kemudian disimpan dalam wadah bersih dan terlindung dari cahaya.

#### 3.4.2 Ekstraksi Simplisia

Sejumlah 1 kg serbuk kering daun *C. frutescens* L. dimaserasi dengan pelarut n-heksana yang telah didestilasi. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana. Maserasi ini diulangi sebanyak tiga kali terhadap ampas. Selanjutnya, terhadap residu n-heksana dilakukan kembali maserasi berturut-turut dengan pelarut etil asetat dan metanol. Filtrat maserasi kembali diuapkan dengan penguap putar vakum. Pada akhirnya diperoleh ekstrak



n-heksana, etil asetat, dan metanol. Kemudian, masing-masing ekstrak ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap berat simplisia awal.

#### 3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan secara Kualitatif

Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk melihat adanya aktivitas antioksidan sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif. Masing-masing larutan yang diuji, yaitu ekstrak maupun fraksi ekstrak dibuat dalam konsentrasi yang sama lalu ditotolkan pada kertas kromatogram dengan pipet kapiler. Hal ini juga dilakukan pada larutan kuersetin sebagai pembanding. Totolan ini disemprotkan larutan DPPH dalam metanol, lalu dilihat warna yang terbentuk. Larutan uji dinyatakan memiliki aktivitas antioksidan jika bercak berwarna putih sampai kuning dengan latar belakang ungu. Setelah uji aktivitas antioksidan secara kualitatif dilakukan, tahap selanjutnya adalah uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif.

Fraksi teraktif dari ekstrak yang diketahui melalui uji aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometri dielusi pada lempeng kromatografi lapis tipis oleh campuran eluen dengan perbandingan tertentu. Setelah proses elusi, lempeng dikeringkan dan dilihat pemisahan yang terbentuk dalam bentuk bercak berfluoresensi di bawah sinar ultraviolet panjang gelombang 254 atau 366 nm. Pada masing-masing bercak ini ditentukan nilai Rf-nya. Lalu, bercak pada lempeng disemprot dengan pereaksi semprot DPPH. Adanya senyawa beraktivitas antioksidan ditunjukkan oleh perubahan warna yang timbul, di mana bercak akan berwarna putih sampai kuning dengan latar belakang ungu.

#### 3.4.4. Uji Aktivitas Antioksidan secara Kuantitatif

Uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif ekstrak dan fraksi ekstrak daun *C. frutescens* L. dilakukan dengan metode peredaman radikal DPPH secara spektrofotometri dengan metode Blois. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi. Metode uji aktivitas antioksidan yang dipilih hanya DPPH, dikarenakan ketersediaan waktu yang ada serta langkah-langkah penelitian yang panjang, meliputi ekstraksi secara maserasi dan fraksinasi menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom. Selain

itu, senyawa kimia dalam ekstrak dan fraksi ekstrak daun cabe rawit diharapkan mampu mendonorkan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga aktivitas antioksidannya dapat ditunjukkan melalui metode DPPH.

#### 3.4.4.1 Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang seksama lebih kurang 10,0 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 100,0 ml dan cukupkan hingga batas. Wadah dilindungi dari cahaya dengan melapiskan kertas aluminium. Konsentrasi larutan DPPH yang diperoleh adalah 100 µg/ml.

#### 3.4.4.2 Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ mL kemudian diukur spektrum serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada range panjang gelombang 200 nm hingga 800 nm untuk ditentukan panjang gelombang optimumnya.

#### 3.4.4.3 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko dipersiapkan dengan memasukkan 1,0 mL metanol p.a ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 1,0 mL DPPH serta 2,0 ml metanol p.a, lalu dikocok hingga homogen. Tabung ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

#### 3.4.4.4 Persiapan Larutan Uji

Setiap ekstrak dari daun *C. frutescens* L. baik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol maupun fraksi ekstrak yang diuji dilarutkan dalam metanol p.a. Larutan uji induk dibuat dalam konsentrasi 1000 µg/ml, lalu dilakukan pengenceran dalam lima hingga enam seri konsentrasi (100; 150; 200 ; 250; 300; dan 350 µg/ml).

(a) Pembuatan larutan induk bahan uji konsentrasi 1000 µg/ml.

Sejumlah 50 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam metanol p.a hingga 50,0 ml secara homogen. Fraksi ditimbang sebanyak kurang lebih 10 mg dan dilarutkan dalam metanol hingga 10,0 ml secara homogen.

(b) Pembuatan larutan seri bahan uji konsentrasi 100; 150; 200 ; 250; 300; dan 350 µg/ml

Dipipet sejumlah 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a. Dari masing-masing larutan uji berbagai konsentrasi ini dipipet sejumlah 1,0 ml ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung reaksi yang sama juga dimasukkan 1,0 ml larutan DPPH 100 µg/mL, lalu ditambahkan 2,0 ml metanol, dihomogenkan dengan vortex, diinkubasi pada suhu 37°C sambil dilindungi dari cahaya selama 30 menit untuk terjadinya reaksi.

(c) Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang hasil optimasi panjang gelombang larutan DPPH.

Prosedur yang sama juga dilakukan pada kuersetin sebagai pembanding. Perbedaannya, pembuatan larutan kuersetin dalam seri konsentrasi 1; 2; 3; 4; 5; dan 6 µg/ml sehingga dari larutan induk kuersetin 1000 µg/ml dipipet sejumlah 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml dan dicukupkan volumenya dengan metanol. Selanjutnya, prosedur uji sama seperti pada larutan ekstrak dan fraksi ekstrak yang diuji.

#### 3.4.4.5 Penghitungan Nilai IC<sub>50</sub>

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

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blangko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blangko}} \times 100 \%$$

Rumus di atas digunakan untuk menghitung persen inhibisi. Setelah didapatkan persen 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<sub>50</sub> yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai  $x$  setelah menggantikan  $y$  dengan 50. Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol, dan fraksi-fraksi ekstrak hasil

**Universitas Indonesia**

fraksinasi ekstrak teraktif sehingga akan diketahui fraksi ekstrak yang paling aktif.

#### 3.4.5 Fraksinasi Ekstrak Aktif

Fraksinasi ekstrak aktif dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom. Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk menentukan sistem eluen yang tepat untuk digunakan dalam kolom. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai lalu dimasukkan langsung pada bagian atas kolom. Fase diam kolom kromatografi yang dipilih adalah silika gel. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok berdasarkan gradien, yaitu dimulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan. Sistem kromatografi kolom yang digunakan tergantung jumlah ekstrak yang diperoleh. Jika jumlah ekstrak yang diperoleh sedikit, sebaiknya sistem kolom yang digunakan adalah kolom biasa. Sebaliknya, jika jumlah ekstrak yang diperoleh banyak, sistem kolom dipercepat dengan bantuan vakum dapat digunakan.

Kolom kromatografi akan memisahkan cuplikan ekstrak aktif ke dalam beberapa fraksi. Fraksi-fraksi ini dianalisa dengan kromatografi lapis tipis kembali untuk melihat pola kromatogram ataupun nilai  $R_f$ -nya. Fraksi ditotolkan pada lempeng aluminium dengan fase diam berupa silika gel  $F_{254}$ . Setelah totolan kering, lempeng dielusi dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan dan ditutup rapat. Jika pengembangan telah mencapai garis batas, lempeng diangkat dan dikeringkan. Bercak yang ada diamati warna fluoresensinya di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm.

Untuk menentukan bercak yang mempunyai aktivitas antioksidan, pereaksi semprot yang digunakan adalah larutan DPPH dengan hasil positif berupa zona kuning dengan latar belakang berwarna ungu. Golongan senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan mencocokkan dengan kromatogram referensi (Sutamihardja, Citreksoko, Ossia dan Wardoyo, 2006).

Fraksi dengan pola kromatogram yang mirip kemudian digabung. Tujuan penggabungan adalah menyederhanakan pemisahan. Berbagai fraksi yang didapat kemudian diuji aktivitas antioksidannya secara kualitatif dan kuantitatif.

Berdasarkan hasil uji aktivitas fraksi-fraksi ekstrak, penapisan fitokimia dilakukan pada fraksi yang paling aktif menggunakan pereaksi kimia dan KLT.

#### 3.4.6 Penapisan Fitokimia

Setelah uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan, ekstrak aktif diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan pereaksi kimia. Penapisan fitokimia ini juga dilakukan pada fraksi paling aktif menggunakan pereaksi kimia serta KLT.

##### 3.4.6.1 Penapisan Fitokimia dengan Pereaksi Kimia

###### a. Identifikasi Alkaloid (Departemen Kesehatan, 1995)

Ekstrak sebanyak 500 mg ditambahkan beberapa ml asam klorida 2 N dan beberapa ml air, panaskan di atas penangas air selama 2 menit, lalu didinginkan dan disaring. Pindahkan filtrat ke atas kaca arloji, lalu tambahkan reagen. Jika dengan Mayer LP terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P, dan dengan Bouchardat P terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, berarti positif terdapat alkaloid.

###### b. Identifikasi Flavonoid (Departemen Kesehatan, 1995)

Larutan percobaan yaitu 0,5 g ekstrak dicampur dengan 10 ml metanol P dan menggunakan pendingin balik selama 10 menit. Setelah disaring dan diencerkan, ditambahkan 5 ml eter minyak tanah P. Kocok hati-hati lalu lapisan metanol diambil dan diuapkan pada suhu 40° di bawah tekanan. Sisa larutan ditambahkan 5 ml etil asetat P, kemudian disaring. Langkah-langkah percobaan yang dilakukan antara lain: pertama, filtrat diambil 1 ml, diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dalam 1-2 ml etanol (95%) P, ditambahkan 0,5 g serbuk seng P dan 2 ml asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit. Ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat. Jika terbentuk warna merah intensif menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol). Kedua, filtrat sebanyak 1 ml diuapkan, sisa dilarutkan dalam 1 ml etanol (95%) P, ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida P. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya

flavon, kalkon dan auron. Ketiga, filtrat sebanyak 1 ml diuapkan hingga kering, dibasahkan sisa dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk asam borat P dan serbuk asam oksalat P, dipanaskan. Sisa dicampur dengan 10 ml eter P. Diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berflurosensi kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid.

c. Identifikasi Terpen (Farnsworth, 1966)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 5 mL larutan eter, lalu diuapkan di dalam cawan penguap. Ke dalam residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat, kemudian 1 tetes asam sulfat pekat. Filtrat mengandung terpen apabila terbentuk warna merah-hijau atau violet-biru.

d. Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966; Trease dan Evans, 1978)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 10 ml air panas. Kemudian panaskan hingga mendidih selama 5 menit, lalu disaring. Langkah-langkah percobaan yang dilakukan antara lain: pertama, filtrat ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  1 % menghasilkan warna hijau violet. Kedua, filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan lima tetes larutan NaCl 10% dan lima tetes larutan gelatin 10% membentuk endapan putih.

e. Identifikasi Saponin (Departemen Kesehatan, 1995)

Serbuk/ekstrak yang diperiksa sebanyak 0,5 gr dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian diamkan selama 10 menit. Jika positif mengandung saponin, akan terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm. Selain itu, pada penambahan 1 tetes HCl 2 N buih tidak hilang.

f. Identifikasi Glikosida (Departemen Kesehatan, 1980)

Ekstrak yang diuji ditambahkan 15 ml larutan asam klorida 10% LP, direfluks selama 30 menit, dinginkan kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh disari sebanyak tiga kali masing-masing dengan 12 ml eter P. Lapisan eter dipisahkan dan dikumpulkan. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat

anhidrat P kemudian disaring dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C. Sisa dilarutkan dengan 2 ml metanol P. Larutan ini sebagai larutan percobaan.

Percobaan pertama adalah reaksi umum identifikasi glikon. Sebanyak 1 ml larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan di atas penangas air. Sisa ditambahkan 1 ml air dan 5 tetes Molisch LP lalu ditambahkan secara hati-hati 10 tetes asam sulfat P. Jika terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molisch).

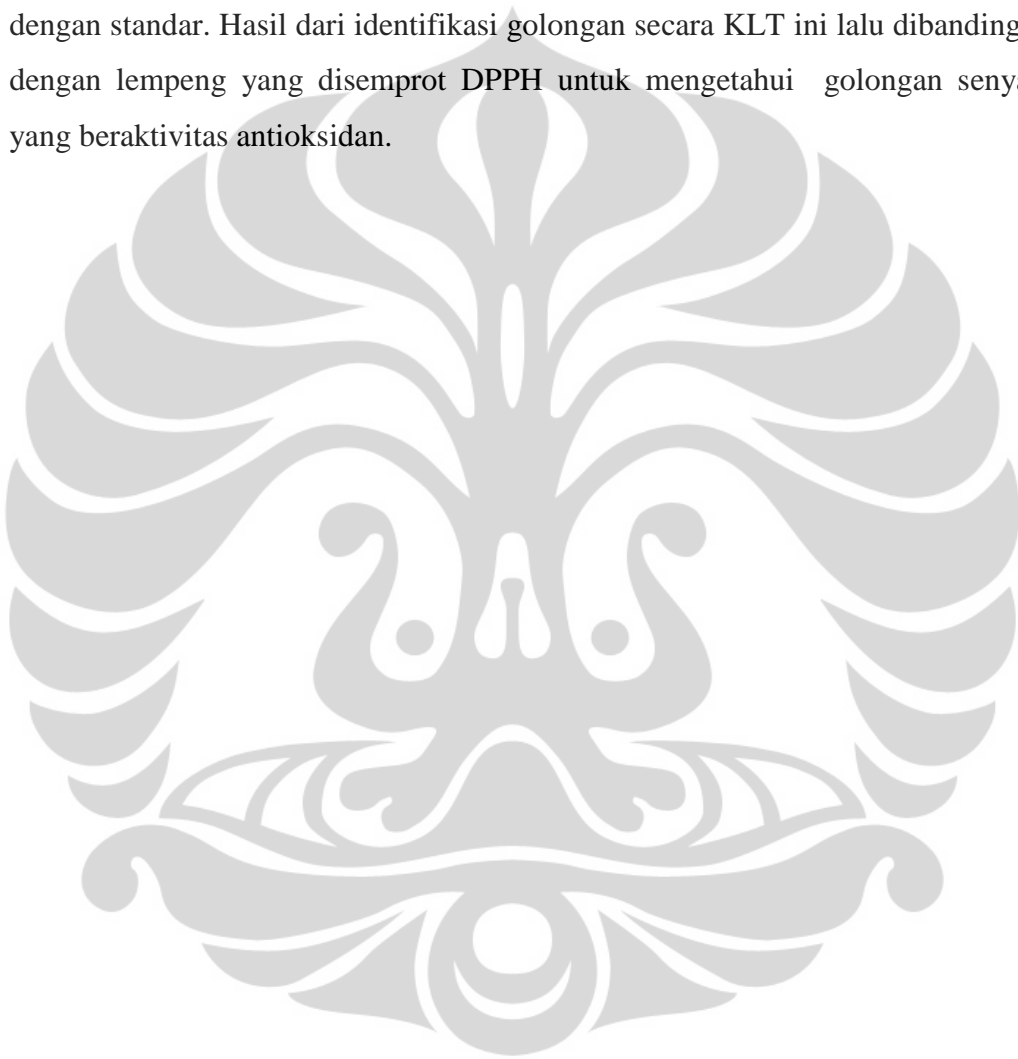
Percobaan kedua bertujuan menguji keberadaan glikosida antrakuinon dengan cara sebanyak 1 ml larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Residu ditambahkan 1 ml benzen P, dikocok dan didiamkan, kemudian lapisan benzene dipisahkan. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1-2 ml natrium hidroksida 2 N kemudian didiamkan, lapisan benzen yang tidak berwarna dan lapisan air yang berwarna merah intensif menunjukkan adanya antrakuinon.

#### 3.4.6.2 Penapisan Fitokimia secara KLT (H. Wagner at al, 1984)

Larutan uji yang hendak diperiksa yaitu fraksi ekstrak pertama-tama harus diuji pergerakannya pada lempeng KLT menggunakan campuran pelarut tertentu sebagai eluen. Sistem eluen yang terpilih adalah yang paling baik memisahkan komponen larutan uji. Fase diam KLT adalah silika gel pada lempeng alumunium. Larutan uji dilarutkan dalam pelarut yang sesuai lalu ditotolkan pada titik awal pergerakan. Setelah totolan kering, lempeng diletakkan dalam bejana KLT yang telah dijenuhkan dan tertutup rapat. Lempeng diangkat setelah eluen mencapai garis batas tertentu. Setelah lempeng dikeringkan, lempeng ini diamati fluoresensinya di bawah sinar UV panjang gelombang 254 dan 366 nm. Lempeng disemprot menggunakan pereaksi semprot universal untuk menampakkan bercak yang tidak berwarna dan tidak berfluoresensi. Contoh pereaksi semprot universal yang umum dipakai adalah asam sulfat pekat 10% dalam metanol. Pelat kromatogram disemprot dengan asam sulfat pekat, kemudian dipanaskan pada 100° C selama beberapa menit.

Larutan fraksi teraktif ditotolkan pada lempeng KLT, dielusi dengan sistem eluen yang sesuai, lalu disemprot menggunakan pereaksi semprot khas

golongan senyawa tertentu antara lain, besi (III) klorida 10% untuk senyawa fenol, dragendorff untuk senyawa alkaloid dan basa organik umum, alumunium (III) klorida 5% dalam metanol untuk senyawa flavonoid, anisaldehyd-asam sulfat untuk senyawa saponin, vanillin-asam sulfat untuk senyawa terpenoid, dan kalium hidroksida untuk senyawa antrakuinon. Bercak yang teramati kemudian ditentukan faktor retensi atau Rf-nya. Nilai Rf yang diperoleh lalu dibandingkan dengan standar. Hasil dari identifikasi golongan secara KLT ini lalu dibandingkan dengan lempeng yang disemprot DPPH untuk mengetahui golongan senyawa yang beraktivitas antioksidan.





## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Penyiapan Simplisia**

Daun *C. frutescens* L. yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) dalam bentuk simplisia kering pada bulan Januari 2012 dan telah dideterminasi oleh LIPI Cibinong, Jawa Barat pada bulan Februari 2012 (Lampiran 1). Daun segar *C. frutescens* L. yang berjumlah 15 kg dikeringkan sehingga diperoleh 1,2 kg simplisia kering. Penelitian ini menggunakan 1,0024 kg simplisia daun kering *C. frutescens* L. Sebelum daun *C. frutescens* L. ini dikeringkan, daun telah mengalami beberapa tahap pengolahan, di antaranya sortasi dalam keadaan kering, pencucian, penirisan, pelayuan, kemudian penjemuran di bawah sinar matahari tidak langsung selama kurun waktu tertentu, dan pendiaman di tempat teduh hingga diperoleh simplisia daun yang kering. Selanjutnya, daun kering disortasi kembali untuk memperoleh bagian daun yang benar-benar bersih dari pengotor. Lalu, daun kering diblender untuk menghaluskan daun sampai ukuran tertentu yang cocok untuk diekstraksi secara maserasi, yaitu serbuk daun dapat melewati pengayak berukuran 30 mesh. Serbuk daun kemudian disimpan dalam wadah yang bersih, kering, dan terlindung dari cahaya untuk menjaga mutu zat aktif dalam simplisia.

#### **4.2 Ekstraksi Simplisia**

Daun kering *C. frutescens* L. sebanyak 1,0024 kg disari dengan cara maserasi, yaitu menggunakan perlakuan pengadukan dan perendaman simplisia dalam pelarutnya. Maserasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang telah didestilasi dan kepolarannya terus meningkat, dimulai dari n-heksana, etil asetat, dan metanol. Keseluruhan proses maserasi daun ini dilakukan dengan pelarut n-heksana yang telah didestilasi sebanyak kurang lebih 14 liter. Setelah daun direndam dalam kurun waktu tertentu, campuran ini disaring sehingga menghasilkan filtrat yang akan dipisahkan dari pelarutnya. Pemekatan filtrat dilakukan dengan alat penguap putar di mana suhu sekitar 50°C untuk menjaga mutu zat aktif dalam ekstrak

Selanjutnya, ampas daun dimaserasi dengan pelarut etil asetat. Total pelarut etil asetat yang digunakan kurang lebih 13 liter. Tahap pengerjaan setelah proses perendaman daun dalam pelarut etil asetat sama seperti pada pelarut n-heksana. Ampas daun dari pelarut etil asetat kemudian disari dengan metanol. Tahap maserasi bertingkat terakhir ini menggunakan pelarut metanol sejumlah kurang lebih 10 liter. Tahap pengerjaan setelah proses perendaman daun dalam pelarut metanol sama seperti pada n-heksana dan etil asetat. Masing-masing ekstrak yang telah dipekatkan, baik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol ditimbang dan dihitung rendemennya, yaitu bobot ekstrak kental dibandingkan terhadap bobot simplisia awal. Besar rendemen untuk ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol berturut-turut sebesar 4,0; 2,29; dan 17,05 % (Tabel 4.1).

### 4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak

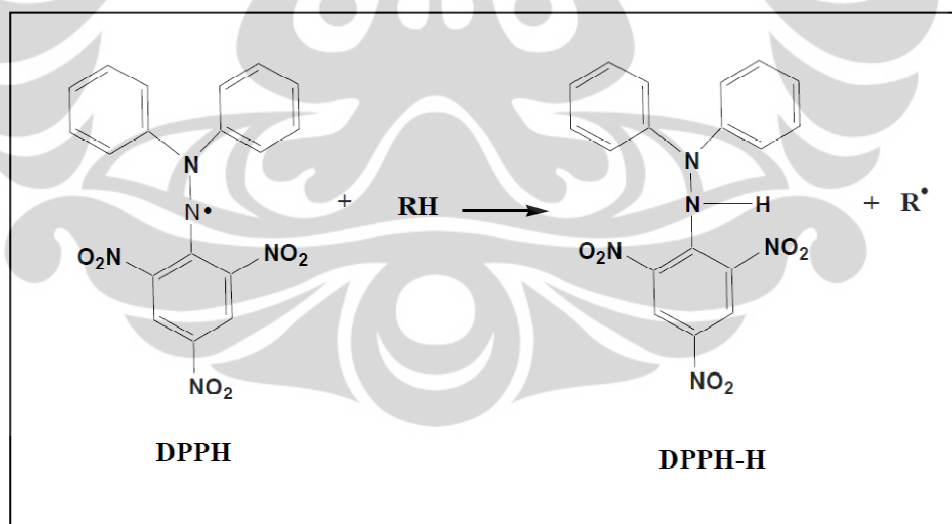
Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode perendaman radikal bebas DPPH. Senyawa DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) adalah senyawa radikal bebas yang berpusat pada nitrogen organik yang stabil dan berwarna ungu gelap. Uji perendaman radikal DPPH adalah suatu uji dekolorisasi yang mengukur kapasitas antioksidan untuk bereaksi secara langsung dengan (meredam) radikal DPPH melalui monitoring absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer. Antioksidan dapat mereduksi radikal bebas ini menjadi nonradikal sehingga berubah menjadi tidak berwarna sampai kuning (Liangli Yu, 2008). Pada penelitian uji aktivitas antioksidan ini digunakan metode DPPH dengan alasan pertama, metode DPPH telah digunakan secara luas sebagai metode uji aktivitas antioksidan pada penelitian ilmiah berskala internasional sehingga hasil yang ditunjukkan dapat dipercaya; kedua, metode DPPH secara khusus mampu menunjukkan aktivitas antioksidan senyawa dengan gugusan hidrogen dan fenol yang merupakan struktur senyawa antioksidan pada umumnya; ketiga, secara teknis prosedur kerja dengan DPPH memerlukan waktu yang tidak panjang dan mudah dalam pelaksanaannya.

Pertama-tama, uji aktivitas dengan metode peredaman radikal bebas DPPH dilakukan dengan cara kualitatif, yaitu pengamatan terhadap warna bercak ekstrak yang telah ditotolkan setelah disemprot dengan larutan DPPH dalam metanol. Jika

pada bercak yang telah disemprot timbul zona berwarna putih kekuningan, ekstrak tersebut dinyatakan memiliki aktivitas antioksidan. Uji kualitatif ini dilakukan pada kertas kromatogram dimana larutan standar dan beberapa ekstrak lainnya yang diuji memiliki konsentrasi yang sama. Ekstrak yang menunjukkan aktivitas antioksidan dari pengujian kualitatif adalah ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol. Hasil uji kualitatif ini dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Ketiga ekstrak ini kemudian diuji aktivitasnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis agar diketahui nilai persen inhibisi yang menunjukkan kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas DPPH. Pertama-tama, dilakukan optimasi panjang gelombang DPPH. Berdasarkan penelusuran literatur panjang gelombang optimal dari DPPH sebesar 515-517 nm. Pada proses optimasi larutan DPPH menunjukkan serapan optimum pada panjang gelombang 517 nm.

Prinsip peredaman radikal bebas DPPH adalah reduksi dari elektron ganjil pada radikal DPPH oleh hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas ini. Proses reduksi menyebabkan larutan metanol radikal DPPH yang semula berwarna ungu akan berubah warna menjadi kuning. Radikal DPPH ini membentuk senyawa DPPH-H tereduksi atau DPP Hidrazin yang stabil (Gambar 4.2).



[Sumber: Prakash et al, 2001]

**Gambar 4.2** Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan berupa donasi proton

Metode uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH didasarkan pada pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya yang sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan kepada larutan DPPH. Aktivitas ini dinyatakan dalam nilai konsentrasi efektif (*Effective Concentration*),  $EC_{50}$  atau  $IC_{50}$  (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar dan Lakshman, 2005).

Blois (1958) menyebutkan bahwa ekstrak tanaman yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kurang dari 200  $\mu\text{g/ml}$  berdasarkan pengujian metode DPPH tergolong beraktivitas kuat sebagai antioksidan. Hasil uji aktivitas secara kuantitatif menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki nilai  $IC_{50}$  48,28  $\mu\text{g/ml}$ , ekstrak etil asetat memiliki nilai  $IC_{50}$  105,08  $\mu\text{g/ml}$ , dan ekstrak n-heksana memiliki nilai  $IC_{50}$  160,81  $\mu\text{g/ml}$ . Berdasarkan metode Blois ini ketiga ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan ekstrak metanol sebagai ekstrak teraktif. Sebagai pembanding, digunakan kuersetin yang memiliki nilai  $IC_{50}$  1,14  $\mu\text{g/ml}$  (Tabel 4.2). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak yang diperoleh jauh lebih besar dari nilai  $IC_{50}$  kuersetin disebabkan kuersetin sudah dalam bentuk senyawa murni, sedangkan ekstrak mengandung berbagai senyawa yang beraktivitas tidak sinergis atau seragam sebagai antioksidan.

#### **4.4 Fraksinasi Ekstrak Aktif**

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif yang dilakukan, ekstrak daun *C. frutescens* L. yang paling aktif adalah ekstrak metanol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 48,28  $\mu\text{g/ml}$ . Pertama-tama, dilakukan penentuan pola kromatogram ekstrak metanol secara KLT. Ekstrak metanol dielusi menggunakan lempeng KLT oleh campuran eluen, baik n-heksana-etil asetat maupun etil asetat-metanol berdasarkan gradien. Setelah lempeng dielusi, lempeng dibiarkan mengering lalu diamati fluoresensinya di bawah sinar UV panjang gelombang 254 nm maupun 366 nm. Lalu, lempeng tersebut disemprot dengan pereaksi semprot universal, yaitu larutan asam sulfat pekat dalam metanol dan dipanaskan pada suhu 100-110°C selama 5 hingga 10 menit. Pada pemanasan ini timbul bercak kuning kecoklatan pada setiap lempeng yang menandakan adanya senyawa.

Fraksinasi ekstrak aktif daun *C. frutescens* L. dilakukan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis. Sistem kromatografi kolom yang digunakan adalah kromatografi kolom dengan bantuan vakum atau tipe dipercepat dengan diameter 6,2 cm dan panjang 19,5 cm. Sistem kromatografi kolom dengan bantuan vakum ini dimungkinkan karena jumlah ekstrak aktif daun *C. frutescens* L. ini besar yaitu sebanyak 170,88 g. Kromatografi kolom dengan bantuan vakum melakukan pemisahan komponen ekstrak berdasarkan gradien pelarut. Kelemahan dari sistem kromatografi dipercepat ini adalah pemisahan dilakukan secara paksa oleh pompa vakum sehingga pemisahan komponen fraksi-fraksi yang dihasilkan tidak sangat sempurna. Selain itu, jumlah fraksi yang dihasilkan umumnya tidak sebanyak hasil fraksi yang berasal dari pemisahan oleh kolom kromatografi tanpa bantuan vakum. Sistem kromatografi kolom dengan bantuan vakum ini sendiri dipilih dengan alasan waktu penelitian yang terbatas. Kelemahan dari sistem ini diatasi dengan pembuatan kolom yaitu dari silika gel H ukuran yang sekompak mungkin untuk lebih memperbaiki pemisahan yang terjadi serta penggunaan ekstrak yang berjumlah besar pula untuk memperoleh jumlah fraksi yang cukup banyak.

Ekstrak metanol daun *C. frutescens* L. ditimbang sebanyak 29,9 g lalu dilarutkan dalam metanol hingga homogen. Larutan ekstrak dalam metanol dicampur dengan silika gel sedikit demi sedikit hingga terpakai kurang lebih 25 g. Pencampuran larutan ekstrak dengan silika gel dimaksudkan untuk membentuk butiran serbuk dari ekstrak sehingga elusi ekstrak dalam kolom kromatografi dapat dilakukan. Kolom kromatografi dipersiapkan dengan memasangnya pada statip dengan bantuan klem. Silika gel H adalah jenis silika yang khusus digunakan sebagai pengisi kolom tipe dipercepat. Silika gel H diisi ke dalam bagian penampung kolom sedikit demi sedikit sambil dimampatkan oleh vakum serta ditekan oleh peralatan khusus. Silika gel H diisi hingga mencapai tiga per lima bagian dari tinggi kaca kolom, lalu campuran serbuk ekstrak dalam silika gel diletakkan di atasnya sambil tetap menyalakan vakum dan meratakan pinggirannya. Di atas campuran serbuk ekstrak ini diletakkan kertas saring. Pertama-tama, n-heksana dimasukkan ke dalam kolom kromatografi untuk membasahi ekstrak serta silika gel H. Eluen yang dipilih untuk mengelusi kolom

kromatografi berdasarkan gradien, yaitu kepolaran rendah menuju kepolaran tinggi sehingga digunakan kombinasi antara n-heksana etil asetat maupun etil asetat metanol. Jumlah eluen dari tiap tingkat kepolaran ini sebanyak 200 ml. Eluen yang dipilih mengalami peningkatan kepolaran setiap sepuluh persen, yaitu dimulai dari n-heksana 100%, n-heksana-etil asetat 90:10, n-heksana-etil asetat 80:20, n-heksana-etil asetat 70:30, n-heksana-etil asetat 60:40, n-heksana-etil asetat 50:50, n-heksana-etil asetat 40:60, n-heksana-etil asetat 30:70, n-heksana-etil asetat 20:80, n-heksana-etil asetat 10:90, dilanjutkan dengan etil asetat 100%, etil asetat-metanol 90:10, etil asetat-metanol 80:20, etil asetat-metanol 70:30, etil asetat-metanol 60:40, etil asetat-metanol 50:50, etil asetat-metanol 40:60, etil asetat-metanol 30:70, etil asetat-metanol 20:80, etil asetat-metanol 10:90, dan metanol 100%. Jadi, elusi oleh kolom kromatografi tipe dipercepat ini memiliki 21 fraksi berdasarkan eluen yang digunakan.

Setelah fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom tipe dipercepat berada pada kondisi yang cukup pekat, setiap fraksi tersebut diamati pola kromatogramnya pada lempeng KLT berdasarkan fluoresensi pada sinar UV 254 dan 366 nm. Dua puluh satu fraksi yang diperoleh ditotolkan pada lempeng KLT. Dua belas fraksi dielusi oleh campuran eluen n-heksana-etil asetat 7:3, sedangkan sembilan fraksi lainnya dielusi oleh campuran etil asetat-metanol 7:3. Berdasarkan kemiripan pola kromatogram antara fraksi-fraksi tersebut, fraksi 1 hingga 12 digabungkan menjadi 5 fraksi, dinamakan CM<sub>1</sub>, CM<sub>2</sub>, CM<sub>3</sub>, CM<sub>4</sub>, CM<sub>5</sub>, dan fraksi 13 hingga 21 digabungkan menjadi 4 fraksi, dinamakan CM<sub>6</sub>, CM<sub>7</sub>, CM<sub>8</sub>, CM<sub>9</sub>. Pola kromatogram fraksi gabungan ini dapat dilihat pada Gambar 4.3. Sembilan fraksi ini kemudian diuji aktivitas antioksidannya, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Berat tiap fraksi yang diperoleh dari fraksinasi ekstrak aktif melalui kolom dipercepat dapat dilihat pada Tabel 4.4.

#### **4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Ekstrak**

Fraksinasi melalui kolom kromatografi menghasilkan 21 fraksi yang kemudian dielusi pada lempeng KLT dengan eluen yang sesuai. Berdasarkan pengamatan fluoresensi bercak yang timbul pada panjang gelombang UV 366 nm, semua fraksi yang ada dapat digabungkan menjadi sembilan fraksi. Lalu, sembilan

fraksi ini diuji aktivitas antioksidan secara kualitatif seperti pada pengujian ekstrak. Sembilan fraksi ini dibuat dalam konsentrasi yang seragam, lalu ditotolkan pada kertas kromatografi dalam jumlah sama banyak. Setelah disemprot dengan larutan DPPH dalam metanol, akan tampak bercak yang berwarna putih hingga kekuningan dengan latar belakang warna ungu. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa dari kesembilan fraksi yang diuji, terdapat enam fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan. Hasil uji kualitatif ini dapat dilihat pada Gambar 4.4. Fraksi-fraksi aktif ini adalah fraksi CM<sub>4</sub>, CM<sub>5</sub>, CM<sub>6</sub>, CM<sub>7</sub>, CM<sub>8</sub>, CM<sub>9</sub>. Seperti pada pengujian ekstrak, keenam fraksi ini juga diuji menggunakan spektrofotometer. Pada proses optimasi panjang gelombang, larutan DPPH menunjukkan serapan optimum pada panjang gelombang 517 nm sehingga pengukuran serapan fraksi dilakukan pada panjang gelombang 517 nm (Gambar 4.5).

Hasil uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif fraksi ekstrak daun *C.frutescens* L. menunjukkan bahwa terdapat satu fraksi ekstrak yang paling aktif dari keenam fraksi lainnya, yaitu fraksi CM<sub>6</sub>. Fraksi ekstrak yang paling kuat aktivitas antioksidannya ini berasal dari elusi kolom kromatografi yang menggunakan eluen etil asetat-metanol 8:2 dan 7:3. Nilai IC<sub>50</sub> fraksi yang paling aktif ini adalah 72,07 µg/ml. Nilai IC<sub>50</sub> fraksi CM<sub>6</sub> lebih besar dari ekstrak metanol disebabkan pada ekstrak metanol masih banyak komponen yang beraktivitas sinergis sebagai antioksidan. Fraksinasi ekstrak membagi ekstrak ke dalam berbagai fraksi yang mengandung komponen yang lebih sederhana dibandingkan komponen ekstrak pada awalnya. Fraksinasi menyebabkan pemisahan komponen-komponen ekstrak yang semula bersinergi sehingga pada fraksi ekstrak mengandung komponen yang memiliki aktivitas antioksidan tertentu. Nilai IC<sub>50</sub> fraksi CM<sub>6</sub> sebesar 72,07 µg/ml menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat (Blois, 1958). Secara berturut-turut nilai IC<sub>50</sub> fraksi ekstrak dari yang paling aktif antara lain, 72,07; 95,28; 106,05; 116,29; 149,73 dan 353,31 µg/ml. Data uji kuantitatif fraksi ekstrak ini dirangkum dalam Tabel 4.3.

Fraksi teraktif ditotolkan pada beberapa lempeng KLT lalu dielusi bersamaan dengan campuran eluen yang dapat memisahkan bercak dengan baik, yaitu n-heksana-etil asetat 3:7. Setiap lempeng yang telah dikeringkan dan dilihat

fluoresensinya di bawah sinar ultraviolet lalu disemprot dengan pereaksi semprot yang berbeda-beda. Standar atau pembanding untuk tiap golongan yang diidentifikasi juga ditotolkan di samping fraksi teraktif. Pembanding untuk uji flavonoid adalah kuersetin, pembanding untuk uji alkaloid adalah piperin, pembanding untuk uji fenol adalah daun teh, pembanding untuk uji terpen adalah caryophily flos, pembanding untuk uji saponin adalah liquiritae radix, pembanding untuk uji antrakuinon adalah rhei radix. Lempeng disemprot dengan penampak bercak DPPH dalam metanol, alumunium (III) klorida 5% dalam metanol, Dragendorff, anisaldehyd-asam sulfat, vanillin-asam sulfat, kalium hidroksida, dan besi (III) klorida 10%. Hal ini bertujuan untuk menunjukkan golongan senyawa beraktivitas antioksidan secara spesifik. Elusi fraksi teraktif pada eluen n-heksana-etil asetat 3:7 menunjukkan pemisahan 5 bercak berfluoresensi di bawah sinar UV 366 nm dengan nilai Rf berturut-turut 0,13; 0,29; 0,38; 0,51; 0,53 (bercak 1 hingga 5) yang dapat dilihat pada Gambar 4.6.b. Pada lempeng yang disemprot DPPH terdapat 5 bercak berwarna putih hingga kuning dengan nilai Rf berturut-turut 0,13; 0,29; 0,38; 0,51; 0,53 (bercak 1 hingga 5) yang dapat dilihat pada Gambar 4.6.c. Berdasarkan penyemprotan lempeng oleh alumunium (III) klorida, bercak dengan nilai Rf 0,13; 0,29; 0,38; 0,51 diidentifikasi sebagai flavonoid karena menunjukkan fluoresensi kuning intensif di bawah sinar UV 366 nm (H. Wagner et al, 1984). Kuersetin (bercak 1') tampak pada Rf 0,65. Fluoresensi keempat bercak ini dapat dilihat pada Gambar 4.6.d. Bercak dengan nilai Rf 0,51 (bercak 1) juga menunjukkan hasil positif fenol pada penyemprotan lempeng oleh besi (III) klorida (Gambar 4.6.e). Daun teh menunjukkan pemisahan bercak dengan nilai Rf 0,14 (bercak 1') dan 0,2 (bercak 2').

#### **4.6 Penapisan Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Ekstrak**

Tujuan dilakukannya penapisan fitokimia adalah untuk mengidentifikasi golongan senyawa tertentu yang terdapat dalam ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol, dan fraksi ekstrak yang paling aktif dari daun *C. frutescens* L. Hasil penapisan fitokimia dapat digunakan untuk mengetahui jenis senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, baik pada ekstrak maupun fraksi ekstrak.



Identifikasi golongan senyawa pada ekstrak dilakukan menggunakan pereaksi kimia. Dari ketiga ekstrak yang diuji, yang menunjukkan hasil positif adalah terpen pada ekstrak n-heksana dan etil asetat, glikon pada ekstrak etil asetat dan metanol, serta flavonoid pada ekstrak metanol. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi ekstrak teraktif dilakukan menggunakan pereaksi kimia dan KLT. Hasil penapisan menunjukkan adanya flavonoid dan glikon pada fraksi ini. Keterangan lebih lanjut mengenai hasil penapisan dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Uji identifikasi alkaloid pada ekstrak dilakukan dengan pereaksi Mayer, Bouchardat, dan Dragendorff. Simplisia standar untuk uji identifikasi alkaloid adalah kulit batang kina. Hasil identifikasi alkaloid pada ketiga ekstrak dan fraksi teraktif adalah negatif karena tidak terbentuk endapan berwarna. Identifikasi fraksi teraktif dilanjutkan dengan elusi pada KLT oleh eluen diklormetan-metanol (85:15) lalu disemprot Dragendorff (H. Wagner et al, 1984). Sebagai standar alkaloid pada KLT, juga digunakan kulit batang kina. Setelah disemprot Dragendorff, fraksi teraktif tidak membentuk bercak berwarna jingga atau hasilnya negatif (Gambar 4.7).

Uji identifikasi flavonoid dilakukan dalam tiga rangkaian reaksi, yaitu reaksi dengan serbuk magnesium dalam asam klorida, serbuk zink dalam asam klorida, dan serbuk asam borat dan asam oksalat yang dilanjutkan dengan pengamatan pada sinar ultraviolet 366 nm. Simplisia standar untuk uji identifikasi flavonoid adalah daun gandarusa. Diantara ketiga ekstrak daun *C. frutescens* L. hanya ekstrak metanol yang memberikan hasil positif. Terbentuk larutan berwarna jingga kemerahan ketika direaksikan dengan serbuk zink dalam asam klorida dan larutan berwarna kuning ketika direaksikan dengan serbuk magnesium dalam asam klorida. Fraksi teraktif juga menunjukkan hasil positif, yaitu membentuk larutan berwarna merah muda pada reaksi dengan serbuk zink dan larutan berfluoresensi kuning kehijauan di bawah sinar UV 366 nm. Selain itu, fraksi teraktif diidentifikasi menggunakan lempeng KLT. Sebagai pembanding pada KLT, juga digunakan daun gandarusa. Fraksi teraktif dielusi menggunakan campuran eluen BAW (butanol-asam asetat glasial-*aquadest*) 4:1:5 (H. Wagner et al, 1984). Setelah lempeng dikeringkan, lempeng disemprot dengan larutan aluminium (III) klorida dan diamati fluoresensinya (Gambar 4.8). Hasil

pengamatan positif ditunjukkan melalui fluoresensi hijau kekuningan di bawah sinar ultraviolet 366 nm (Harborn, 1987).

Pada uji identifikasi terpen, ekstrak n-heksana dan etil asetat daun *C.frutescens* L. menunjukkan hasil positif terhadap penambahan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat yaitu pembentukan warna biru kehijauan. Hasil positif ditunjukkan melalui pembentukan warna biru kehijauan ataupun merah kehijauan (Farnsworth, 1966). Pembentukan warna yang terjadi pada simplisia standar terpen (bunga cengkeh) sendiri berupa merah kehijauan. Sedangkan uji identifikasi terpen pada fraksi teraktif menunjukkan hasil negatif. Identifikasi terpen pada fraksi teraktif dilanjutkan dengan KLT. Lempeng yang telah ditotol fraksi dielusi oleh campuran eluen n-heksana-etil asetat 7:3 kemudian disemprot larutan anisaldehyd-asam sulfat. Setelah itu, lempeng dipanaskan pada suhu 100-110°C selama 5 hingga 10 menit. Hasil positif terpen ditandai warna ungu atau kuning (H. Wagner et al, 1984). Pembacaan hasil diamati secara visual dibandingkan dengan warna bercak standar (Gambar 4.9). Hasilnya juga negatif seperti pada reaksi menggunakan pereaksi kimia.

Uji identifikasi tanin didasarkan atas reaksi pengendapan, yaitu zat tanin bereaksi membentuk endapan dengan larutan gelatin 10% karena tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1987). Simplisia standar yang digunakan pada uji tanin adalah daun jambu biji. Uji pendukung lainnya adalah uji fenol yaitu menggunakan  $\text{FeCl}_3$  1% akan membentuk warna biru-hitam atau hitam kehijauan yang disebabkan reaksi fenol dengan  $\text{Fe}^{3+}$  membentuk kompleks berwarna (Harborne, 1987). Semua ekstrak dan fraksi teraktif menunjukkan hasil negatif terhadap uji tanin, namun ekstrak metanol dan fraksi teraktif menunjukkan hasil positif terhadap uji fenol. Identifikasi fenol pada fraksi teraktif sendiri dilanjutkan menggunakan lempeng KLT. Standar yang digunakan adalah daun teh. Lempeng dielusi oleh campuran eluen BAW 4:1:5, kemudian disemprot dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  10% (H. Wagner et al, 1984). Pada lempeng yang telah dielusi dan disemprot diamati adanya bercak berwarna hijau kehitaman yang menandakan uji fenol positif (Gambar 4.10).

Uji identifikasi saponin dilakukan melalui pengocokan di mana ekstrak dilarutkan dalam 10 ml akuades panas, dikocok kuat selama sepuluh detik, lalu

ditunggu selama 10 menit dan ditambahkan satu tetes HCl 2 N. Simplisia standar yang digunakan adalah daun kumis kucing. Semua ekstrak dan fraksi teraktif menunjukkan hasil negatif. Selain itu, fraksi teraktif diuji menggunakan lempeng KLT. Lempeng dielusi dengan campuran eluen BAW 5:1:4 dan disemprot dengan larutan anisaldehyd-asam sulfat (H. Wagner et al, 1984). Setelah itu, lempeng dipanaskan pada suhu 100-110°C selama 5 hingga 10 menit. Hasil identifikasi negatif, yaitu bercak berwarna kehitaman berbeda dengan bercak standar yang berwarna keunguan (Gambar 4.11).

Uji identifikasi glikosida didasarkan pada reaksi hidrolisis antara gugus gula (glikon) dan aglikonnya melalui reaksi dengan asam yang disertai pemanasan. Keberadaan glikon akan ditandai dengan pembentukan cincin ungu pada batas di antara kedua lapisan cairan. Ekstrak etil asetat, metanol, dan fraksi teraktif menunjukkan hasil positif untuk uji ini.

Uji identifikasi antrakuinon didasarkan pada reaksi hidrolisis menggunakan asam sulfat yang disertai panas untuk memutus ikatan antara aglikon (antrakuinon) dan glikon (gula). Simplisia standar yang digunakan pada uji antrakuinon adalah rhei radix. Semua ekstrak dan fraksi teraktif memberikan hasil negatif.

Hasil identifikasi golongan senyawa pada ketiga ekstrak dan fraksi ekstrak teraktif daun *C. frutescens* L. menunjukkan terdapat senyawa terpen pada ekstrak n-heksana dan etil asetat, glikon pada ekstrak etil asetat, metanol, dan fraksi teraktif serta flavonoid pada ekstrak metanol dan fraksi teraktif.

**Tabel 4.5** Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Daun *Capsicum frutescens*, L

No.	Golongan Senyawa	Ekstrak n-Heksana	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Metanol	Fraksi Ekstrak Metanol
1.	Alkaloid	-	-	-	-
2.	Flavonoid	-	-	+	+
3.	Terpen	+	+	-	-
4.	Tanin	-	-	-	-
5.	Saponin	-	-	-	-
6.	Glikon	-	+	+	+
7.	Antrakuinon	-	-	-	-

Keterangan:

(+) : terdapat golongan senyawa tertentu

(-) : tidak terdapat golongan senyawa tertentu

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

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

- a. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun *Capsicum frutescens* L. menunjukkan nilai  $IC_{50}$  dari yang paling aktif yaitu ekstrak metanol, etil asetat, dan n-heksana berturut-turut sebesar 48,28; 105,08 dan 160,81  $\mu\text{g/mL}$ . Fraksi teraktif dari ekstrak metanol adalah fraksi keenam ( $CM_6$ ) dengan nilai  $IC_{50}$  72,07  $\mu\text{g/ml}$ .
- b. Hasil identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif daun *Capsicum frutescens* L. ( $CM_6$ ) menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid dan glikon.

#### **5.2 Saran**

Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol dan fraksi  $CM_6$  menunjukkan aktivitas antioksidan yang baik. Penelitian lebih lanjut terhadap fraksi  $CM_6$ , yaitu pemurnian akan menghasilkan isolat yang memiliki karakteristik serta kemampuan aktivitas antioksidan tertentu.

## DAFTAR ACUAN

- A.N., Saidu, and R., Garba. (2011). Antioxidant activity and phytochemical screening of five species of *capsicum* fruits. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics* (ISSN-2250-9941) Vol. 1(9): 237-241.
- Ahmad, I., Aqil, F., and Owais, M. (2006). *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs*. Jerman: Wiley-VCH, xv.
- Amelio, F. S. D'. (1999). *Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference*. USA: CRC Press, 2-5.
- Armstrong, D. (Ed). (2002). *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols*. New Jersey: Humana Press, 295.
- Aniszewski, T. (2007). *Alkaloid-Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications, and Ecological Role*. Amsterdam: Elsevier Science, 25-27.
- Blois, M. S. (1958). *Antioxidant Determinations By The Use Of A Stable Free Radical* oleh Nature 181: 1199- 1200.
- Departemen Kesehatan RI. (1979). *Material Medika Indonesia, cet.1, jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 43-45, 167-171.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Farmakope Indonesia jilid IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1061, 1063.
- Departemen Kesehatan RI. (1995). *Material Medika Indonesia jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 333-334.
- Departemen Kesehatan RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan, cet. 1*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 10-11.
- Ebadi, M. (2007). *Pharmacodynamics Basis of Herbal Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed. USA: Taylor and Francis Group, 195.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science* 55 (3), 226-276.

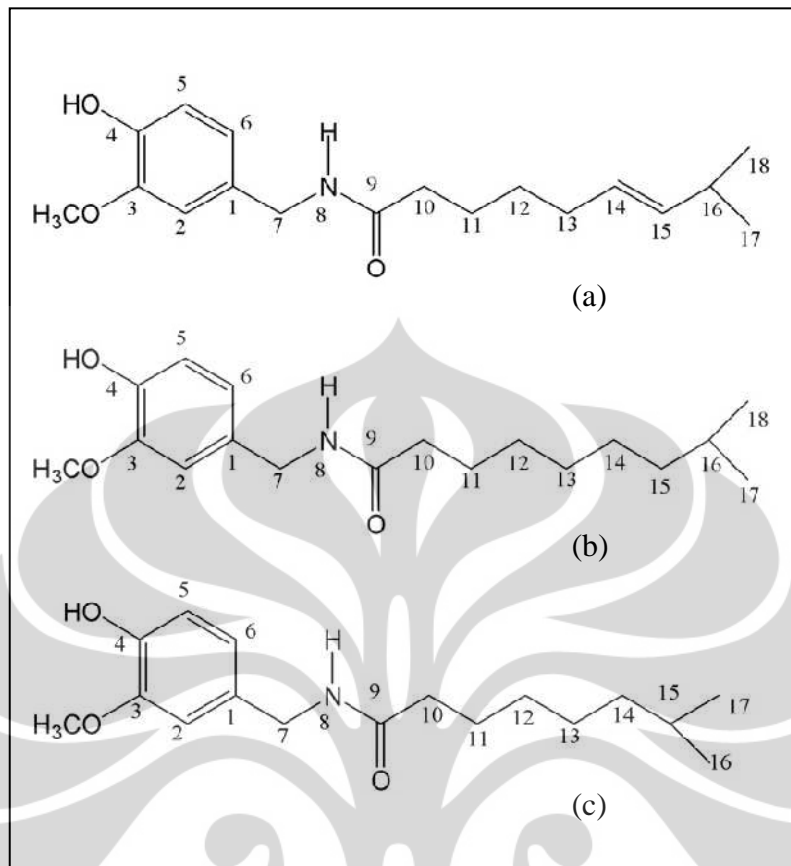
- Fried, B, and Sherma, J. (1999). *Thin Layer Chromatography 4<sup>th</sup> ed, revised and expanded*. USA: Marcel Dekker, 9-10.
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M., dan Schwarting, A. E. (1991). *Pengantar Kromatografi* Ed. 2 terjemahan Padmawinata.
- Halliwell, Barry. (2002). *Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo, Handbook of Antioxidant 2<sup>nd</sup> ed*. New York: Marcel Dekker, 9.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia. Ed II.*, Diterjemahkan Oleh Kosasi Patmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung : ITB.
- Jones, S. B and Luchsinger, A. E. (1987). *Plant Systematics 2<sup>nd</sup> edition*. Singapore: McGraw-Hill Book.
- Mason, P. (2007). *Dietary Supplement, 3<sup>rd</sup> ed*. London: Pharmaceutical Press, 8-9.
- Mitsui, T. (1997). *New Cosmetic Science, 1<sup>st</sup> ed*. Netherland: Elsevier Science, 35-37.
- Oboh, G., and Ogunraku, O. O. (2010). Cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain: Protective effect of hot short pepper (*Capsicum frutescens* L. var. abbreviatum). *Experimental and Toxicologic Pathology Journal* 62: 227–233
- Packer, L. M. , Hiramatsu, T., and Yoshikawa. (1999). *Antioxidant Food Supplement in Human Health*, Academic Press.
- Perucka, I., and Materska, M. (2001). Phenylalanine ammonia-lyase and antioxidant activities of lipophilic fraction of fresh pepper fruits *Capsicum annum* L. *Journal of Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 189-192.
- Sandor PS, Di Clemente L, Coppola G, et al. 2005. Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: A randomized controlled trial. *Neurology*. 64: 713–715.
- Shivappasad, H. N., Mohan, S., Kharya, M. D, Shiradkar, M. R., and Lakshman, K. (2005). *In- Vitro models for antioxidant activity evaluation: A review*. 20 Januari 2012.
- Skoog, D. A. and West, D. M. (1971). *Principles of Instrumental Analysis*. USA: Holt, Rinehart, and Winston, Inc, 72-75.

- Stahl, E., (1969). *Apparatus and general techniques in TLC*. Dalam : Stahl, E.(ed). *Thin layer chromatography a laboratory handbook*. Terj. Dari *Dunnschicht chromatographie*, Ashworth, M.R.F. Berlin: Springer-Verlag, 61-77.
- Sutamihardja, R.T.M., Citreksoko, P.S., Ossia, F., dan Wardoyo, S.E. (2006). Isolasi dan identifikasi senyawa fenol dari daun salam (*syzygium polyanthum*, Wight Walpers) sebagai senyawa antibakteri. *Jurnal Nusa Kimia*, 6(1), 48-60.
- Touchstone, J.C., and Dobbins, M. F. (1983). *Practice of thin layer chromatography*. Canada : JohnWiley & Sons, 2-12.
- Trease, G. E., and Evans, W.C. (1978). *Pharmacognosy 11<sup>th</sup> Edition*. London: Bailliere Tindall, 205-211.
- Wagner, H., Blatt, S., and Zgalnski, E. M. (1984). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer-Verlag, 54, 164, 226.
- Wiart, C. (2006). *Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and The Pasific*. USA: Humana Press, 45.
- Wangcharoen, W., and Morasuk, W. (2007). Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Chilies. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41: 561 – 569.
- Yu, L. (Ed). (2008). *Wheat Antioxidants*. Kanada: John Wiley and Sons, 120-147.



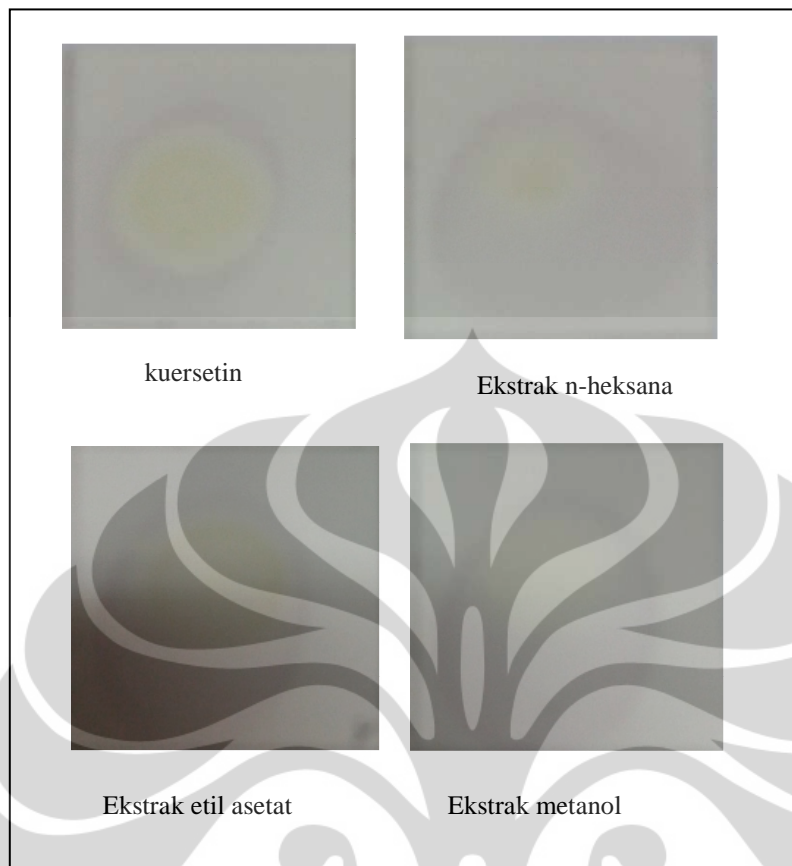


# **GAMBAR**

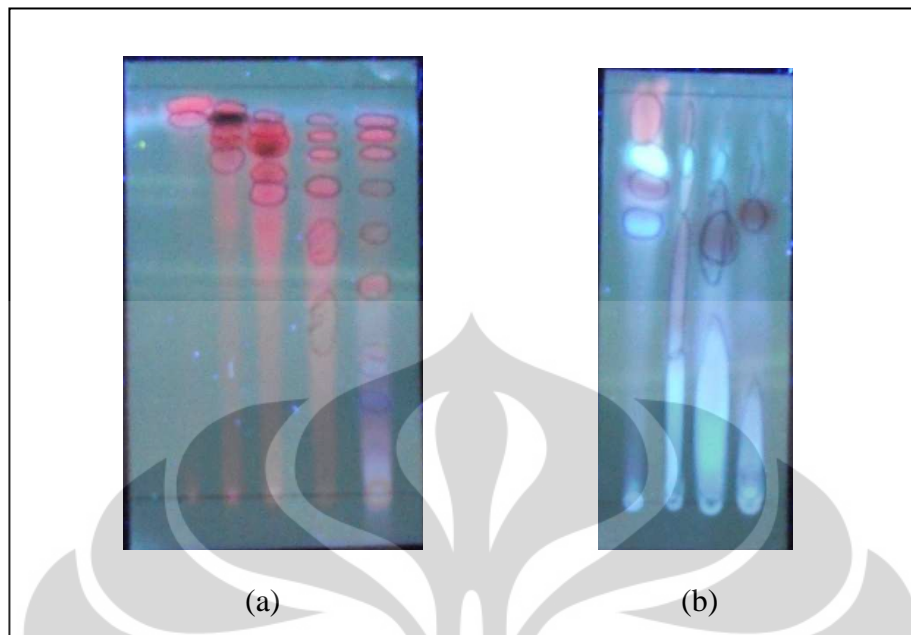


[Sumber: Fuwei Li et al., 2009]

**Gambar 2.2** Struktur Kimia (a) Kapsaisin, (b) Dihidrocapsaisin, dan (c) Nordihidrocapsaisin



**Gambar 4.1** Hasil Uji Kualitatif Ekstrak Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Setelah Disemprot DPPH

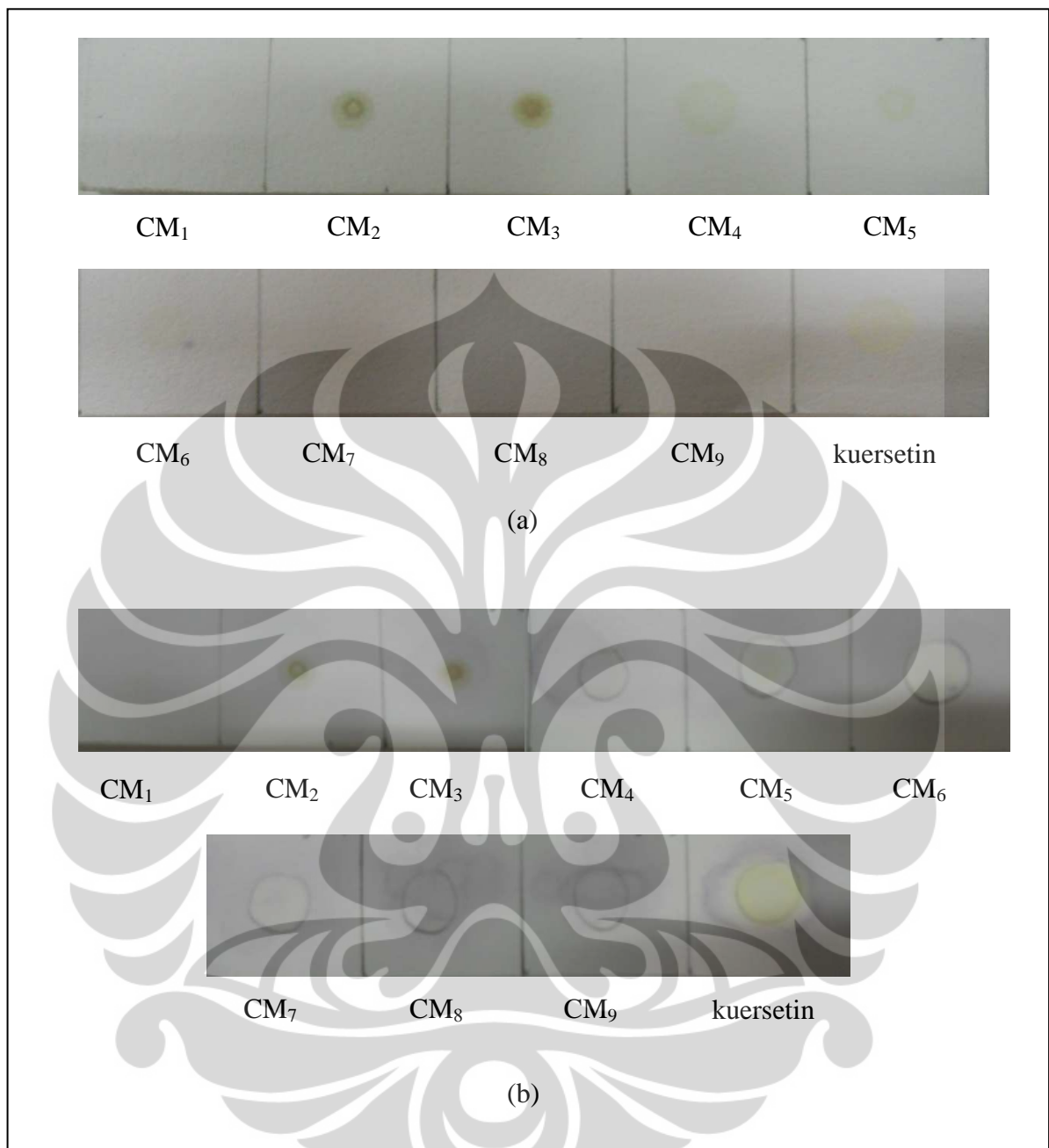


Keterangan:

(a) Profil KLT fraksi  $CM_1$ ,  $CM_2$ ,  $CM_3$ ,  $CM_4$ ,  $CM_5$  (n-heksana-etil asetat 7:3)

(b) Profil KLT fraksi  $CM_6$ ,  $CM_7$ ,  $CM_8$ ,  $CM_9$  (etil asetat-metanol 7:3)

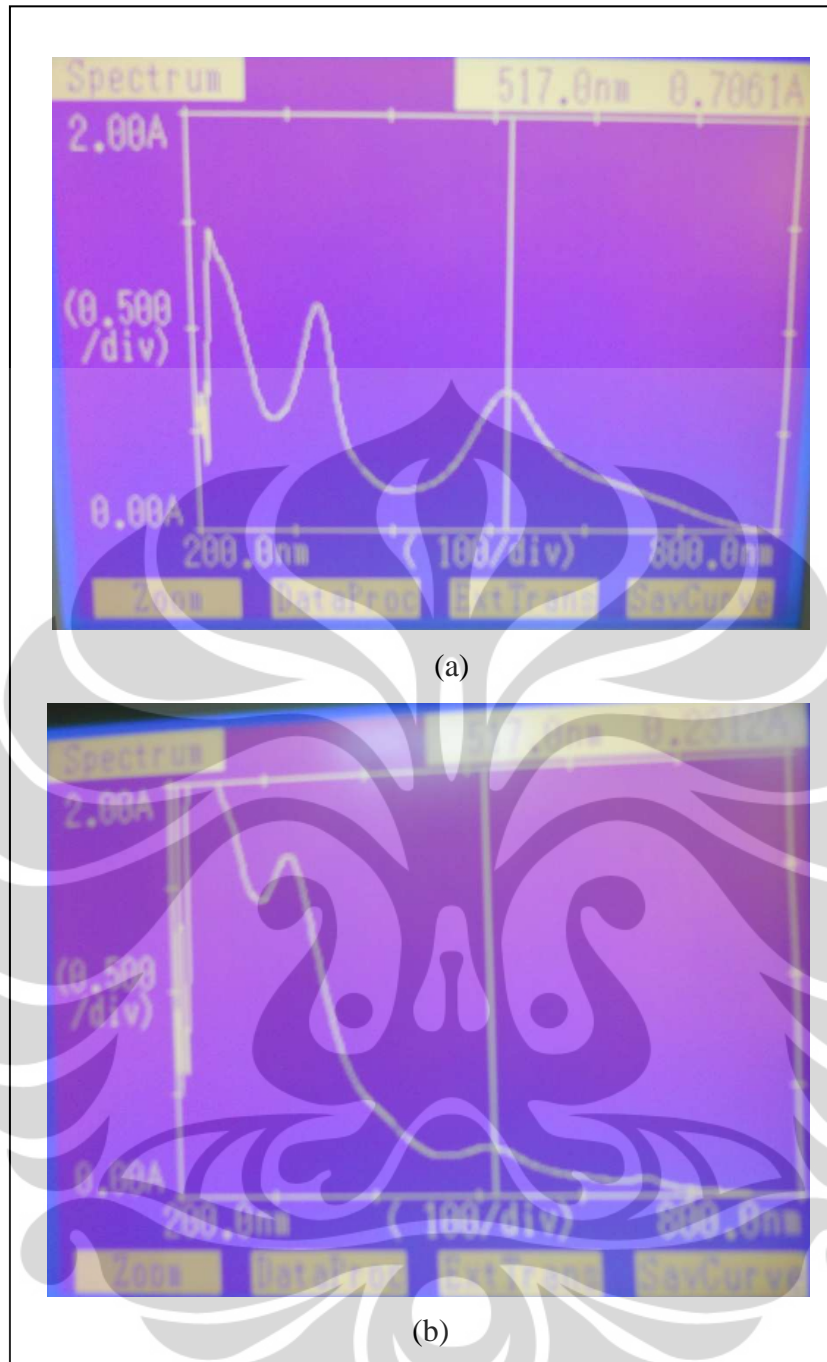
**Gambar 4.3** Profil KLT Fraksi Ekstrak Metanol dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Penampak Bercak Sinar UV 366 nm



Keterangan:

- (a) Fraksi CM<sub>1</sub> hingga fraksi CM<sub>9</sub> serta kuersetin (kiri ke kanan) sebelum disemprot DPPH  
 (b) Fraksi CM<sub>1</sub> hingga fraksi CM<sub>9</sub> serta kuersetin (kiri ke kanan) setelah disemprot DPPH

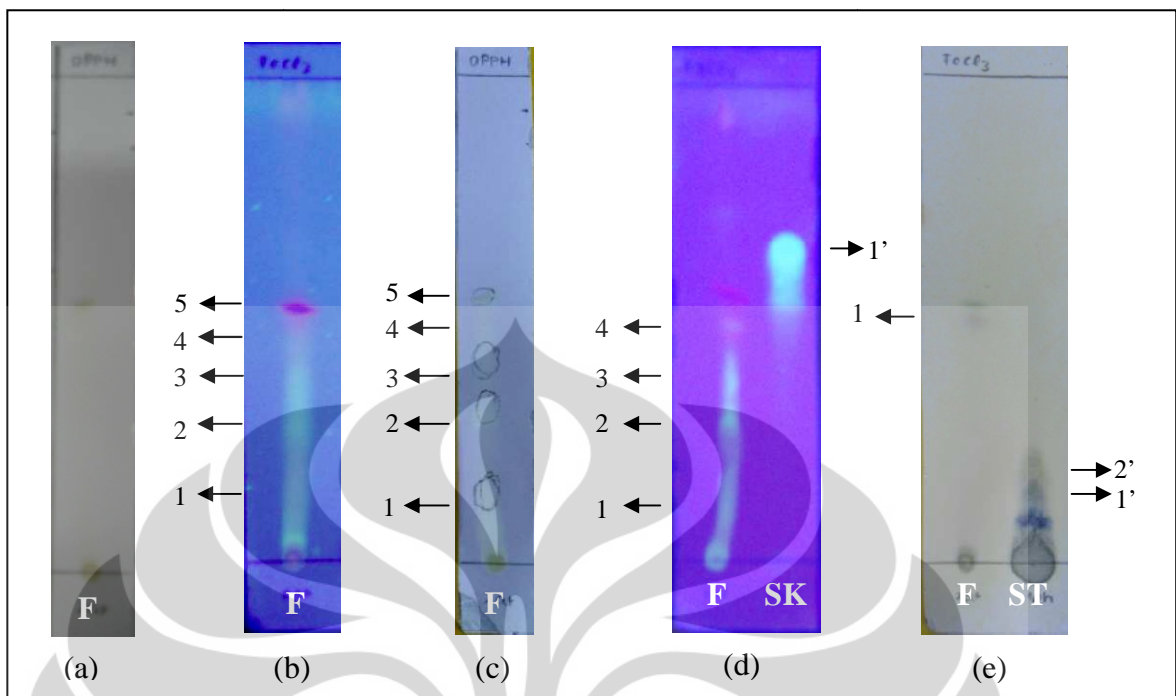
**Gambar 4.4** Hasil Uji Kualitatif Sembilan Fraksi Ekstrak Gabungan



Keterangan:

- Spektrum serapan larutan blanko DPPH dalam metanol pada pengujian fraksi ekstrak. Larutan blanko DPPH dalam metanol dengan konsentrasi dalam tabung 25,500  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan serapan sebesar 0,7061 yang diukur oleh spektrofotometer UV-Vis 1601 Shimadzu
- Spektrum serapan larutan DPPH yang ditambahkan larutan fraksi  $\text{CM}_6$  pada pengujian fraksi ekstrak. Larutan DPPH dalam metanol yang ditambahkan larutan fraksi  $\text{CM}_6$  dengan konsentrasi dalam tabung 109,500  $\mu\text{g/ml}$  menunjukkan serapan sebesar 0,2312 yang diukur oleh spektrofotometer UV-Vis 1601 Shimadzu

**Gambar 4.5** Spektrum Serapan Larutan DPPH pada Panjang Gelombang Optimum (517 nm)



Keterangan:

F : Fraksi  $CM_6$

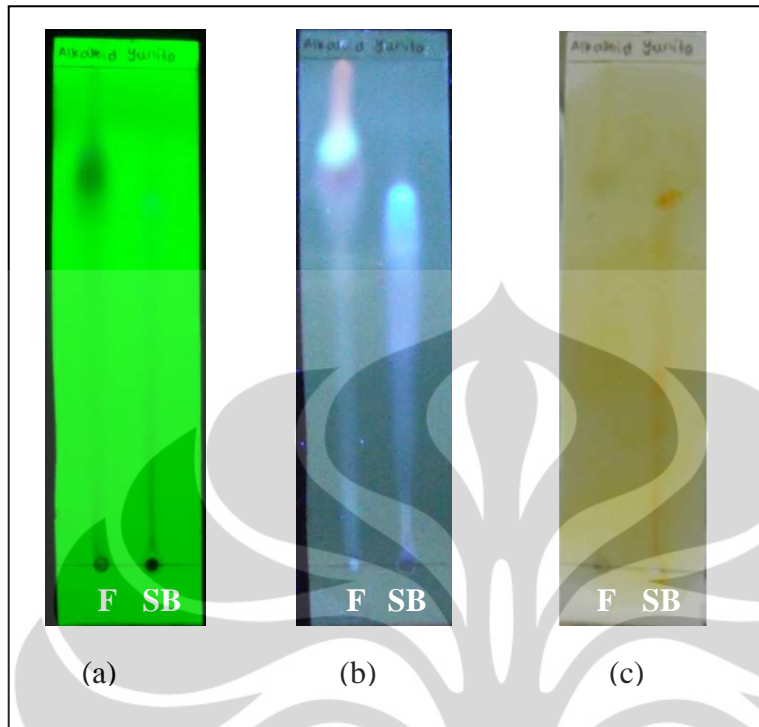
SK : Standar kuersetin

ST : Standar daun teh

Nomor 1 hingga 5 menunjukkan bercak yang terbentuk

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar biasa
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot DPPH dalam metanol, pengamatan pada sinar biasa
- Setelah disemprot  $AlCl_3$  5% dalam metanol, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot  $FeCl_3$  10%, pengamatan pada sinar biasa

**Gambar 4.6** Pola Kromatogram Fraksi  $CM_6$  dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Eluen n-Heksana-Etil Asetat 3:7



Keterangan:

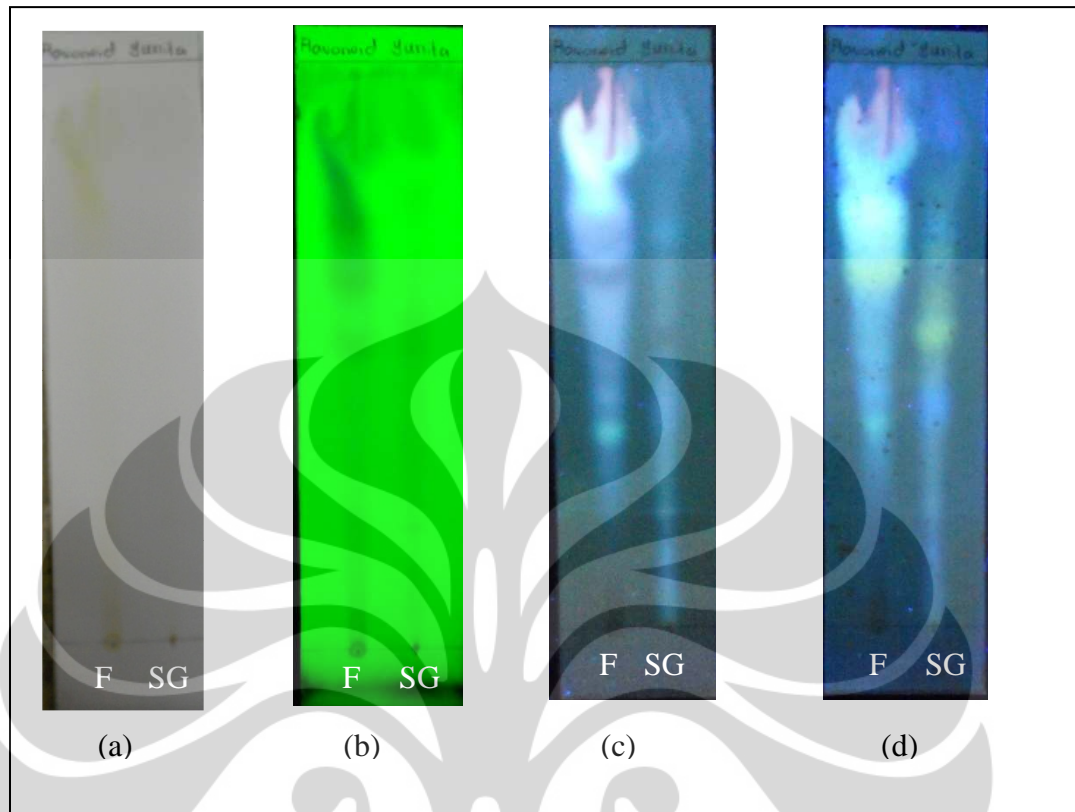
F : Fraksi  $CM_6$

SB : Standar kulit batang kina

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 254 nm
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot Dragendorff, pengamatan pada sinar biasa

**Gambar 4.7** Hasil Identifikasi Golongan Alkaloid Fraksi  $CM_6$  dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Eluen Diklormetan-Metanol 85:15



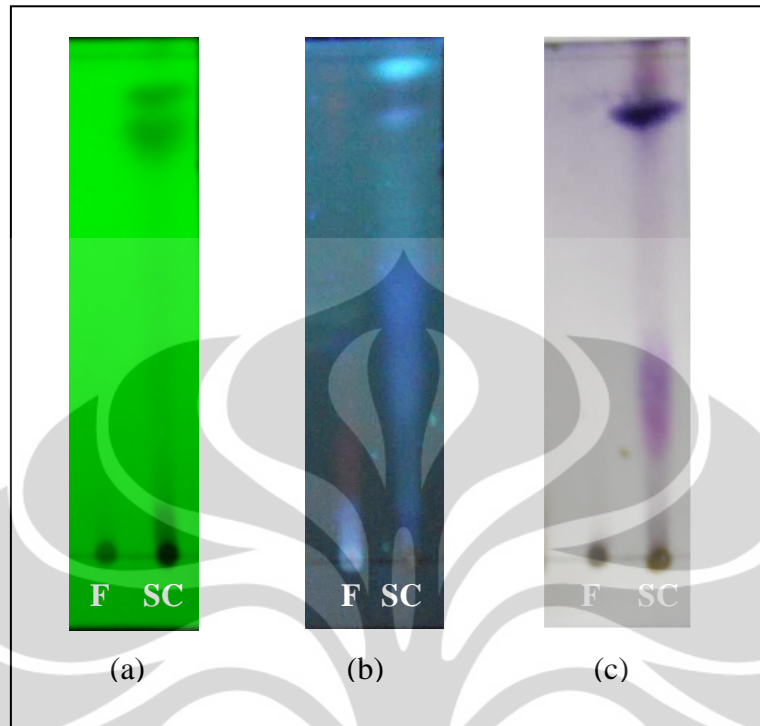


Keterangan:

F : Fraksi  $CM_6$   
 SG : Standar daun gandarusa

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar biasa
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 254 nm
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot  $AlCl_3$ , pengamatan pada sinar UV 366 nm

**Gambar 4.8** Hasil Identifikasi Golongan Flavonoid Fraksi  $CM_6$  dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Eluen BAW 4:1:5



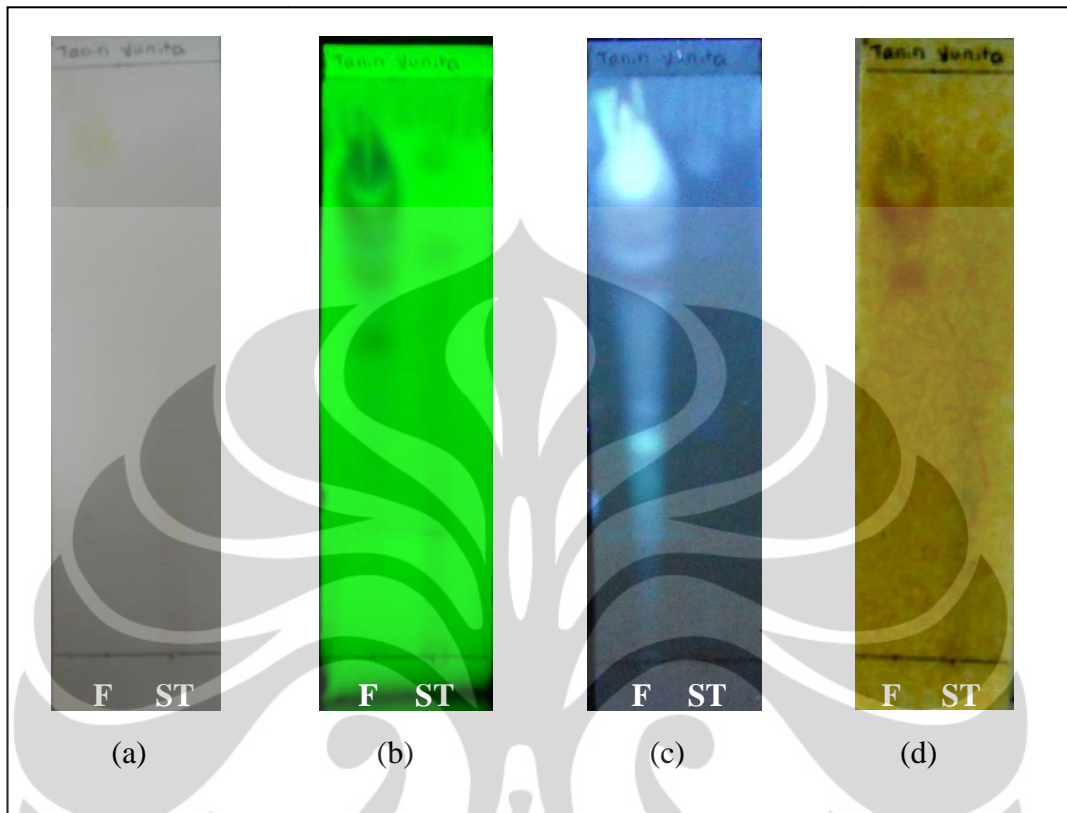
Keterangan:

F : Fraksi CM<sub>6</sub>

SC : Standar bunga cengkeh

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 254 nm
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot anisaldehyd-asam sulfat, pengamatan pada sinar biasa

**Gambar 4.9** Hasil Identifikasi Golongan Terpen Fraksi CM<sub>6</sub> dengan Fase Diam Silika Gel F<sub>254</sub> dan Eluen n-Heksana-Etil Asetat 7:3

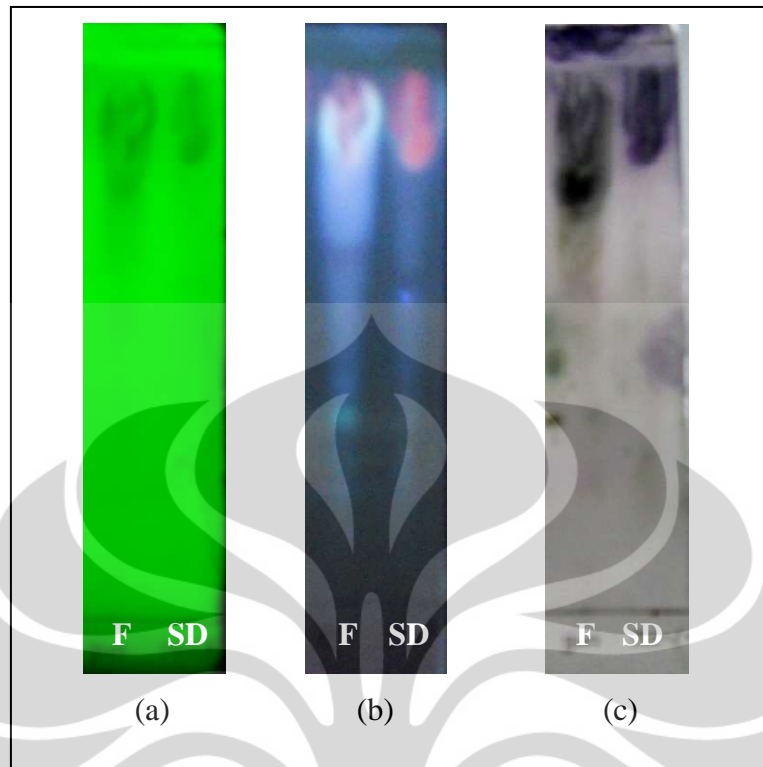


Keterangan:

F : Fraksi  $CM_6$   
 ST : Standar daun teh

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar biasa
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 254 nm
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot  $FeCl_3$ , pengamatan pada sinar biasa

**Gambar 4.10** Hasil Identifikasi Golongan Fenol Fraksi  $CM_6$  dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Eluen BAW 4:1:5



Keterangan:

F : Fraksi  $CM_6$

SD : Standar daun kumis kucing

- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 254 nm
- Sebelum disemprot, pengamatan pada sinar UV 366 nm
- Setelah disemprot anisaldehyd-asam sulfat, pengamatan pada sinar biasa

**Gambar 4.11** Hasil Identifikasi Golongan Saponin Fraksi  $CM_6$  dengan Fase Diam Silika Gel  $F_{254}$  dan Eluen BAW 5:1:4



**Tabel 4.1** Data Rendemen Ekstrak Daun *Capsicum frutescens* L.

No.	Ekstrak	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen Ekstrak (%)
1.	Ekstrak n-Heksana	40,8	4,07
2.	Ekstrak Etil Asetat	23,0	2,29
3.	Ekstrak Metanol	170,88	17,05

**Tabel 4.2** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Capsicum frutescens* L.

Sampel	Absorbansi Blanko	Larutan Uji		% Inhibisi	Persamaan linier	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
		Konsentrasi dalam tabung (µg/ml)	Absorbansi			
Kuersetin	0,5680	0,250	0,4880	14,08	y = 40,58x + 3,603 R <sup>2</sup> = 0,996	1,14
		0,500	0,4410	22,36		
		0,750	0,3690	35,04		
		1,000	0,3170	44,19		
		1,250	0,2510	55,81		
		1,500	0,2090	63,20		
Ekstrak n- Heksana	0,5680	25,300	0,4950	12,85	y = 0,269x + 6,743 R <sup>2</sup> = 0,981	160,81
		37,950	0,4720	16,90		
		50,600	0,4550	19,89		
		63,250	0,4250	25,18		
		75,900	0,4080	28,17		
		101,200	0,3820	32,75		
Ekstrak Etil Asetat	0,5680	25,600	0,4720	16,90	y = 0,414x + 6,496 R <sup>2</sup> = 0,979	105,08
		38,400	0,4480	21,13		
		51,200	0,4140	27,11		
		64,000	0,3630	36,09		
		76,800	0,3480	38,73		
		102,400	0,2980	47,54		
Ekstrak Metanol	0,5680	6,475	0,5210	8,27	y = 0,988x + 2,295 R <sup>2</sup> = 0,995	48,28
		12,950	0,4900	13,73		
		25,900	0,4050	28,70		
		38,850	0,3250	42,78		
		51,800	0,2600	54,23		
		64,750	0,2020	64,44		

**Tabel 4.3** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi Ekstrak Metanol  
*Capsicum frutescens* L.

Sampel	Absorbansi Blanko	Larutan Uji		% Inhibisi	Persamaan linier	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
		Konsentrasi dalam tabung (µg/ml)	Absorbansi			
Fraksi CM <sub>4</sub>	0,7061	42,600	0,6919	2,01	$y = 0,161x - 6,883$ $R^2 = 0,900$	353,31
		85,200	0,6718	4,86		
		106,500	0,6564	7,04		
		127,800	0,5902	16,41		
		170,400	0,5576	21,03		
Fraksi CM <sub>5</sub>	0,6237	13,375	0,6182	0,88	$y = 0,470x - 4,657$ $R^2 = 0,989$	116,29
		26,750	0,5715	8,37		
		38,520	0,5387	13,63		
		53,500	0,4845	22,32		
		64,200	0,4750	23,84		
Fraksi CM <sub>6</sub>	0,7061	36,500	0,5099	27,79	$y = 0,507x + 13,46$ $R^2 = 0,946$	72,07
		54,750	0,3789	46,34		
		73,000	0,3456	51,06		
		87,600	0,2954	58,16		
		109,500	0,2312	67,26		
Fraksi CM <sub>7</sub>	0,6237	24,000	0,5861	6,03	$y = 0,551x - 2,497$ $R^2 = 0,935$	95,28
		32,000	0,4987	20,04		
		60,000	0,4252	31,83		
		72,000	0,3899	37,49		
		80,000	0,3754	39,81		
Fraksi CM <sub>8</sub>	0,6237	24,300	0,5360	14,06	$y = 0,463x + 0,899$ $R^2 = 0,958$	106,05
		32,400	0,5219	16,32		
		40,500	0,5118	17,94		
		60,750	0,4578	26,60		
		72,900	0,4147	33,51		
Fraksi CM <sub>9</sub>	0,6237	20,400	0,5801	6,99	$y = 0,331x + 0,440$ $R^2 = 0,991$	149,73
		27,200	0,5669	9,11		
		34,000	0,5481	12,12		
		51,000	0,5104	18,17		
		61,200	0,4998	19,87		
		68,000	0,4800	23,04		

**Tabel 4.4** Berat Fraksi Ekstrak Hasil Fraksinasi Kolom Dipercepat

No.	Fraksi Ekstrak	Berat Fraksi (g)
1.	Fraksi CM <sub>1</sub>	0,1400
2.	Fraksi CM <sub>2</sub>	0,2560
3.	Fraksi CM <sub>3</sub>	0,2437
4.	Fraksi CM <sub>4</sub>	0,5970
5.	Fraksi CM <sub>5</sub>	0,5797
6.	Fraksi CM <sub>6</sub>	6,9998
7.	Fraksi CM <sub>7</sub>	14,4483
8.	Fraksi CM <sub>8</sub>	7,5851
9.	Fraksi CM <sub>9</sub>	5,6633





# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman



**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
 ( Indonesian Institute of Sciences )  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
 ( Research Center for Biology )

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 15 Februari 2012

Nomor : 162 /IPH.1.02/If.8/II/2012  
 Lampiran : -  
 Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Yunita  
 NPM : 0806328202  
 Mhs. Univ. Indonesia  
 Fak. MIPA  
 Kampus UI Depok

Dengan hormat,

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

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Cabe Rawit	<i>Capsicum frutescens</i> L.	Solanaceae

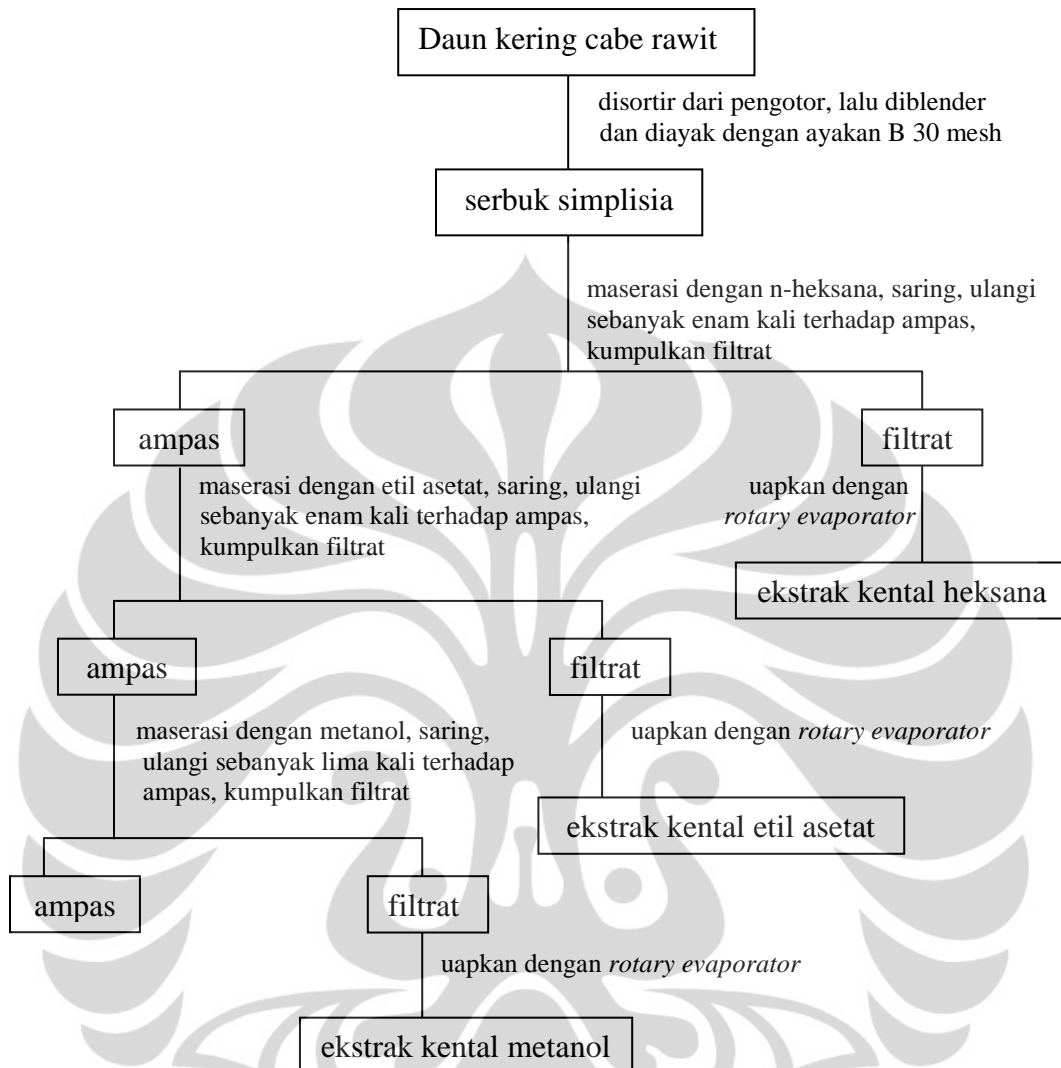
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

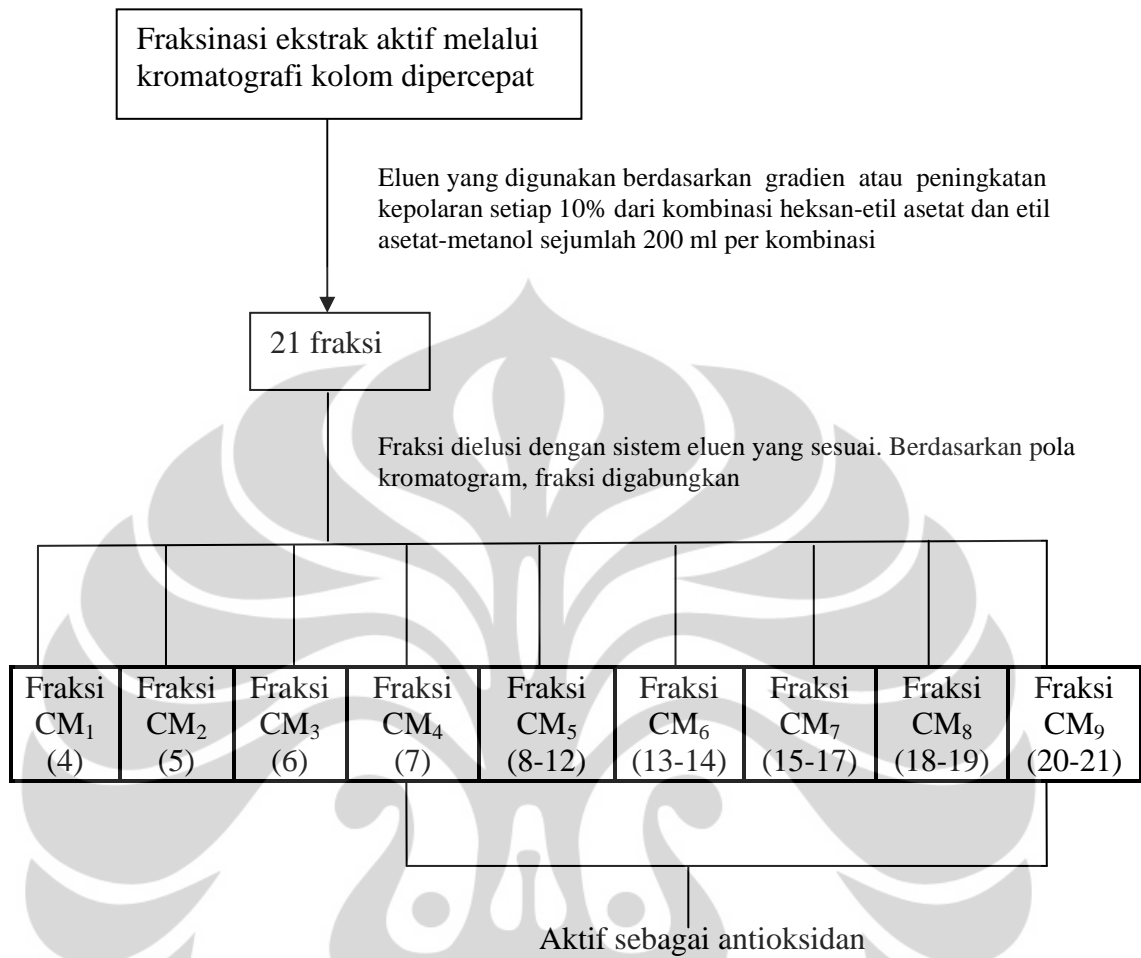


Dr. Joeni Setijoe Rahajoe  
 NIP. 196706241993032004

**Lampiran 2.** Bagan Ekstraksi dan Fraksinasi Daun *Capsicum frutescens* L.



(a) Bagan Ekstraksi Daun *Capsicum frutescens* L.



(b) Bagan Fraksinasi Daun *Capsicum frutescens* L.

**Lampiran 3. Sertifikat Analisis DPPH**

**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. Department

Date of issue : May 29, 2012

This is an electronically generated document

Issuing Number : 7847933