



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI  
DAUN *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. DENGAN METODE DPPH  
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

**KARTIKA FEBRIANI  
0806398354**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAN FRAKSI  
DAUN *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. DENGAN METODE DPPH  
DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA KIMIA DARI  
FRAKSI YANG AKTIF**

**SKRIPSI**

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

**KARTIKA FEBRIANI  
0806398354**

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

ii

## HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, 6 Juli 2012



Kartika Febriani

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : Kartika Febriani  
NPM : 08063983543  
Tanda Tangan : *Kartika*  
Tanggal : 6 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Kartika Febriani  
NPM : 0806398354  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi yang Aktif

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. (  )  
Pembimbing II : Rissyelly M.Farm., Apt. (  )  
Penguji I : Drs. Hayun, M.Si. (  )  
Penguji II : Dr. Berna Elya, Apt., M.Si. (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 9 Juli 2012

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis junjatkan kehadiran Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

Penulisan skripsi ini tidaklah mudah, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- (1) Dr. Katrin, M.S. dan Rissyelly M.Farm., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
- (2) Sutriyo S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi, FMIPA UI;
- (3) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M. Si, Apt, selaku Ketua Departemen Farmasi, FMIPA UI;
- (4) Bapak dan Ibu staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI atas ilmu pengetahuan dan bantuan yang telah diberikan selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi, FMIPA UI;
- (5) Dr. Katrin, M.S. selaku Kepala Laboratorium Fitokimia, laboran dan penanggung jawab Laboratorium Fitokimia serta staf pegawai Fakultas Farmasi UI yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi, FMIPA UI;
- (6) Kedua orang tua penulis yaitu Bapak Darmawan dan Ibu Nur Aswatin serta kakak penulis Alfira Kurniawati dan adik penulis Anindito Lazuardi yang telah memberikan bantuan dukungan materiil dan moral;
- (7) Dita Andriani, Trias Kusuma Dewi, Hastri Mahardika dan Khesia Ghassani Nusmara yang bersama-sama merasakan tangis sedih dan canda tawa selama di Farmasi;

- (8) Teman-teman di Laboratorium Fitokimia, Farmasi angkatan 2008 yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini; dan
- (9) Semua pihak yang turut membantu dan memberikan dukungan selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan skripsi.

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

Penulis

2012

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

---

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

Nama : Kartika Febriani  
NPM : 0806398354  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Farmasi  
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 Daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi yang Aktif.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 6 Juli 2012

Yang menyatakan



(Kartika Febriani)

## ABSTRAK

Nama : Kartika Febriani  
Program Studi : S1 Farmasi  
Judul : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif

*Cocculus orbiculatus* (L.) DC. yang dikenal sebagai tanaman cincau dan termasuk ke dalam suku Menispermaceae. Berdasarkan penelitian terdahulu diketahui jenis tanaman cincau lainnya memiliki aktivitas antioksidan, namun informasi dan penelitian mengenai tanaman *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. masih terbatas. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. serta identifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode peredaman radikal DPPH. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi bertingkat menggunakan pelarut dengan kepolaran meningkat, berturut-turut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak dengan aktivitas antioksidan tertinggi dengan cara kromatografi kolom vakum. Fraksi teraktif diidentifikasi kandungan kimianya dengan teknik KLT kecuali saponin dan glikon. Hasil uji peredaman radikal DPPH menunjukkan ekstrak teraktif yaitu ekstrak metanol yang mempunyai nilai  $IC_{50}$  74,32  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi teraktif yaitu fraksi G yang mempunyai nilai  $IC_{50}$  66,79  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil identifikasi fraksi G menunjukkan adanya flavonoid, tanin dan senyawa gula (glikon).

Kata Kunci : antioksidan, *Cocculus orbiculatus* (L.) DC., DPPH, fraksi, KLT, penapisan fitokimia.  
xiv + 55 halaman ; 11 gambar; 13 tabel; 3 lampiran  
Daftar Acuan : 32 (1963-2010)

## ABSTRACT

Name : Kartika Febriani  
Program Study : S1 Pharmacy  
Title : Antioxidant Activity Test from Extracts and Fractions of *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. Leaves by DPPH Method and Phytochemical Identification from The Active Fraction.

*Cocculus orbiculatus* (L.) DC. is common known as cincau plant from Menispermaceae family. The previous study showed that the other cincau plants have antioxidant activity, however there was a few information and investigation about *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. Therefore, this study presents antioxidant activity from extract and fractions of *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. leaves and identify chemical compounds from the active fraction. Antioxidant activity was determined by DPPH radical scavenging activity. Extraction was made by maseration using different solvents with increasing polarity, *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol. The most active extract was fractionated by vacuum colom chromatography method. The chemical compound of the most active fraction was identified using TLC except saponin and glycon. Antioxidant activity test shows the most active extract is methanolic extract with  $IC_{50}$  74,32  $\mu$ g/ml and the most active fraction is G fraction with  $IC_{50}$  66,79  $\mu$ g/ml respectively. Chemical identification shows G fraction containing flavonoids, tannins and glycon.

Key Words : antioxidant, *Cocculus orbiculatus* (L.) DC., DPPH, fractions, phytochemical screening, thin layer chromatography.

xiv + 55 pages ; 11 pictures; 13 tables; 3 appendices

Bibliography : 32 (1963-2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vi
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Jenis dan Metode Penelitian .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Cocculus orbiculatus</i> (L.) DC .....	4
2.2 Simplisia .....	6
2.3 Ekstraksi dan Ekstrak .....	6
2.4 Fraksinasi .....	8
2.5 Metabolit Sekunder .....	11
2.6 Antioksidan .....	13
2.7 Uji Aktivitas Antioksidan .....	14
2.8 Spektrofotometer UV-Vis .....	17
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>19</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	19
3.2 Alat .....	19
3.3 Bahan .....	19
3.4 Cara Kerja .....	20
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>28</b>
4.1 Penyiapan Bahan .....	28
4.2 Pembuatan Ekstrak .....	29
4.3 Penapisan Fitokimia Ekstrak .....	30
4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak .....	31
4.5 Fraksinasi .....	32
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi .....	33
4.7 Penapisan Fitokimia Fraksi yang Paling Aktif .....	34
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>36</b>
5.1 Kesimpulan .....	36
5.2 Saran .....	36
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>37</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tanaman <i>Cocculus orbiculatus</i> (L.) DC.....	5
Gambar 2.2.	Mekanisme peredaman radikal bebas oleh DPPH .....	15
Gambar 4.1.	Daun Tanaman <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	40
Gambar 4.2.	Simplisia daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	40
Gambar 4.3.	Spektrum serapan larutan DPPH konsentrasi 25 µg/ml pada pengujian ekstrak .....	41
Gambar 4.4.	Spektrum serapan larutan DPPH konsentrasi 25 µg/ml pada pengujian fraksi .....	41
Gambar 4.5.	Pola kromatogram identifikasi alkaloid fraksi G (G) dan standar Chinae Cortex (S), dengan eluen kloroform-metanol (85:15) .....	42
Gambar 4.6.	Pola kromatogram identifikasi flavonoid fraksi G (G) dan standar kuersetin (S), dengan eluen heksan-etil asetat (30:70) ..	43
Gambar 4.7.	Pola kromatogram identifikasi terpenoid fraksi G (G) dan standar Caryophilli Flos (S), dengan eluen heksan-etilasetat (70:30) .....	44
Gambar 4.8.	Pola kromatogram identifikasi tanin fraksi G (G) dan standar Teae Folium (S), dengan eluen heksan-etil asetat (30:70) .....	45
Gambar 4.9.	Pola kromatogram identifikasi antrakuinon fraksi G (G) dan standar Rhei radix (S), dengan eluen etil asetat-metanol-air (100:17:13) .....	46

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Susust pengeringan simplisia daun <i>Cocculus orbiculatus</i> (L.) DC.	47
Tabel 4.2.	Bobot ekstrak dan rendemen ekstrak .....	47
Tabel 4.3.	Hasil penapisan kimia ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	47
Tabel 4.4.	Hasil penapisan kimia golongan alkaloid ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	47
Tabel 4.5.	Hasil penapisan kimia golongan flavonoid ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	48
Tabel 4.6.	Hasil penapisan kimia golongan terpenoid ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	48
Tabel 4.7.	Hasil penapisan kimia golongan tanin ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	48
Tabel 4.8.	Hasil penapisan kimia senyawa gula ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	49
Tabel 4.9.	Hasil penapisan kimia golongan saponin ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	49
Tabel 4.10.	Hasil penapisan kimia golongan antrakuinon ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	49
Tabel 4.11.	Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	50
Tabel 4.12.	Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi dari ekstrak methanol daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	51
Tabel 4.13.	Hasil penapisan kimia fraksi teraktif (fraksi G) ekstrak metanol daun <i>C.orbiculatus</i> (L.) DC.....	52

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja .....	53
Lampiran 2. Surat Determinasi Tanaman .....	54
Lampiran 3. Sertifikat Analisis 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) .....	55



# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Antioksidan memiliki peran penting untuk menjaga kesehatan. Hal ini disebabkan oleh kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal bebas. Radikal bebas dapat dihasilkan oleh tubuh secara alami misalnya pada proses pernafasan. Radikal bebas dapat diartikan sebagai molekul kimia yang kekurangan elektron atau tidak memiliki elektron berpasangan. Sehingga, membuat radikal bebas bersifat sangat reaktif untuk mencari pasangan elektron agar konfigurasinya menjadi stabil. Radikal bebas terdiri dari berbagai macam spesies oksigen reaktif yang mampu menyerang membran lipid, asam nukleat, protein dan enzim. Hal ini dapat menghancurkan struktur sel-sel tubuh serta mengubah ukuran dan bentuknya. Kerusakan sel-sel tersebut pada akhirnya menimbulkan dampak merugikan bagi kesehatan (Shivaprasad, 2005).

Radikal bebas yang berlebihan dapat memicu beberapa penyakit serta mempercepat proses penuaan. Tubuh yang normal memiliki sistem pertahanan alami untuk menetralkan radikal bebas agar tidak berkembang menjadi berbahaya. Faktor eksogen seperti radiasi ultraviolet, polusi, asap rokok dan pestisida dapat membuat sistem pertahanan tubuh tidak mampu menghadapi radikal bebas yang berjumlah besar. Mengonsumsi antioksidan membantu tubuh untuk menetralkan radikal bebas berbahaya, karena antioksidan berperan menetralkan radikal bebas dengan memberikan elektron sehingga membuat radikal bebas stabil. Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Shivaprasad, 2005; Rohdiana, 2001).

Antioksidan berdasarkan sumbernya terdiri dari dua golongan yaitu antioksidan sintetik, misalnya *butylated hydroxytoluen* (BHT) dan *butylated hydroxyanisole* (BHA), dan antioksidan alami yang merupakan hasil isolasi bahan alam. Adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat

dibutuhkan (Rohdiana, 2001). Diperkirakan ada lebih dari 4.000 senyawa dalam makanan yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan yang paling banyak dipelajari adalah beta karoten (pro vitamin A), vitamin C, vitamin E, asam fenolik, selenium, klorofil, karotenoid, flavonoid, glutation, koenzim Q10, melatonin, dan likopen (Majalah Kesehatan, 2010).

Indonesia memiliki beragam tanaman yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami, diantaranya adalah jenis tanaman cincau. Terdapat empat jenis tanaman cincau yang telah dikenal dan dimanfaatkan masyarakat yaitu cincau hijau bulu rambat (*Cyclea barbata*), cincau perdu atau batang (*Premna oblongifolia*), cincau minyak (*Stephania hernandifolia*) dan cincau hitam (*Mesona palustris*). Terdapat pula satu jenis tanaman cincau yang belum dikenal dan dimanfaatkan secara luas oleh masyarakat yaitu cincau cina (*Cocculus orbiculatus* (L.) DC.). Secara tradisional tanaman cincau digunakan sebagai bahan baku minuman cincau yang berkhasiat sebagai penyegar, obat sakit perut, penyakit demam (PROSEA, 1999).

Pada penelitian terdahulu telah diketahui bahwa ekstrak daun cincau hijau bulu rambat (*Cyclea barbata* L. Miers) dan cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia* Merr) memiliki aktivitas antioksidan dan dapat memperbaiki berat hati dan aktivitas katalase (Chalid, 2003). Penelitian lainnya mengenai pengujian aktivitas antioksidan cincau minyak (*Stephania hernandifolia*) dengan metode peredaman radikal bebas DPPH dan superoksida menunjukkan harga IC<sub>50</sub> berturut-turut pada ekstrak etanol 265,33µg/ml dan 526,87µg/ml, dan pada ekstrak aqueous memberikan harga berturut-turut 217,90µg/ml dan 440,89µg/ml (Semwal, et.al, 2010). Informasi dan penelitian mengenai tanaman *C.orbiculatus* (L.) DC. masih terbatas, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antioksidan tanaman taersebut.

Penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. dengan menggunakan tiga jenis pelarut yaitu *n*-heksana, etil asetat dan metanol yang diharapkan dapat memberikan aktivitas antioksidan yang lebih baik. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode uji DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil).

## 1.2 Jenis dan Metode Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksplorasi dengan menggunakan metode pengukuran serapan radikal 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) tereduksi pada panjang gelombang 517 nm yang menggambarkan besar aktivitas suatu antioksidan dalam meredam radikal bebas.

## 1.3 Tujuan Penelitian

- a. Memperoleh fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dari ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.
- b. Mengetahui golongan senyawa kimia dari fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dari ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat melengkapi informasi aktivitas antioksidan dari tanaman *C. orbiculatus* (L.) DC., sehingga dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya dan dapat meningkatkan penggunaannya sebagai bahan obat.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Cocculus orbiculatus* (Keng; Lemmens et.al, 2003; Backer et.al, 1963)

*Cocculus orbiculatus* (L.) DC. merupakan salah satu tanaman cincau dan berasal dari satu suku yang sama dengan cincau hijau bulu rambat (*Cyclea barbata*) dan cincau minyak (*Stephania hernandifolia*).

#### 2.1.1 Klasifikasi

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Menispermaceae
Marga	: <i>Cocculus</i>
Jenis	: <i>Cocculus orbiculatus</i> (L.) DC.
Sinonim	: <i>Cocculus trilobus</i> (Thunberg) DC. <i>Cocculus sarmentosus</i> (Lour)

#### 2.1.2 Morfologi

Tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. merupakan terna yang merayap ke atas dan melilit ke kiri. Tanaman ini memiliki tinggi 2-10 meter. Akar tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. berbentuk kembang yang dalam keadaan kering di luar berwarna hitam dan di dalam seperti kayu. Batang tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. berukuran kecil kulitnya berwarna hijau. Daun tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. berbentuk lonjong dengan ujung dan pangkal yang lancip, memiliki panjang sekitar 10 cm dan lebar 5 cm. Daunnya berwarna hijau berkilat yang merupakan daun tunggal, tipis. Bunga tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. berukuran kecil-kecil yang tersusun dalam karangan bunga yang terletak di ujung ranting atau diketiak daun yang berada di bagian atas tanaman. Pada

setiap karangnya terdapat 12 tangkai bunga. Daun mahkota bunga berwarna putih tanaman *C.orbiculatus* (L.) DC. dapat dilihat pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1.** Tanaman *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

#### 2.1.3 Kandungan kimia

Berdasarkan penelitian ekstrak metanol batang dan akar *C.orbiculatus* (L.) DC. mengandung isolat alkaloid morfinan seperti sinokokulin dan isosinokokulin yang memiliki aktivitas antitumor. Kandungan ini menunjukkan aktivitas yang berarti dalam melawan Sarcoma 180 pada tikus. Ekstrak metanol dari kulit batang kering tanaman ini secara berarti menghambat perkecambahan *Echinochloa crus-galli* (L) P. Beauv., *Brassica rugosa* Prain dan ketimun (Lemmens dan Bunyapraphatsara, 2003)

#### 2.1.4 Ekologi, penyebaran dan budidaya

Tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. dapat tumbuh didaerah dataran rendah sampai ketinggian  $\pm 1500$  meter dari permukaan laut di pinggir laut. Secara liar, tanaman ini tumbuh ditepi hutan, lereng-lereng jurang, di semak-semak liar. Namun, ada juga yang membudidayakannya di pekarangan. Tanaman ini menyukai tempat yang agak ternaungi dan tumbuh merambat di tanaman perdu lain. Tanaman ini tersebar di daerah Nepal, India, Cina, Taiwan, Jepang, Vietnam, Hawaii, Indo-Cina Thailand, semenanjung Malaysia, Singapura, Timur laut Sumatera, Jawa Barat, Jawa tengah dan Filipina. Tanaman ini dapat dibudidayakan dengan stek batang, perundukan batang, dan tunas akar.

### 2.1.5 Manfaat

Di Vietnam batang tanaman ini digunakan sebagai diuretik untuk mengobati udem. Akarnya digunakan untuk mengobati epilepsi. Di Cina batang dan daunnya digunakan untuk mengobati flatulan, sakit perut dan udem. Di Thailand daunnya digunakan untuk membuat agar-agar (Lemmens dan Bunyaphatsara, 2003).

## 2.2 Simplisia (Depkes RI, 1995b)

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

## 2.3 Ekstrak dan Ekstraksi (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000)

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 (Depkes RI, 1995a). Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Metode ekstraksi ada berbagai macam, salah satunya adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut dengan cara dingin atau cara panas.

### 2.3.1 Cara dingin

#### a. Maserasi

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

#### b. Perkolasi

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

### 2.3.2 Cara panas

#### a. Refluks

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

#### b. Soxhlet

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

#### c. Digesti

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

d. Infus

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

e. Dekok

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

## 2.4 Fraksinasi

Metode yang umumnya digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa yaitu metode kromatografi. Untuk tujuan kualitatif dapat digunakan kromatografi lapis tipis (KLT) sedangkan untuk pemisahan senyawa dalam jumlah besar dapat digunakan kromatografi kolom.

### 2.4.1 Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi adalah metode pemisahan campuran menjadi berbagai komponennya berdasarkan keseimbangan heterogen yang terjadi selama Bergeraknya pelarut yang disebut fase gerak melewati fase diam untuk memisahkan dua atau lebih komponen dari materi yang dibawa oleh pelarut. Fase diam dapat berupa padatan atau cairan sedangkan fase gerak dapat berupa cairan atau gas.

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

#### 2.4.1.1 Fase diam

Fase diam adalah lapisan tipis penjerapan yang seragam atau media terpilih 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 almunium, sedangkan penjerap yang paling sering digunakan antara lain silika gel, alumina, tanah diatom dan selulosa (Touchstone dan Dobbins, 1983).

#### 2.4.1.2 Fase gerak

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

#### 2.4.1.3 Penyiapan dan penotolan sampel

Beberapa cara penyiapan sampel berupa pelarutan sampel, ekstraksi, kromatografi kolom, sentrifugasi dan penguapan dilakukan dengan tujuan membuat sampel siap untuk dianalisis secara kromatografi. Cara tersebut terkadang dilakukan bersamaan untuk mendapatkan sampel yang sesuai untuk kromatografi. Untuk sampel berupa ekstrak, penyiapan dapat dilakukan dengan kromatografi kolom dan partisi pelarut (Touchstone dan Dobbins, 1983). Campuran dilarutkan dan ditotolkan pada garis mulai berupa titik atau pita dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin.

#### 2.4.1.4 Pengembangan

Setelah sampel ditotolkan pada salah satu ujung lempeng, kemudian ujung tersebut dibenamkan dalam fase gerak dengan sampel di atas cairan. Gaya kapiler akan menyebabkan fase gerak bergerak melewati media dalam proses yang disebut pengembangan. Setelah fase gerak telah hampir mencapai ujung lainnya dari lempeng, maka lempeng dipindahkan dan dikeringkan sebelum prosedur pendeteksian. Pengembangan lapis tipis biasanya dilakukan dengan membiarkan

fase gerak bermigrasi pada lempeng didalam bejana dengan ukuran sesuai yang telah dijenuhkan (Touchstone dan dobbins, 1983).

#### 2.4.1.5 Metode Deteksi

Setelah lempeng dikeringkan, bercak yang terpisah dapat dideteksi dengan dua cara yaitu cara kimia dan fisika. Dari kedua jenis cara tersebut, masing-masing dapat dibedakan lagi menjadi metode destruktif dan non-destruktif (tidak memberikan perubahan permanen pada identifikasi kimia zat). Contoh untuk metode kimia destruktif adalah pengurangan dengan asam sulfat, sedangkan metode non-destruktif adalah dengan uap iodin. Contoh untuk metode fisik adalah pengamatan di bawah sinar UV banyak digunakan dan bersifat non-destruktif terhadap sebagai besar zat, walaupun pada beberapa vitamin dan steroid dapat bersifat destruktif (Touchstone dan dobbins, 1983). Derajat retensi dinyatakan dengan Rf yang digunakan untuk menyatakan posisi zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan :

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

#### 2.4.2 Kromatografi kolom

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

Pemisahan ini akan menghasilkan fraksi-fraksi yang kemudian ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang diperoleh dari kolom kromatografi dan memiliki profil KLT yang sama digabung kemudian pelarutnya diupakan sehingga akan diperoleh beberapa fraksi. Noda pada plat KLT dideteksi dengan lampu ultraviolet  $\lambda_{254}$  untuk senyawa-senyawa yang dapat berflororesensi dengan penampakan noda seperti larutan Iod,  $\text{FeCl}_3$  dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$

dalam metanol 10%. Selanjutnya, dilakukan proses pemurnian bila ingin mendapatkan senyawa murni hasil isolasi.

## **2.5 Metabolit Sekunder (Harborne, 1987)**

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Pemeriksaan dilakukan untuk penentuan senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan, seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, glikosida, saponin dan kuinon.

### **2.5.1 Alkaloid**

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

### **2.5.2 Flavonoid**

Flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air. Flavonoid dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak ini dikocok dengan eter minyak bumi. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambah basa atau amonia, sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau larutan. Umumnya, flavonoid terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida. Gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah, tepung sari, dan akar.

### 2.5.3 Terpenoid

Terpenoid adalah suatu senyawa yang berasal dari molekul isoprena  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$  dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan  $\text{C}_5$  ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap ( $\text{C}_{10}$  dan  $\text{C}_{15}$ ), diterpen yang lebih sukar menguap ( $\text{C}_{20}$ ) sampai ke senyawa 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.

### 2.5.4 Tanin

Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Menurut batasannya, tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air. Secara kimia terdapat dua jenis utama tanin 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.

### 2.5.5 Glikosida

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

### 2.5.6 Saponin

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

### 2.5.7 Kuinon

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

## 2.6 Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron, namun dalam arti biokimia adalah senyawa yang dapat menunda atau mencegah proses oksidasi makromolekul dengan cara menghambat tahap inisiasi dan propagasi pada reaksi rantai oksidatif sehingga dapat meredam dampak negatif oksidan. Dalam meredam dampak negatif oksidan terdapat dua kelompok antioksidan yaitu antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus rantai. Antioksidan pencegah yaitu antioksidan yang mencegah pembentukan radikal hidroksil yang bekerja pada tahap inisiasi. Contoh antioksidan pencegah adalah enzim katalase, superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, glutathion, sistein. Antioksidan pemutus rantai adalah antioksidan yang bekerja mencegah

reaksi rantai berlanjut dan bekerja pada tahap propagasi. Contoh antioksidan pemutus rantai adalah  $\beta$ -karoten, vitamin E dan vitamin C.

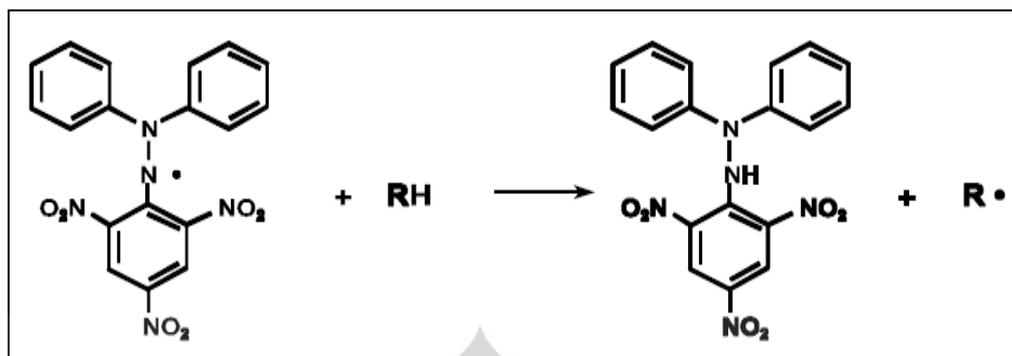
Berdasarkan jenisnya, antioksidan dapat digolongkan menjadi dua yaitu antioksidan endogen enzimatis dan non-enzimatis. Contoh antioksidan endogen enzimatis adalah superoksida dismutase, glutathion peroksidase dan katalase. Contoh antioksidan endogen non-enzimatis yaitu asam urat, glutathion, tiol, bilirubin, albumin. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi antioksidan alami dan sintetik. Contoh antioksidan alami adalah senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam/bahan makanan seperti senyawa-senyawa turunan fenol, flavonoid, vitamin C dan E. Contoh antioksidan sintetik adalah *butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *tertbutylhydroxyquinone* (TBHQ).

## 2.7 Uji Aktivitas Antioksidan

Terdapat beberapa metode uji aktivitas antioksidan secara *in-vitro* diantaranya metode DPPH, aktivitas peredam radikal superoksida, aktivitas penghambat radikal hidroksil, metode kekuatan pereduksi, metode ABTS, kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC), metode FRAP, lipid peroksidasi mikrosomal atau uji asam tobarbiturat.

### 2.7.1 Metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil) (Antolovich et.al, 2001, Shivaprasad, 2005)

Pengukuran ini berprinsip pada reduksi larutan DPPH dalam metanol, suatu radikal bebas berwarna oleh peredam radikal bebas. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan (meredam) radikal DPPH dengan memantau absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer. Radikal DPPH merupakan radikal bebas dengan pusat nitrogen organik yang stabil berwarna ungu tua yang ketika tereduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan menjadi tidak berwarna.



[Sumber : Prakash *et al.*, 2001]

**Gambar 2.2.** Mekanisme peredaman radikal bebas oleh DPPH

### 2.7.2 Aktivitas peredaman radikal superoksida (Shivaprasad, 2005)

Uji peredaman radikal superoksida dikembangkan untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan hidrofilik untuk secara langsung bereaksi dengan radikal ini. Uji ini mengukur kemampuan antioksidan untuk berkompetisi dengan nitroblue tetrazolium (NBT) untuk meredam radikal superoksida. NBT yang berwarna kuning selama proses reduksi membentuk formazan yang berwarna biru yang diukur secara spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm.

### 2.7.3 Aktivitas penghambatan radikal hidroksil (Shivaprasad, 2005)

Kapasitas penghambatan radikal hidroksil suatu ekstrak berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidannya. Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan  $\text{Fe}^{3+}$  /askorbat/EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan menggunakan reaksi Fenton. Penghambatan radikal hidroksil dengan adanya antioksidan diukur. Pada salah satu metode radikal hidroksil yang dibentuk secara oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan DMSO (*dimethyl sulphoxyde*), untuk menghasilkan formaldehida. Formaldehida yang terbentuk memberikan warna kuning intensif dengan pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M dengan asam asetat 0,02 M dan asetil aseton 0,02 M dalam aquadest). Intensitas warna kuning yang terbentuk diukur secara spektroskopi pada panjang gelombang 412 nm, dibandingkan dengan blanko negatif. Aktivitas ini dinyatakan dengan penghambatan radikal hidroksil.

#### 2.7.4 Metode kekuatan pereduksi (Shivaprasad, 2005)

Metode ini berprinsip pada peningkatan serapan dari reaksi pencampuran. Peningkatan serapan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Pada metode ini campuran antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, trikloroasetat dan besi (III) klorida, yang diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan serapan dari reaksi menunjukkan penurunan kekuatan dari sampel.

#### 2.7.5 Metode ABTS (garam 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik acid) diamonium) (Antolovich et.al, 2001, Shivaprasad, 2005).

Metode peredaman radikal kation ABTS<sup>•+</sup> merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia. ABTS<sup>•+</sup> merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 734 nm pada waktu yang telah ditentukan dengan spektrofotometer.

#### 2.7.6 Kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC) (Shivaprasad, 2005)

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

### 2.7.7 Metode FRAP (Shivaprasad, 2005)

FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji tercepat dan sangat berguna untuk analisis rutin. Aktivitas antioksidan diukur dengan mengukur peningkatan serapan yang disebabkan oleh pembentukan ion  $\text{Fe}^{2+}$  dari pereaksi FRAP yang berisi TPTZ (2,4,6-tri-(2-pyridyl-s-triazine)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) serapannya diukur pada 595 nm.

### 2.7.8 Lipid peroksidasi mikrosomal atau uji asam tobarbiturat (Shivaprasad, 2005)

Uji TBA salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan isolasi mikrosom dari hati itkus dan induksi lipid peroksidasi dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$ , menyebabkan produksi sejumlah kecil malonaldehida (MDA). TBA bereaksi dengan MDA membentuk kromagen merah muda, yang dapat dideteksi secara spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

## 2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. Gelombang elektromagnetik atau bisa disebut radiasi elektromagnetik adalah sejenis energi yang disebarkan oleh suatu sumber cahaya dan bergerak lurus ke depan (kecuali kalau dibiarkan atau dipantulkan) dengan kecepatan yang sangat tinggi, dapat berupa cahaya tampak, panas radiasi, sinar X, sinar UV, gelombang mikro, dan gelombang radio. Bentuk energi radiasi dari REM mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). REM mempunyai vektor listrik dan vektor magnet yang bergetar dalam bidang-bidang yang tegak lurus satu sama lain dan masing-masing tegak lurus pada arah perambatan radiasi.

Spektrum serapan merupakan hubungan antara serapan dengan panjang gelombang dan umumnya digambarkan dalam bentuk grafik. Untuk mengidentifikasi suatu zat pada daerah ultraviolet umumnya dilakukan dengan menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut dan dengan kadar yang tertera seperti pada monografi, untuk menetapkan serapan maksimum atau

minimum. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa kadang-kadang perlu dibandingkan dengan pembanding kimia yang sesuai. Pembanding kimia tersebut dikerjakan dengan cara dan kondisi yang sama dengan zat yang diperiksa. Blanko digunakan untuk koreksi serapan yang disebabkan pelarut, pereaksi, sel ataupun pengaturan alat. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum atau yang tercantum dalam monografi.

Senyawa atau zat yang dapat diperiksa yaitu yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang dikenal dengan istilah kromofor. Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan mengabsorpsi radiasi sinar ultraviolet dan cahaya tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi yang dikenal dengan istilah auksokrom. Gugus auksokrom yaitu gugus yang mempunyai elektron non bonding dan tidak menyerap radiasi UV jauh, contohnya -OH, -NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -X.

Spektrofotometer UV-vis digunakan terutama untuk analisis kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisis kualitatif. Analisis kuantitatif dengan cara pembuatan kurva kalibrasi atau dengan menggunakan rumus Lambert-Beer. Analisis secara kualitatif dengan membandingkan  $\lambda$  maksimum, membandingkan serapan, daya serap, persen ekstingsi dan membandingkan spektrum serapannya. Spektrum serapan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis pelarut, pH pelarut, kadar larutan, tebal larutan dan lebar celah.

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia dan Laboratorium Kimia Farmasi Analisis Kualitatif Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, selama kurang lebih lima bulan, dari bulan Januari hingga Mei 2012.

### **3.2 Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lemari pengering, oven (Hotpack vacuum oven), timbangan analitik, peralatan maserasi, blender (Waring, USA), pengayak, penguap putar (Janke & Kunkel IKA, Jerman), alat kromatografi kolom, spektrofotometer UV-Vis (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd.), lempeng aluminium kromatografi lapis tipis (Merck, TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>), *chamber*, Spektrofotometer UV-Vis (Camag), sonikator (Elmasonic S 60 H), kuvet kuarsa (Merck), pipet mikro (Eppendorf), inkubator, rak tabung, *vortex-mixer* (Model VM-2000) dan alat-alat gelas.

### **3.3 Bahan**

#### **3.3.1 Bahan uji**

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cincau *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. yang diperoleh dari sekitar lingkungan perumahan Bukit Pamulang Indah, Pamulang Barat, Tangerang Selatan dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense (LIPI), Cibinong.

#### **3.3.2 Bahan kimia**

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *n*-heksana, etil asetat, dan metanol yang telah didestilasi; 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH); Kuersetin; Silika Gel 60H (Merck); Mayer LP, Bouchardat LP; Dragendorf LP; Asam Sulfat pekat p.a (Merck); Asam Klorida p.a (Merck); Serbuk Seng (Merck);

Asam Borat (Merck); Asam Oksalat (Merck); Dietil Eter p.a (Merck); Larutan Gelatin 10%; Larutan NaCl 10%; Natrium Klorida-Gelatin; Besi (III) Klorida 3%; Asam Asetat Anhidrat; Kloroform; Amoniak 10%; Dragendorff Spray Reagent, 4-Metoksibenzaldehid; Asam Asetat Glasial.

### 3.4 Cara Kerja

Cara kerja yang dilakukan pada penelitian ini melalui beberapa tahapan mulai dari penyiapan bahan, pembuatan ekstrak, fraksinasi, pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak serta penapisan fitokimia.

#### 3.4.1 Penyiapan bahan

Simplisia disiapkan dari daun cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. yang diperoleh dari sekitar lingkungan perumahan Bukit Pamulang Indah, Pamulang Barat, Tangerang Selatan. Daun cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. yang telah dikumpulkan, dicuci dan disortasi sebanyak 4 kg selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dan pengeringan dengan sinar matahari tidak langsung selama 5 hari dari pukul 07.00 sampai 12.00 dengan ditutup kain hitam. Setelah itu daun diserbukkan dengan mesin penggiling ukuran B30.

#### 3.4.2 Pembuatan ekstrak

Serbuk simplisia seberat 1 kg kering dimaserasi bersama pelarut dengan kepolaran yang meningkat terdiri dari: *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Maserasi dilakukan sampai filtrat terlihat perubahan warna (dilakukan pengulangan maserasi sampai lima kali) lalu filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dievaporasi dengan penguap putar (pada suhu 50°C) sehingga diperoleh ekstrak kental yang masih dapat dituang, lalu ekstrak dikeringkan pada suhu 40-50°C. Ekstrak yang diperoleh kemudian ditimbang. Pada ampas yang sudah dikeringkan dilakukan maserasi berturut-turut dengan pelarut etil asetat dan metanol dengan prosedur dan perlakuan yang sama akan diperoleh ekstrak etil asetat dan metanol.

### 3.4.3 Fraksinasi

Ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dilanjutkan pemisahan dengan kolom kromatografi vakum menggunakan eluen campuran *n*-heksana-etil asetat dilanjutkan dengan etil asetat-metanol dengan kepolaran yang meningkat. Fraksinasi dilakukan untuk mendapatkan fraksi-fraksi dari ekstrak teraktif yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan, sehingga didapatkan fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling aktif.

### 3.4.4 Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif

Sampel yaitu ekstrak atau fraksi dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Masing-masing sampel ditotolkan pada kertas *Whatman* kemudian disemprot dengan larutan DPPH dalam metanol dengan konsentrasi 100µg/ml. Kuersetin dengan konsentrasi 1000 µg/ml digunakan sebagai pembanding. Kertas dibiarkan beberapa menit, kemudian diamati bercak yang timbul pada lempeng. Bercak berwarna kuning atau putih dengan latar belakang ungu menunjukkan adanya komponen aktif yang menghambat radikal bebas DPPH (Sarker, Latif, dan Gray, 2006).

### 3.4.5 Uji aktivitas antioksidan ekstrak dengan metode DPPH

Pada masing-masing ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol dari daun cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. serta fraksi dari ekstrak teraktif diuji aktivitas antioksidan dengan metode Blois. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi Blois.

#### 3.4.5.1 Pembuatan larutan DPPH

Sejumlah 10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a, sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/ml. Larutan ini kemudian disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat baru.

#### 3.4.5.2 Optimasi panjang gelombang DPPH

Pencarian panjang gelombang optimum dilakukan dengan cara memipet 1000 µl methanol p.a kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan

ditambahkan 1000  $\mu\text{l}$  larutan DPPH konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Volume dicukupkan sampai 4 ml dengan metanol p.a. lalu dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 30 menit. Larutan ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 400 hingga 800 nm serta ditentukan panjang gelombang optimumnya.

#### 3.4.5.3 Pembuatan larutan blanko

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan cara memipet 1000  $\mu\text{l}$  metanol p.a kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1000  $\mu\text{l}$  larutan DPPH konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Volume dicukupkan sampai 4 ml dengan metanol p.a. lalu dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 30 menit.

#### 3.4.5.4 Pengukuran larutan kuersetin sebagai pembanding

- a. Pembuatan larutan induk kuersetin konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sejumlah 10 mg kuersetin ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a. kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya larutan kuersetin dibuat dalam berbagai konsentrasi (1; 2; 3; 4; 5; dan 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- b. Pembuatan larutan seri bahan uji, dipipet 1000  $\mu\text{l}$  larutan kuersetin konsentrasi 1; 2; 3; 4; 5; dan 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  masing-masing dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi, dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 1000  $\mu\text{l}$  larutan DPPH 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dalam metanol p.a. Volume dicukupkan sampai 4 ml dengan metanol p.a., dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 30 menit.
- c. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 517 nm.

#### 3.4.5.5 Pengukuran larutan uji ekstrak

- a. Pembuatan larutan induk bahan uji konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sejumlah 50 mg ekstrak ditimbang seksama dan dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a. kemudian dikocok hingga homogen. Selanjutnya larutan ekstrak dibuat dalam berbagai konsentrasi (100; 200; 300; 400; 500 dan 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

- b. Pembuatan larutan seri bahan uji, dipipet 1000  $\mu\text{l}$  larutan ekstrak konsentrasi 100; 200; 300; 400; 500 dan 600  $\mu\text{g/ml}$  masing-masing dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi, dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 1000  $\mu\text{l}$  larutan DPPH 100  $\mu\text{g/ml}$  dalam metanol p.a. Volume dicukupkan sampai 4 ml dengan metanol p.a., dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
- c. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 517 nm.

#### 3.4.5.6 Pengukuran larutan uji fraksi

- a. Pembuatan larutan induk bahan uji konsentrasi 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Selanjutnya larutan sampel dibuat dalam berbagai konsentrasi hingga harga persen inhibisi melewati 50%.
- b. Pembuatan larutan seri bahan uji, dipipet 1000  $\mu\text{l}$  larutan fraksi berbagai konsentrasi masing-masing dimasukkan ke dalam 6 tabung reaksi, dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 1000  $\mu\text{l}$  larutan DPPH 100  $\mu\text{g/ml}$  dalam metanol p.a. Volume dicukupkan sampai 4 ml dengan metanol p.a., dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
- c. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 517 nm

#### 3.4.5.7 Perhitungan

Persentase inhibisi ( $\text{IC}_{50}$ ) terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blanko} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blanko}} \times 100 \% \quad (3.1)$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan penghitungan secara regresi linier menggunakan persamaan:

$$y = A + Bx, \quad (3.2)$$

Keterangan: x = konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan y = presentase inhibisi (%).

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau  $\text{IC}_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai  $\text{IC}_{50}$  didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

#### 3.4.6 Penapisan fitokimia dengan pereaksi kimia

Pada ekstrak yang diperoleh dilakukan pemeriksaan kandungan kimia dengan beberapa pereaksi kimia antara lain untuk pereaksi alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, glikosida, saponin dan antrakuinon. Pemeriksaan kandungan kimia dapat pula dilakukan dengan menggunakan KLT yang disemprot dengan pereaksi kimia tertentu.

#### 3.4.6.1 Identifikasi alkaloid

Untuk mengidentifikasi alkaloid, ekstrak dilarutkan dengan etanol 96 % kemudian ditambahkan asam klorida encer 2N. Filtrat yang diperoleh disaring kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Bouchardat LP, Dragendorf LP, dan Solutio Iodii LP.

Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif Dragendorf LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Penambahan Bouchardat LP memberikan hasil positif jika terbentuk endapan coklat sampai hitam dan dengan penambahan solution iodii LP hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat (Depkes RI, 1979).

#### 3.4.6.2 Identifikasi flavonoid

- a. Sebanyak 0,5 gram ekstrak yang diuji dilarutkan dalam 1-2 ml etanol 96% kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 1 ml asam klorida encer 2N, didiamkan selama 1 menit lalu ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terbentuk warna merah intensif hal tersebut menunjukkan adanya flavonoid.
- b. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 1 ml etanol 96% kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavonoid. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.
- c. Sebanyak 1 gram ekstrak yang diuji diuapkan hingga kering. Sisanya dibasahkan dengan aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan asam oksalat P. Secara hati-hati dipanaskan diatas penangas air

dan hindari pemanasan yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 5 ml eter P. perubahan warna diamati dengan sinar UV 366 nm. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning (Depkes RI, 1979)

#### 3.4.6.3 Identifikasi terpenoid

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

#### 3.4.6.4 Identifikasi tanin

Sejumlah 1 gram ekstrak dilarutkan dengan aquadest panas lalu dikocok hingga homogen. Larutan kemudian ditambah 5 tetes natrium klorida 10% dan saring. Filtrat yang digunakan sebagai larutan percobaan. Larutan percobaan kemudian dibagi menjadi tiga bagian dan berturut-turut ditambahkan pereaksi gelatin 10%, natrium klorida-gelatin, besi (III) klorida 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan pada penambahan gelatin 10% dan natrium klorida-gelatin, sedangkan dengan penambahan besi (III) klorida 3% ditunjukkan dengan terbentuknya larutan biru kehitaman atau hijau kehitaman (Farnsworth, 1966)

#### 3.4.6.5 Identifikasi glikosida

Sebanyak 3 gram ekstrak yang diuji ditambahkan 15 ml 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<sup>0</sup>C. Sisa dilarutkan dengan 2 ml metanol P. Larutan ini sebagai larutan percobaan (Depkes RI, 1979)

##### a. Percobaan umum terhadap glikosida

Sebanyak 1 ml larutan percobaan diuapkan diatas penangas air, sisa dilarutkan dalam 5 ml asam asetat anhidrat kemudian ditambahkan 10 tetes asam sulfat pekat P, jika terbentuk warna biru atau hijau menunjukkan adanya terpen atau sterol (reaksi Liebermann-Buchard). 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 ) (Depkes RI, 1979)

b. Percobaan terhadap glikosida antrakuinon

Sebanyak 1 ml larutan percobaan diuapkan diatas penangas air. Residu ditambahkan 1 ml benzen P, dikocok dan didiamkan, kemudian lapisan benzen dipisahkan. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1-2 ml natrium hidroksida 2N kemudian didiamkan, lapisan benzen yang tidak berwarna dan lapisan air yang berwarna merah intensif menunjukkan adanya antrakuinon (Depkes, 1979).

#### 3.4.6.6 Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan 5 ml aquadest panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Depkes, 1979).

#### 3.4.7 Penapisan fitokimia dengan penampak noda

##### 3.4.7.1 Identifikasi alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen kloroform-metanol (85:15). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penampak noda Dragendorff LP. Hasil positif akan menunjukkan warna jingga-coklat (Wagner, Blatt, dan Zgainski, 1984).

##### 3.4.7.2 Identifikasi flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50). Selain itu, dilakukan pula elusi menggunakan eluen terbaik dimana bercak sampel terpisah yaitu heksan-etil asetat (3:7). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penampak noda  $\text{AlCl}_3$ . Hasil positif akan menunjukkan warna kuning pada sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

#### 3.4.7.3 Identifikasi terpenoid/steroid

Identifikasi terpenoid/sterol dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen heksan-etil asetat (70:30). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Hasil positif akan menunjukkan warna biru kuat, hijau, merah, atau coklat pada cahaya tampak setelah dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 5-10 menit (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

#### 3.4.7.4 Identifikasi tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen butanol-asam asetat glasial-aquades (40:10:50). Selain itu, dilakukan pula elusi menggunakan eluen terbaik dimana bercak sampel terpisah yaitu heksan-etil asetat (3:7) Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penampak noda larutan  $\text{FeCl}_3$  10%. Hasil positif menunjukkan warna hijau-kehitaman (Wagner, Bladt, dan Zgainski, 1984).

#### 3.4.7.5 Identifikasi antrakuinon

Identifikasi antrakuinon dilakukan dengan menotolkan sedikit sampel pada lempeng KLT kemudian lempeng dielusi dengan eluen etil asetat-metanol-aquades (100:17:13). Setelah elusi selesai lempeng disemprot dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Warna merah pada cahaya tampak atau flourosensi kuning di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm.

## **BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1 Penyiapan Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun dari tanaman cincau *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. seperti yang terlihat pada Gambar 4.1. Dasar pemilihan tanaman ini masih dimanfaatkan secara tradisional oleh masyarakat dan belum banyak penelitian mengenai tanaman ini, selain itu berdasarkan penelitian terdahulu diketahui bahwa tanaman cincau jenis lain memiliki aktivitas antioksidan. Tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. berasal dari suku Menispermaceae, yang diperoleh dari sekitar lingkungan perumahan Bukit Pamulang Indah, Pamulang Barat, Tangerang Selatan. Pada tanaman yang diperoleh dilakukan determinasi untuk memastikan bahwa tanaman tersebut sesuai dengan tanaman cincau *C.orbiculatus* (L.) DC. yang dimaksud. Hasil determinasi terlampir pada Lampiran 2. Bagian tanaman yang dipakai adalah daunnya dimana yang digunakan yaitu daun cincau yang sudah cukup tua.

Daun cincau yang telah dikumpulkan kemudian disortasi, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor, ditiriskan pada temperatur kamar dan ditimbang berat daun segarinya yaitu sekitar 4 kg. Selanjutnya, daun dirajang dengan cara dipotong menjadi berukuran lebih kecil untuk kemudian di keringkan. Daun dikeringkan dengan sinar matahari tidak langsung yaitu dijemur dengan ditutup kain hitam pada pukul 07.00 sampai 12.00 dan diangin-anginkan di udara terbuka dan terlindung dari sinar matahari langsung selama lima hari, kemudian dioven dengan suhu 50<sup>0</sup>C selama satu jam guna meratakan pengeringan. Pengeringan dengan bantuan matahari tidak langsung ini dilakukan agar kandungan kimia yang terdapat pada simplisia tidak rusak akibat pemanasan. Proses pengeringan dilakukan guna mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, karena pengurangi kadar air dapat mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia dari pembusukkan (Depkes RI, 1985).

Simplisia daun cincau yang sudah kering ditimbang untuk memperoleh berat daun kering guna menghitung persentase perbandingan berat daun kering

terhadap berat daun segar (penyusutan simplisia). Simplisia daun kering yang didapatkan yaitu 1,169 kg dengan nilai persen penyusutan simplisia yaitu 70,775%. Hasil persen air yang hilang dapat dilihat pada Tabel 4.1 Simplisia tersebut kemudian dibuat menjadi serbuk dengan menggunakan blender ukuran B30 sehingga didapatkan serbuk simplisia seperti terlihat pada Gambar 4.2. Kemudian serbuk simplisia disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya, untuk mencegah perusakan dan penurunan mutu.

#### 4.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia kering sebanyak 1,169 kg diekstraksi dengan cara dingin yaitu maserasi. Cara maserasi dipilih untuk mencegah kerusakan kandungan kimia yang tidak tahan terhadap pemanasan, selain itu cara ini mudah dilakukan. Ekstraksi dilakukan dengan cara bertingkat menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat, mulai dari pelarut non polar yaitu *n*-heksana, dilanjutkan dengan pelarut semi polar etil asetat dan terakhir dengan pelarut polar metanol. Ekstraksi bertingkat ini bertujuan untuk memperoleh langsung tiga jenis ekstrak yaitu ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol yang akan dibandingkan aktivitas antioksidannya.

Pelarut *n*-heksana dipilih karena sifatnya yang non-polar berguna untuk menarik senyawa-senyawa non-polar seperti triterpenoid, steroid, pigmen, dan lemak. Pelarut etil asetat memiliki sifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa-senyawa semipolar seperti klorofil, aglikon flavonoid, dan asam fenolat bebas. Sedangkan pelarut metanol memiliki sifat polar berguna untuk menarik senyawa-senyawa polar seperti alkaloid, kumarin, heterosida flavonoid, tanin, glikosida, saponin, dan senyawa polar lainnya.

Cara maserasi yang dilakukan yaitu pengocokan dengan bantuan *shaker* selama enam jam dan pendiaman pada suhu kamar selama delapan belas jam, kemudian hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dengan residu yang akan dimaserasi kembali. Maserasi dilakukan beberapa kali untuk memperoleh filtrat yang lebih banyak dan dihentikan bila sudah terjadi perubahan warna pada filtrat yang diperoleh. Maserasi awal dengan *n*-heksana menggunakan 2,5 liter *n*-heksana hingga semua serbuk terbasahi dan pelarut berada 2-3 cm diatas serbuk

simplisia. Remaserasi selanjutnya dengan *n*-heksana menggunakan 1,1 liter *n*-heksana. Setelah terjadi perubahan warna pada filtrat, serbuk dikeringkan guna penggantian pelarut ekstraksi yaitu etil asetat. Maserasi awal dengan etil asetat menggunakan 3 liter etil asetat hingga semua serbuk terbasahi dan pelarut berada 2-3 cm diatas serbuk simplisia. Remaserasi selanjutnya dengan etil asetat menggunakan 1,5 liter etil asetat. Setelah terjadi perubahan warna pada filtrat, serbuk dikeringkan guna penggantian pelarut ekstraksi yaitu metanol. Maserasi awal dengan metanol menggunakan 4 liter metanol hingga semua serbuk terbasahi dan pelarut berada 2-3 cm diatas serbuk simplisia. Remaserasi selanjutnya dengan metanol menggunakan 2 liter metanol hingga terjadi perubahan warna pada filtrat.

Masing-masing filtrat ditampung untuk selanjutnya dikentalkan dengan menggunakan penguap putar pada suhu 40-50°C hingga pelarut menguap dan ekstrak menjadi lebih kental tetapi masih dapat dituang. Selanjutnya ekstrak dikeringkan pada suhu 40-50°C untuk menghasilkan ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen dan kemudian disimpan dalam wadah yang tertutup. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal (Depkes RI, 2000). Ekstrak dan rendemen ekstrak hasil ekstraksi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 4.2.

### 4.3 Penapisan Fitokimia Ekstrak

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ketiga jenis ekstrak yang telah diperoleh yaitu ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Hal ini dilakukan guna mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat didalam masing-masing ekstrak tersebut. Penapisan yang dilakukan menggunakan pereaksi kimia dimana digunakan standar sebagai pembanding positif. Berdasarkan pengamatan diketahui ekstrak *n*-heksana mengandung terpenoid. Ekstrak etil asetat mengandung flavonoid, terpenoid, glikon dan saponin. Sedangkan ekstrak metanol mengandung flavonoid, terpenoid, tanin, glikon dan saponin. Hasil penapisan fitokimia ekstrak daun *C.orbiculatus* (L.) DC. terlihat pada Tabel 4.3. sampai 4.10.

#### 4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak

Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan menggunakan metode pengukuran serapan radikal DPPH tereduksi pada panjang gelombang 517 nm yang menggambarkan besar aktivitas suatu antioksidan dalam meredam radikal bebas. Metode ini dipilih karena secara teknis cara kerjanya mudah dan cepat dengan pengukuran aktivitas yang baik untuk berbagai senyawa terutama fenol. Metode perendaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari larutan metanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimalnya, yang mana sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan kepada larutan reagen DPPH. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai konsentrasi efektif (*Effective Concentration*),  $EC_{50}$  atau  $IC_{50}$  (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar dan Lakshman, 2005).

Uji aktivitas dilakukan terhadap ketiga ekstrak yaitu *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Sebelum dilakukan uji aktivitas secara kuantitatif dengan spektrofotometer, dilakukan uji aktivitas secara kualitatif menggunakan kertas *Whatman* dengan konsentrasi sampel sebesar 1000  $\mu\text{g/ml}$  dengan pereaksi semprot DPPH. Hasil uji kualitatif aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol memiliki aktivitas antioksidan, hal ini ditunjukkan dengan warna bercak putih sampai kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan peraksi DPPH. Uji pendahuluan ini dilakukan guna memberikan gambaran ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan.

Selanjutnya ketiga ekstrak diuji secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan mengukur konsentrasi penghambatan yang sebanding dengan kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas DPPH. Pertama, dilakukan optimasi panjang gelombang DPPH pada panjang gelombang 400 sampai 800 nm. Didapatkan DPPH memiliki panjang gelombang optimum pada 517 nm, terlihat pada Gambar 4.3., sehingga pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Kemudian dilakukan pembuatan larutan seri ekstrak dengan konsentrasi 100; 200; 300; 400; 500 dan 600  $\mu\text{g/ml}$  yang akan diukur serapannya pada panjang gelombang tersebut. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan terbesar

dibandingkan ekstrak etil asetat dan *n*-heksana. Nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak metanol yaitu 74,32  $\mu\text{g/ml}$ , ekstrak etil asetat yaitu 91,39  $\mu\text{g/ml}$  dan ekstrak *n*-heksana yaitu 163,51  $\mu\text{g/ml}$ . Sebagai pembanding digunakan kuersetin yang memiliki  $IC_{50}$  1,32  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil uji aktivitas ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.11.

Berdasarkan hasil uji tersebut, terlihat bahwa ekstrak metanol yang memiliki aktivitas antioksidan terbesar memiliki harga  $IC_{50}$  jauh lebih besar dibandingkan dengan kuersetin yaitu hampir mencapai enam puluh kalinya. Hal ini mungkin disebabkan karena kuersetin merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak masih berupa campuran berbagai senyawa. Berbagai senyawa yang terdapat didalam ekstrak metanol tersebut ada yang memiliki aktivitas antioksidan tetapi ada pula yang tidak, namun hal ini tidak menjamin senyawa murni yang terkandung didalam ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dari kuersetin.

#### 4.5 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbesar yaitu ekstrak metanol. Fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi menggunakan kolom dipercepat dengan bantuan vakum. Metode ini dipilih karena efisien dengan proses yang cepat dan menghasilkan pemisahan yang cukup baik. Kolom yang digunakan berdiameter 6,2 cm dengan tinggi 20 cm. Fase diam yang digunakan yaitu silika gel (Merck, silica gel 60H) seberat 120 gram dengan tinggi 12 cm. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran pelarut dengan kepolaran yang meningkat masing-masing 200 ml, *n*-heksana-etil asetat (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100) dilanjutkan dengan etil asetat-metanol (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100). Ekstrak yang digunakan seberat 20 gram dan diserbukkan dengan silika gel (Merck, silica gel). Pemisahan dengan kolom dipercepat ini menghasilkan dua puluh satu fraksi. Kemudian fraksi-fraksi tersebut dilihat pola kromatogramnya dengan KLT dengan menggunakan eluen heksana-etil asetat (7:3) dan etil asetat-metanol (7:3).

Pola kromatogram dilihat dari bercak yang timbul pada lempeng KLT yang telah dielusi baik diamati secara langsung maupun dibawah sinar ultraviolet

dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengamatan juga dilakukan dengan bantuan pereaksi kimia berupa  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% dalam metanol dimana setelah lempeng disemprot dipanaskan diatas pemanas  $100^\circ\text{C}$  selama 5 menit. Fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan pola kromatogram KLT digabungkan sehingga diperoleh sembilan fraksi gabungan. Fraksi 1-2 digabung menjadi fraksi A, fraksi 3 menjadi fraksi B, fraksi 4 menjadi fraksi C, fraksi 5 menjadi fraksi D, fraksi 6 menjadi fraksi E, fraksi 7-8 menjadi fraksi F, fraksi 9-12 digabung menjadi fraksi G, fraksi 13-16 digabung menjadi fraksi H, fraksi 17-21 digabung menjadi fraksi I. Kesembilan fraksi gabungan ini dikeringkan untuk selanjutnya di uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH.

#### 4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi

Uji aktivitas antioksidan dilakukan terhadap sembilan fraksi ekstrak metanol. Sebelum dilakukan uji aktivitas secara kuantitatif dengan spektrofotometer, dilakukan uji aktivitas secara kualitatif menggunakan kertas *Whatman* dengan konsentrasi sampel sebesar  $1000 \mu\text{g/ml}$  dengan pereaksi semprot DPPH. Hasil uji kualitatif aktivitas antioksidan menunjukkan enam fraksi yaitu B, C, F, G, H dan I memiliki aktivitas antioksidan, hal ini ditunjukkan dengan warna bercak putih sampai kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan pereaksi DPPH. Uji pendahuluan ini dilakukan guna memberikan gambaran fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan.

Selanjutnya keenam fraksi tersebut diuji secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan mengukur konsentrasi penghambatan yang sebanding dengan kemampuan fraksi dalam meredam radikal bebas DPPH. Pertama, dilakukan optimasi panjang gelombang DPPH dan didapatkan DPPH memiliki panjang gelombang optimum 517 nm, terlihat pada gambar 4.4., sehingga pengukuran serapan dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Kemudian dilakukan pembuatan larutan seri fraksi dengan berbagai konsentrasi dimana harga persen inhibisi mencapai 50% yang akan diukur serapannya pada panjang gelombang tersebut. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan fraksi G memiliki aktivitas antioksidan terbesar dibandingkan fraksi lainnya. Nilai  $\text{IC}_{50}$  dari fraksi G yaitu  $66,79 \mu\text{g/ml}$ , fraksi B yaitu  $91,96 \mu\text{g/ml}$ , fraksi C yaitu  $351,49$

$\mu\text{g/ml}$ , fraksi F yaitu 534,49  $\mu\text{g/ml}$ , fraksi H yaitu 140,06  $\mu\text{g/ml}$  dan fraksi I yaitu 166,10  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil uji aktivitas fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Berdasarkan hasil uji tersebut, terlihat bahwa fraksi G memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanol. Hal ini kemungkinan terjadi karena pemisahan yang dilakukan menyebabkan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan cukup banyak terkumpul didalam fraksi G ini. Sedangkan bila dibandingkan dengan kuersetin, fraksi G masih memiliki harga  $\text{IC}_{50}$  jauh lebih besar dibandingkan dengan kuersetin yaitu mencapai lima puluh kalinya. Hal ini mungkin disebabkan karena kuersetin merupakan senyawa murni, sedangkan fraksi masih berupa campuran beberapa senyawa, namun hal ini tidak menjamin pula senyawa murni yang terkandung didalamnya memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dari kuersetin.

#### **4.7 Penapisan Fitokimia Fraksi yang Paling Aktif**

Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi, menunjukkan fraksi G merupakan fraksi teraktif sehingga penapisan fitokimia dilakukan pada fraksi G. Penapisan fitokimia fraksi dilakukan dengan metode penampak noda kecuali untuk saponin dan glikon menggunakan penampak noda warna. Penapisan dilakukan dengan mengelusi hasil totalan fraksi G dengan berbagai macam eluen yang sesuai kemudian lempeng disemprot dengan penampak noda kimia, dimana digunakan standar yang sesuai sebagai pembanding positif. Selain itu, fraksi juga diemprot dengan penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kemudian dipanaskan pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama beberapa menit untuk melihat bercak yang dihasilkan, serta disemprot DPPH untuk melihat bercak yang memiliki aktivitas antioksidan. Hasil penapisan fitokimia fraksi G menunjukkan fraksi G mengandung flavonoid, tannin dan glikon. Hasil selengkapnya terlihat pada Tabel 4.13.

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan mengelusi lempeng menggunakan eluen kloroform-metanol (85:15) kemudian menyemprotnya dengan penampak noda Dragendorf. Hasilnya fraksi G tidak terdeteksi mengandung alkaloid, sedangkan standar yaitu *Chinae Cortex* terdeteksi mengandung alkaloid ditandai dengan adanya bercak berwarna jingga dengan  $R_f$  0,36. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan mengelusi lempeng

menggunakan eluen heksan-etil asetat (30:70) dimana bercak terpisah dengan baik kemudian menyemprotnya dengan penampak noda  $\text{AlCl}_3$ . Hasilnya fraksi G terdeteksi mengandung flavonoid, ditandai dengan adanya bercak berfluorosensi kuning pada panjang gelombang 366 nm dengan Rf 0,29, sedangkan standar yaitu kuersetin terdeteksi mengandung flavonoid, ditandai dengan adanya bercak berfluorosensi kuning pada panjang gelombang 366 nm dengan Rf 0,70. Identifikasi senyawa terpenoid dilakukan dengan mengelusi lempeng menggunakan eluen heksan-etil asetat (70:30) kemudian menyemprotnya dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Hasilnya fraksi G tidak terdeteksi mengandung terpen, karena tidak ada bercak yang berwarna biru-violet setelah lempeng dipanaskan, sedangkan standar yaitu Caryophilli Flos terdeteksi mengandung terpenoid ditandai dengan adanya bercak berwarna biru-violet dengan Rf 0,15 dan 0,77.

Identifikasi senyawa tanin dilakukan dengan mengelusi lempeng menggunakan eluen heksan-etil asetat (3:7) dimana bercak terpisah dengan baik kemudian menyemprotnya dengan penampak noda  $\text{FeCl}_3$  10%. Hasilnya fraksi G terdeteksi mengandung tanin, ditandai dengan adanya bercak berwarna hijau kehitaman dengan Rf 0,59, sedangkan standar yaitu Teae Folium terdeteksi mengandung tanin, ditandai dengan adanya bercak berwarna kehitaman dengan Rf 0,15. Identifikasi senyawa antrakuinon dilakukan dengan mengelusi lempeng menggunakan eluen etil asetat-metanol-aquades (100:17:13) kemudian menyemprotnya dengan penampak noda KOH 5%. Hasilnya fraksi G tidak terdeteksi mengandung antrakuinon, karena tidak ada bercak yang berwarna merah, sedangkan standar yaitu Rhei Radix terdeteksi mengandung antrakuinon, ditandai dengan adanya bercak yang berwarna merah dengan Rf 0,53. Identifikasi senyawa saponin dilakukan dengan reaksi pengocokan menggunakan air panas. Hasilnya fraksi G tidak terdeteksi mengandung saponin, sedangkan standar yaitu Orthosiponis Folium terdeteksi mengandung saponin, ditandai dengan adanya busa setinggi 2,6 cm. Identifikasi senyawa glikon menggunakan pereaksi Mollisch untuk mendeteksi adanya gugus gula. Hasilnya fraksi G membentuk cincin ungu setelah dihidrolisis dengan asam klorida encer yang artinya terdapat senyawa gula. Hasil penapisan fitokimia fraksi terlihat pada Gambar 4.5. sampai 4.9.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

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

- a. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol dari daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut 163,51; 91,39 dan 74,32 µg/ml dimana ekstrak metanol merupakan ekstrak teraktif.
- b. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi B, G, H dan I dari ekstrak metanol memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut 91,96; 66,79; 140,06; dan 166,10 µg/ml, dimana fraksi G merupakan fraksi teraktif.
- c. Hasil identifikasi golongan senyawa dari fraksi teraktif yaitu fraksi G mengandung senyawa flavonoid, tanin dan senyawa gula.

#### **5.2 Saran**

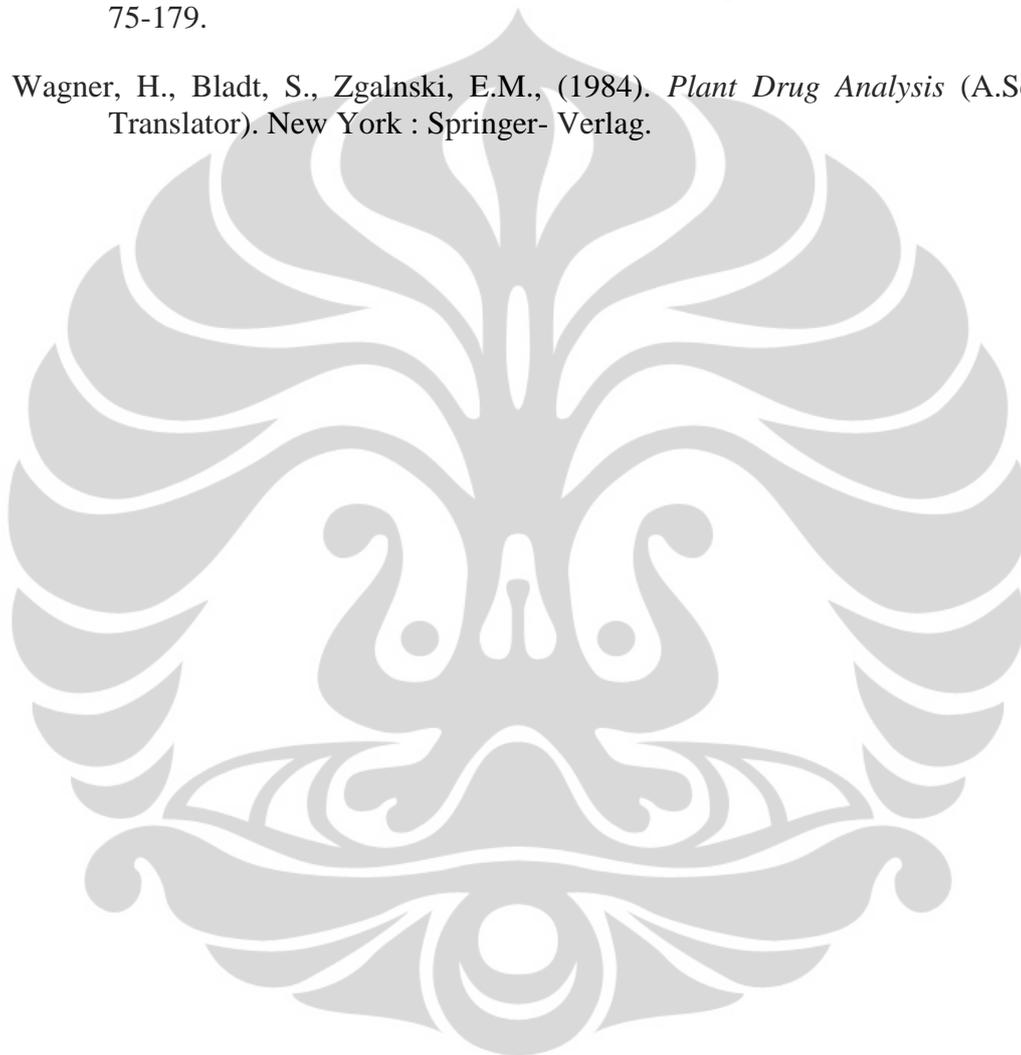
Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

## DAFTAR ACUAN

- Antolovich, M., Prenzeler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. (2001). Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst*. 127: 183-198.
- Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen Van Den Brink Jr. (1963). *Flora of Java volume I (Spermatophytes Only)*. N.V.P. Noordhoff, Groningen, the Netherlands. 158-159.
- Blanchfield, J.T., Sands, D.P.A, Kennard, C.H.L., Byriel, K.A. and Kitching, W. (2003). Charecterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. *Phytochemistry*. 63; 711-720.
- Chalid, S.Y. (2003). *Pengaruh Ekstrak Cincau Hijau Cyclea barbata L.Miers terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dan Katalase pada Mencit C3H Bertumor Kelenjar Susu*. Tesis, Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Deniati, S.H. (2006). *Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Fenol Total Beberapa Ekstrak Bahan Alam Pangan*. Kekhususan Biokimia Program Studi Ilmu Biomedik- Program Pascasarjana Universitas Indonesia. Tesis
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995a), *Farmakope Indonesia edisi IV*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995b). *Materia Medika Indonesia Volume VI*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008), *Farmakope Herbal Indonesia edisi I*. Jakarta.
- Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta:9-31
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 3, 255-276.
- Gritter, R, J., J. M. Bobbits, and A. E. Schwarting, (1987). *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi)*, Edisi ke-2, diterjemahkan oleh K. Padmawinata, Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J.B. (1987). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Mengekstraksi Tumbuhan* (Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro, Penerjemah.). Bandung: Penerbit ITB.
- Heyne, K., Badan Litbang Departemen Kehutanan. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia II*. Yayasan Sarana Warna Jaya, Jakarta.

- Keng, Hsuan. *Orders and Families of Malayan Seed Plants*. Singapore University Press. 41-42.
- L.S. de Paduan, N. Bungaphatsara, R. H. M. J Lemmer. (1999). *PROSEA (Plant Resources of South East Asia) No. 1: Medicinal and Poisonous*. Bogor: PROSEA Foundation.
- Lemmens, R.H.M.J., and N. Bunyaphatsara. (2003). *PROSEA (Plant Resources of South East Asia) No. 12(3): Medicinal and Poisonous plants* 3. Backhuys Publisher, Leiden, the Netherlands. 125-127.
- Liangli, Yu. (ed.). (2008). *Wheat Antioxidant*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Majalah Kesehatan. (24 Oktober 2010). Apakah Antioksidan?. [www.majalahkesehatan.com](http://www.majalahkesehatan.com)
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26(2), 211-219.
- Prajapati, Narayan Das, Purohit, S.S., Sharma, A.K. and Kumar, T. (2007). *A Handbook of Medicinal Plants: A Complete Source Book*. India: Agrobios.
- Prakash, Aruna, Rigelhof, Fred, Miller, Eugene. *Antioxidant Activity in Medallion Laboratories Analytical Progress*.
- Rohdiana, D. (2001). *Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh*. Majalah Jurnal Indonesia 12 (1):53-58
- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I. (eds.). (2006). *Natural Product Isolation* Ed. Ke-2. New Jersey: Humana Press.
- Semwal, Deepak K., Badoni, Ruchi, Semwal, Ravindra, Kothiyah, Sudhir K., Singh, Gur J.P. and Rawat, Usha. (2010). The Genus *Stephania* (Menispermaceae): Chemical and Pharmacological Perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*. 132; 369-383.
- Sharma, U, Sahu, R.K., Roy, A. and Golwala, D.K. (2010). In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Stephania hernandifolia* in streptozotocin-induced-diabetic rats. *Journal of Young Pharmacists*. 2; 255-260.
- Shivaprasad, H.N., S. Mohan., M.D. Kharya. (2005). *In-vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation*. A Review. <http://www.pharmainfo.net>.
- Stahl, E., 1969. *Apparatus and general techniques in TLC*. Dalam : Stahl, E.(ed). Thin layer chromatography a laboratory handbook. Terj. Dari Dunnschicht chromatographie, oleh Ashworth, M.R.F. Berlin: springer-Verlag, 61-77.
- Suryohudoyo P. Oksidan, antioksidan dan radikal bebas, dalam Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler 2000, hal 31-47

- Tahir, I., Wijaya, K. dan Widyaningsih, D. (2003). *Terapan Analisis Hansch Untuk Aktivitas Antioksidan Senyawa Turunan Flavon/Flavonol*. Seminar on Chemometrics. Chemistry Dept Gadjah mada University. Yogyakarta
- Touchstone, J.C., M.F. Dobbins., 1983. *Practice of thin layer chromatography*. Canada: JohnWiley & Sons, 2-12.
- Verheijj, E. W. M., Coronel, R. E. (1992). *PROSEA (Plant Resources of South East Asia) No. 2: Edible Fruits and Nuts*. Bogor: PROSEA Foundation. 75-179.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgalnski, E.M., (1984). *Plant Drug Analysis* (A.Scott, Translator). New York : Springer- Verlag.





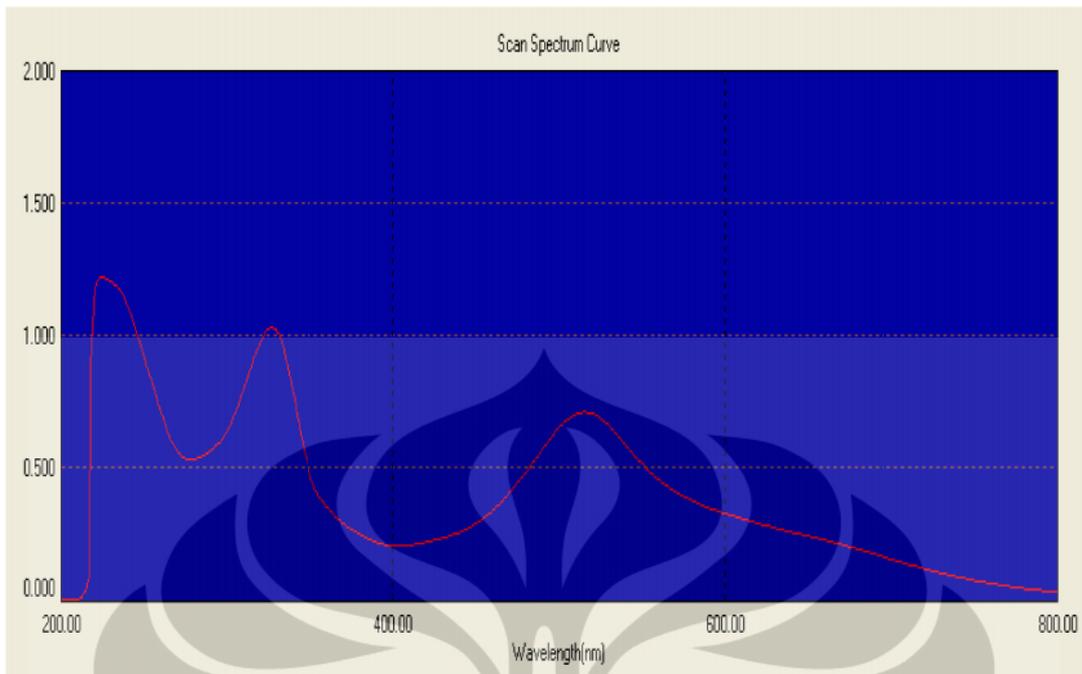
# **GAMBAR**



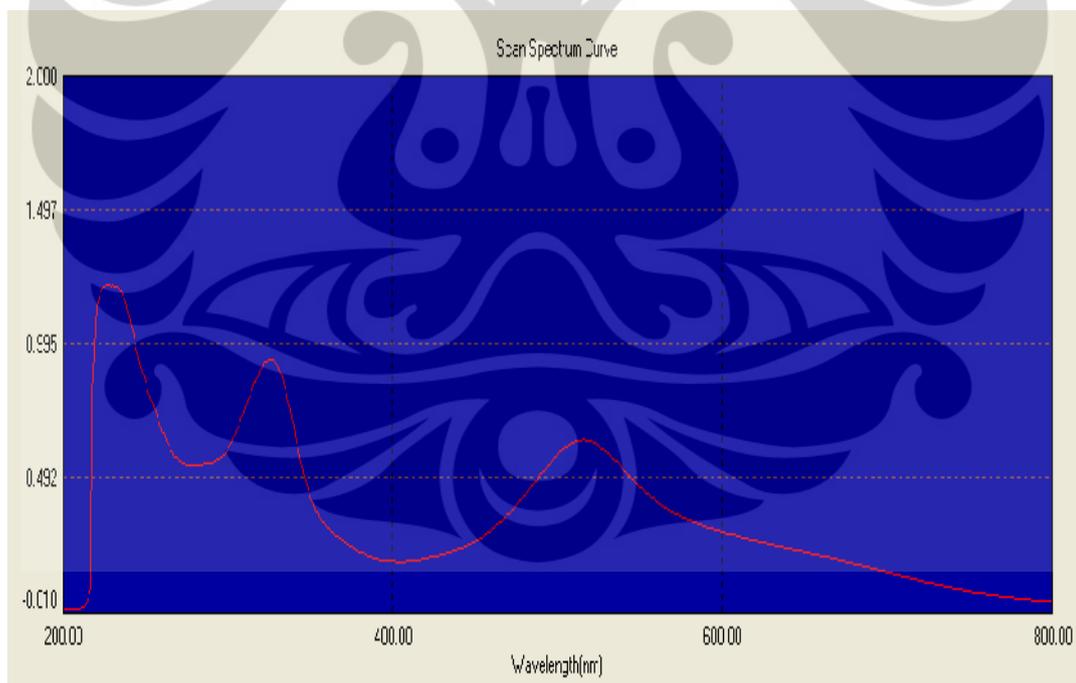
**Gambar 4.1.** Daun Tanaman *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.



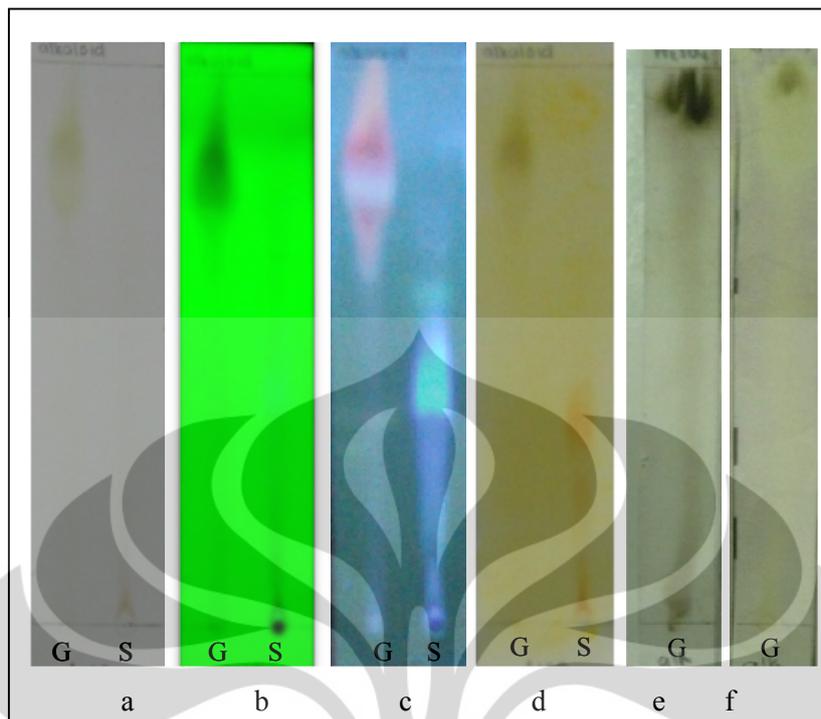
**Gambar 4.2.** Simplisia daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.



**Gambar 4.3.** Spektrum serapan larutan DPPH konsentrasi 25 µg/ml pada pengujian ekstrak



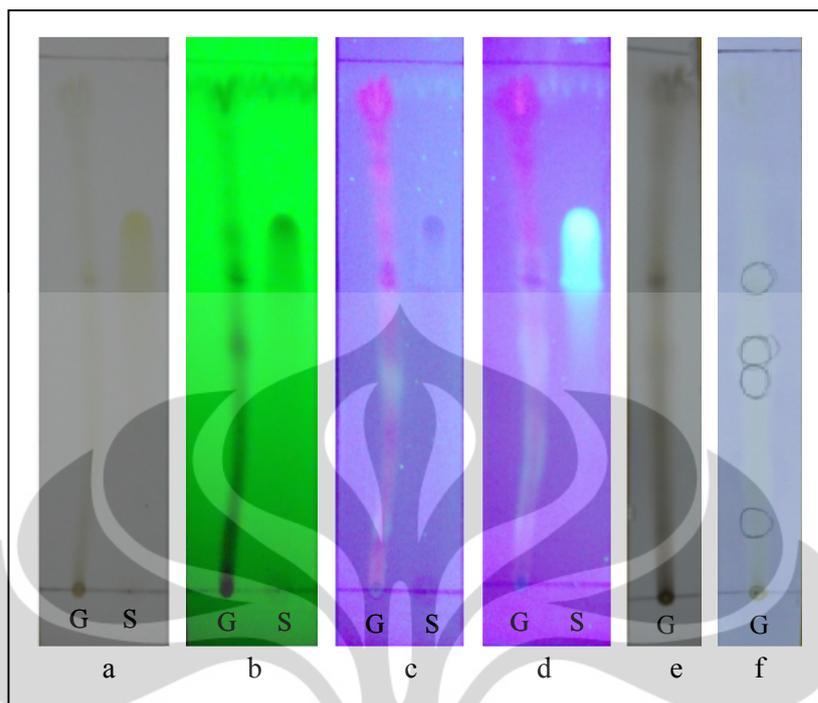
**Gambar 4.4.** Spektrum serapan larutan DPPH konsentrasi 25 µg/ml pada pengujian fraksi



Keterangan:

- a : Pengamatan secara visual setelah elusi
- b : Pengamatan pada panjang gelombang 254 nm
- c : Pengamatan pada panjang gelombang 366 nm
- d : Setelah disemprot penampak noda Dragendorff spray reagent
- e : Setelah disemprot penampak noda  $H_2SO_4$
- f : Setelah disemprot penampak noda DPPH

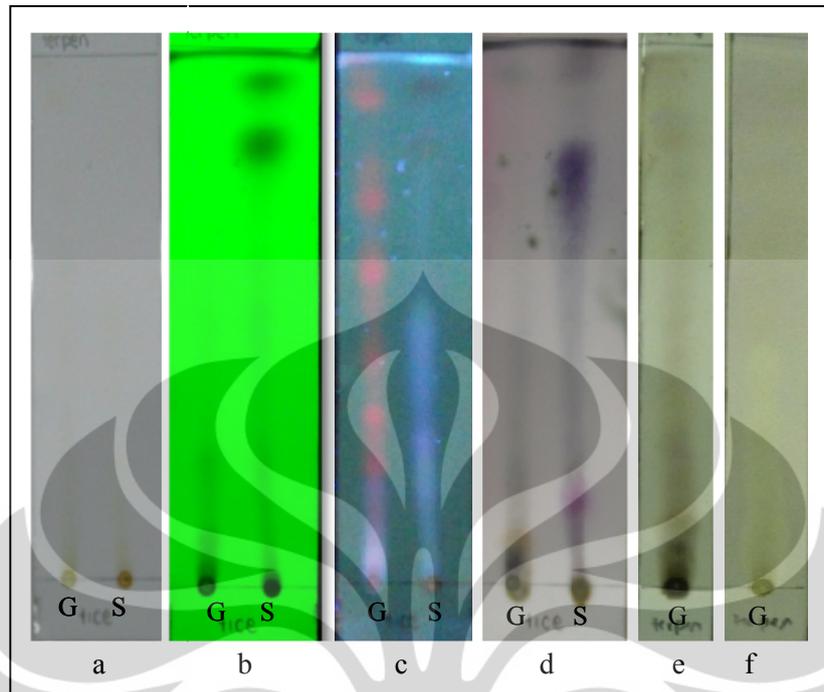
**Gambar 4.5.** Pola kromatogram identifikasi alkaloid fraksi G (G) dan standar Chinae Cortex (S), dengan eluen kloroform-metanol (85:15)



Keterangan:

- a : Pengamatan secara visual setelah elusi
- b : Pengamatan pada panjang gelombang 254 nm
- c : Pengamatan pada panjang gelombang 366 nm
- d : Setelah disemprot penampak noda  $\text{AlCl}_3$  diamati pada panjang gelombang 366 nm
- e : Setelah disemprot penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- f : Setelah disemprot penampak noda DPPH

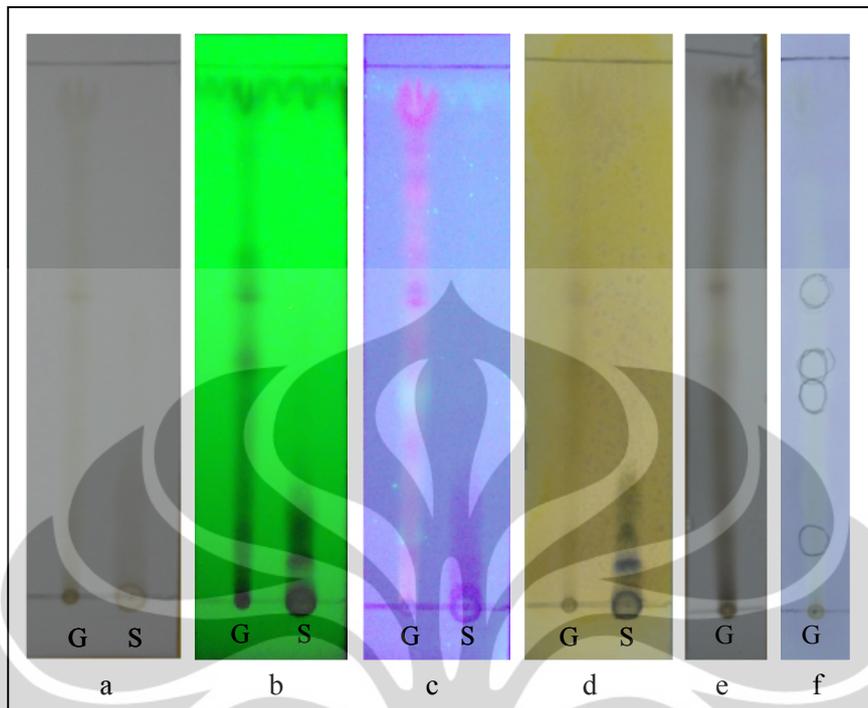
**Gambar 4.6.** Pola kromatogram identifikasi flavonoid fraksi G (G) dan standar kuersetin (S), dengan eluen heksan-etil asetat (30:70)



Keterangan:

- a : Pengamatan secara visual setelah elusi
- b : Pengamatan pada panjang gelombang 254 nm
- c : Pengamatan pada panjang gelombang 366 nm
- d : Setelah disemprot penampak noda Anisaldehyd-asam sulfat dan dipanaskan 100<sup>0</sup>C selama 5 menit
- e : Setelah disemprot penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- f : Setelah disemprot penampak noda DPPH

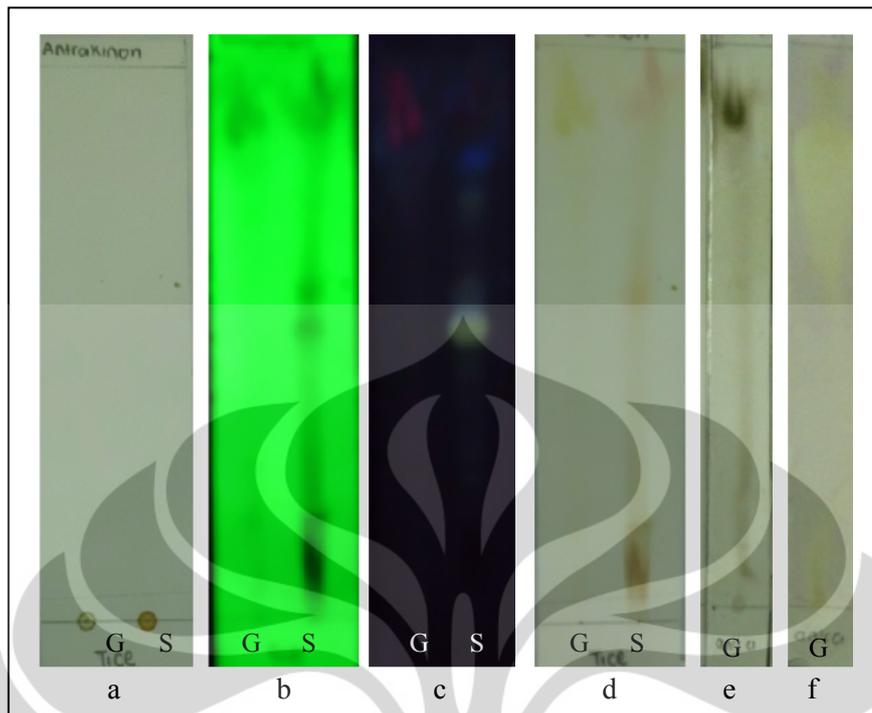
**Gambar 4.7.** Pola kromatogram identifikasi terpenoid fraksi G (G) dan standar Caryophilli Flos (S), dengan eluen heksan-etilasetat (70:30)



Keterangan:

- a : Pengamatan secara visual setelah elusi
- b : Pengamatan pada panjang gelombang 254 nm
- c : Pengamatan pada panjang gelombang 366 nm
- d : Setelah disemprot penampak noda  $\text{FeCl}_3$  10%
- e : Setelah disemprot penampak noda  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- f : Setelah disemprot penampak noda DPPH

**Gambar 4.8.** Pola kromatogram identifikasi tanin fraksi G (G) dan standar Teae Folium (S), dengan eluen heksan-etil asetat (30:70)



Keterangan:

- a : Pengamatan secara visual setelah elusi
- b : Pengamatan pada panjang gelombang 254 nm
- c : Pengamatan pada panjang gelombang 366 nm
- d : Setelah disemprot penampak noda KOH 5% dan dipanaskan 100<sup>0</sup>C selama 5 menit
- e : Setelah disemprot penampak noda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- f : Setelah disemprot penampak noda DPPH

**Gambar 4.9.** Pola kromatogram identifikasi antrakuinon fraksi G (G) dan standar Rhei radix (S), dengan eluen etil asetat-metanol-air (100:17:13)



**Tabel 4.1** Persen air simplisia daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. yang

Berat simplisia segar (kg)	Berat simplisia kering (kg)	Penyusutan simplisia (%)
4	1,169	70,775

hilang

**Tabel 4.2** Bobot ekstrak dan rendemen ekstrak

No.	Ekstrak	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (%)
1.	<i>n</i> -Heksana	18,2	1,56
2.	Etil asetat	37,6	3,22
3.	Metanol	127,7	10,92

**Tabel 4.3** Hasil penapisan kimia ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Golongan senyawa	Ekstrak <i>n</i> -heksana	Ekstrak etil asetat	Ekstrak metanol
1.	Alkaloid	-	-	+
2.	Flavonoid	-	+	+
3.	Terpenoid/sterol	+	+	+
4.	Tanin	-	-	+
5.	Gula (Glikon)	-	+	+
6.	Saponin	-	+	+
7.	Antrakuinon	-	-	-

Keterangan : + : terdeteksi - : tidak terdeteksi

**Tabel 4.4** Hasil penapisan kimia golongan alkaloid ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Mayer (-)	Bouchardat (-)	Dragendorf (-)
1.	<i>n</i> -Heksana	Tidak ada endapan putih	Tidak ada Endapan coklat	Tidak ada endapan jingga
2.	Etil asetat	Tidak ada endapan putih	Tidak ada Endapan coklat	Tidak ada endapan jingga
3.	Metanol	(+) Endapan putih	(+) Endapan coklat	(+) Endapan jingga
4.	Standar	(+) Endapan putih	(+) Endapan coklat	(+) Endapan jingga

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

**Tabel 4.5** Hasil penapisan kimia golongan flavonoid ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Serbuk Zn	Serbuk Mg	Asam oksalat-asam borat
1.	<i>n</i> -Heksana	(-) Jernih	(-) Jernih	(-) Tidak fluorosensi
2.	Etil asetat	(-) Kuning keruh	(+) Hijau kekuningan	(+) Fluorosensi kuning
3.	Metanol	(+) Merah muda	(+) Hijau kekuningan	(+) Fluorosensi kuning
4.	Standar	(+) Merah muda	(+) Kuning	(+) Fluorosensi kuning

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

**Tabel 4.6** Hasil penapisan kimia golongan terpenoid ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Lieberman-Burchard
1.	<i>n</i> -Heksana	(+) Hijau kebiruan
2.	Etil asetat	(+) Hijau
3.	Metanol	(+) Hijau
4.	Standar	(+) Merah kecoklatan

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

**Tabel 4.7** Hasil penapisan kimia golongan tanin ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Gelatin 10 %	FeCl <sub>3</sub> 1 %	NaCl-Gelatin
1.	<i>n</i> -Heksana	(-) Warna tetap	(-) Warna tetap	(-) Warna tetap
2.	Etil asetat	(-) Warna tetap	(-) Warna tetap	(-) Warna tetap
3.	Metanol	(+) Endapan putih keruh	(+) Hijau kehitaman	(+) Endapan putih
4.	Standar	(+) Endapan putih	(+) Hijau kehitaman	(+) Endapan putih

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

**Tabel 4.8** Hasil penapisan kimia senyawa gula ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Filtrat HCl
1.	<i>n</i> -Heksana	(-) Tidak ada cincin ungu
2.	Etil asetat	(-) Tidak ada cincin ungu
3.	Metanol	(+) Ada cincin ungu
4.	Standar	(+) Ada cincin ungu

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

**Tabel 4.9** Hasil penapisan kimia golongan saponin ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

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

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

**Tabel 4.10** Hasil penapisan kimia golongan antrakuinon ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No.	Ekstrak	Benzen-NaOH 2 N
1.	<i>n</i> -Heksana	(-) Jernih pada lapisan air
2.	Etil asetat	(-) Jernih pada lapisan air
3.	Metanol	(-) Jernih pada lapisan air
4.	Standar	(+) Merah pada lapisan air

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

**Tabel 4.11** Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

Serapan blanko	Sampel	Kons. Uji ( $\mu\text{g/ml}$ )	Serapan Sampel	% Inhibisi	Persamaan linier	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
0.713	Kuersetin	0.25	0.636	10.79	$y = 3,201 + 35,470x$ $r = 0,98$	1,32
		0.5	0.578	18.93		
		0.75	0.459	35.62		
		1	0.450	36.88		
		1.25	0.370	48.10		
		1.5	0.320	55.11		
0.713	Ekstrak <i>n</i> -heksana	25	0.540	24.26	$y = 19,260 + 0,188x$ $r = 0,99$	163,51
		50	0.514	27.91		
		75	0.481	32.53		
		100	0.407	40.25		
		125	0.426	42.91		
		150	0.380	46.70		
0.713	Ekstrak etil asetat	25	0.502	29.59	$y = 24,410 + 0,280x$ $r = 0,99$	91,39
		50	0.440	38.28		
		75	0.373	47.68		
		100	0.330	53.71		
		125	0.287	59.74		
		150	0.253	64.51		
0.713	Ekstrak metanol	25	0.503	29.45	$y = 20,270 + 0,400x$ $r = 0,99$	74,32
		50	0.424	40.53		
		75	0.349	51.05		
		100	0.274	61.57		
		125	0.221	69.00		

**Tabel 4.12** Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi gabungan dari ekstrak metanol daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

Serapan blanko	Sampel	Kons. Uji (µg/ml)	Serapan Sampel	% Inhibisi	Persamaan linier	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
0.625	Fraksi B	37.5	0.518	14.31	y = -8,858 + 0,640x r = 0,99	91,96
		50	0.468	22.72		
		62.5	0.413	31.68		
		75	0.359	40.66		
		87.5	0.312	48.51		
		100	0.283	53.07		
0.625	Fraksi C	100	0.534	14.59	y = -1,318 + 0,146x r = 0,99	351,49
		125	0.515	17.53		
		150	0.502	19.63		
		175	0.478	23.58		
		200	0.449	28.11		
		225	0.427	31.67		
0.625	Fraksi F	25	0.596	4.55	y = 2,965 + 0.088x r = 0,98	534,49
		50	0.574	8.14		
		75	0.566	9.42		
		100	0.552	11.58		
		125	0.532	14.79		
		150	0.527	15.54		
0.625	Fraksi G	12.5	0.530	14.60	y = 6,182 + 0,656x r = 0,99	66,79
		25	0.534	19.76		
		37.5	0.502	33.52		
		50	0.416	39.41		
		62.5	0.379	48.49		
		75	0.322	53.63		
0.625	Fraksi H	25	0.582	6.88	y = -4,344 + 0,388x r = 0,99	140,06
		50	0.531	14.98		
		75	0.477	23.66		
		100	0.423	32.29		
		125	0.343	45.19		
		150	0.281	55.07		
0.625	Fraksi I	75	0.473	24.25	y = 0,999 + 0,295x r = 0,99	166,10
		100	0.449	28.22		
		125	0.379	39.36		
		150	0.330	46.08		
		175	0.310	50.40		
		200	0.242	61.28		

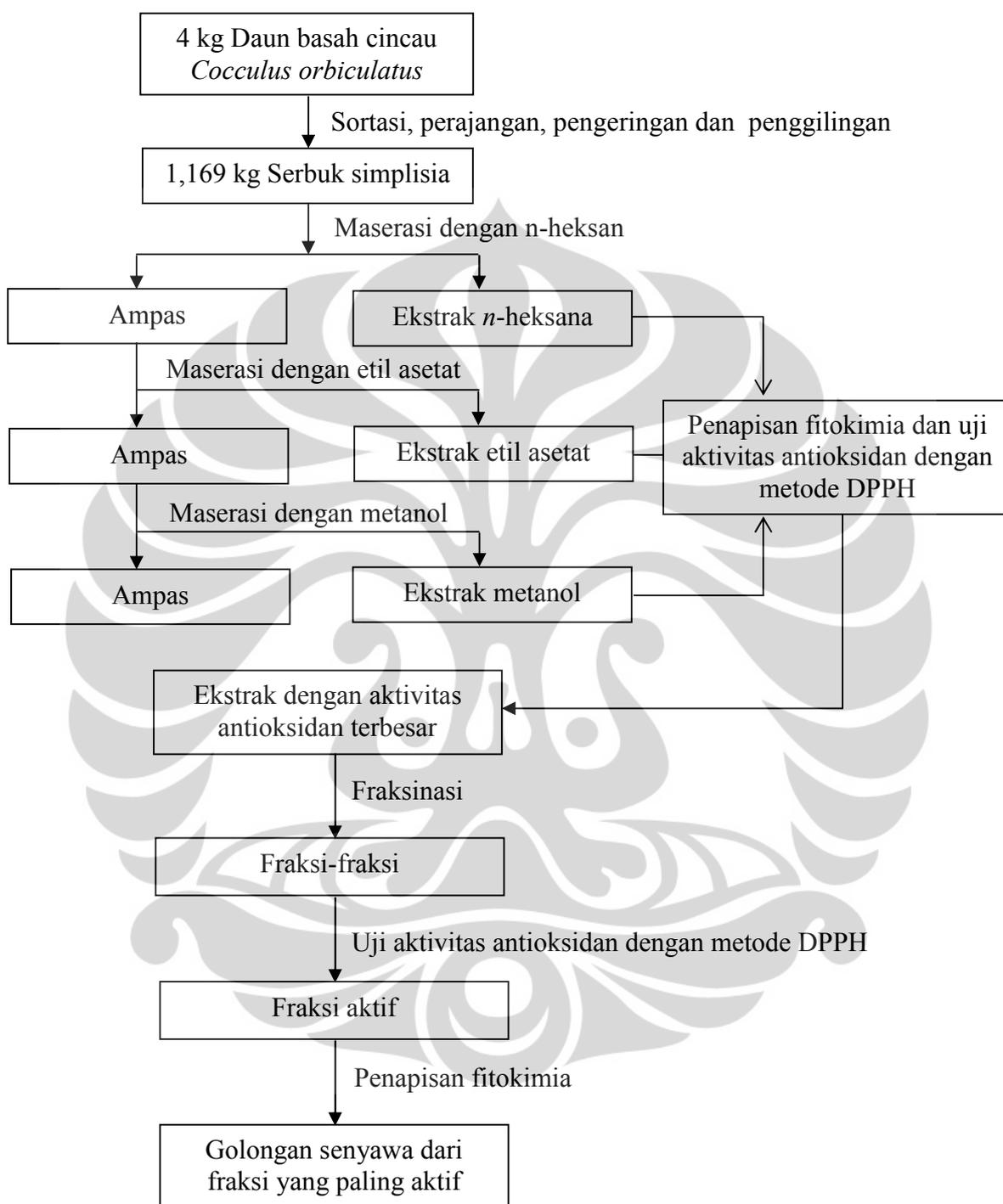
**Tabel 4.13** Hasil penapisan kimia fraksi teraktif (fraksi G) ekstrak metanol daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC.

No	Golongan senyawa	Eluen	standar	Fraksi G	Rf	
					S	G
1.	Alkaloid	Kloroform-metanol (85:15)	Chinae cortex	-	0,36	-
2.	Flavonoid	Heksan-eril asetat (3:7)	Kuersetin	+	0,70	0,29
3.	Terpenoid/steroid	Heksan-eril asetat (7:3)	Caryophylli flos	-	0,15 0,77	-
4.	Tanin	Heksan-eril asetat (3:7)	Teae folium	+	0,15	0,59
5.	Antrakuinon	Eti asetat-metanol-air (100:17:13)	Rhei radix	-	0,53	-
6.	Saponin	-	Ortoshiponis folium	-	-	-
7.	Glikon	-	Nerii folium	+	-	-

Keterangan : + : terdeteksi    - : tidak terdeteksi  
S : Standar                    G : fraksi G



# LAMPIRAN

**Lampiran 1.** Skema kerja

## Lampiran 2. Surat 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, 22 Maret 2012

Nomor : 445 /IPH.1.02/II.8/III/2012  
 Lampiran : -  
 Perihal : Hasil identifikasi/ determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Kartika Febriani  
 NPM : 0806398354  
 Mhs. Univ. Indonesia  
 Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

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

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Cincau Minyak/Cincau	<i>Cocculus orbiculatus</i> (L.) DC.	Menispermaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijoe Rahajoe  
 NIP. 196706241993032004

### Lampiran 3. Sertifikat Analisis 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)

CERTIFICATE OF ANALYSIS : 047-04051

Page 1 of 1



**Wako Pure Chemical Industries, Ltd.**

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

#### Certificate of Analysis

Product Number : 047-04051  
 Chemical Name : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl  
 Grade :  
 Lot Number : EPP4945  
 Unit : 1g

TEST	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	Blackish purple, Crystalline powder or mass	Passed
Solubility in ethanol	to pass test (dissolve)	Passed
Date of QC-Release		Mar. 3, 2010

*M. Nanaura*  
 Mitsuo Nanaura General Manager  
 Q.A. Department

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

This is an electronically generated document

<https://www.e-reagent.com/cgi-bin/gx.cgi/AppLogic+ufz280kisi pr.ufz280kisi sikenD...> 29/5/2012