



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS
MENGUNAKAN *Artemia salina* Leach DARI FRAKSI AKTIF
EKSTRAK METANOL DAUN JAMBO-JAMBO
[*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]**

SKRIPSI

**NURLISA DWI NOVIANTI
0806327950**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS
MENGUNAKAN *Artemia salina* Leach DARI FRAKSI AKTIF
EKSTRAK METANOL DAUN JAMBO-JAMBO
[*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]**

SKRIPSI

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

**NURLISA DWI NOVIANTI
0806327950**

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

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

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

Nama : Nurlisa Dwi Novianti

NPM : 0806327950

Tanda Tangan :



Tanggal : 12 Juli 2012

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, 12 Juli 2012



Nurlisa Dwi Novianti
0806327950

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Nurlisa Dwi Novianti
NPM : 0806327950
Program Studi : Sarjana Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt ()
Pembimbing II : Dra. Puspa Dewi N.L., M.Eng ()
Penguji I : Dr. Katrin, M.S., Apt ()
Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillahirobbil'alamiin, puji syukur saya haturkan kepada Alloh SWT penguasa bumi dan langit beserta isinya yang tak pernah lelah mencurahkan segenap rahmat, taufik, dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian guna menyusun tugas akhir atau skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa bimbingan, bantuan, dan doa dari berbagai pihak mulai dari awal perkuliahan sampai pada penelitian dan penyusunan skripsi ini maka sangatlah sulit saya untuk mengerjakan dan menyelesaikannya. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Berna Elya, M.Sc., Apt., selaku dosen pembimbing dari fakultas Farmasi-UI dalam penelitian ini atas segala bimbingan dan sarannya dan Dra. Puspa Dewi N.L., M.Eng., selaku pembimbing penelitian di Laboratorium Bahan Alam Puslit Kimia, LIPI-Serpong, yang dengan sabar membimbing, memberikan ilmu dan pengarahan selama penelitian di Lanoratorium BAPF Puslit Kimia LIPI-Serpong.
2. Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong atas izin yang diberikan kepada penulis untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bahan Alam & Produk Farmasi serta dukungan fasilitas dan dana yang diberikan selama penelitian.
3. Bapak M. Hanafi selaku kepala bidang Laboratorium Bahan alam dan Produk Farmasi, Pusat Penelitian Kimia LIPI-Serpong.
4. Bapak Akhmad Darmawan, M.Sc., atas segenap ilmu yang diberikan dalam pembelajaran NMR dan saran yang luar biasa selama penelitian.
5. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi UI.

6. Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., selaku pembimbing akademis.
7. Seluruh Staf Puslit Kimia LIPI-Serpong terutama Ibu Lia, Ibu Mega, Ibu Lala, Bapak Udin dan Bapak M. Ghozali atas saran dan bimbingannya selama penelitian.
8. Seluruh dosen/staf pengajar di Departemen Farmasi UI atas segala ilmu dan bimbingannya selama masa perkuliahan.
9. Orang tua tercinta, Bapak H Johny Nurharyanto E.S., S.Sos., M.Si. dan Ibu Hj Siti Anisah, S.Ag. atas limpahan perhatian, kasih sayang, doa dan dukungan moral maupun material yang tiada hentinya diberikan selama 22 tahun ini. Kakak dan adik, Pamela Rahma Kartika sari dan Arrijal Dewantara atas dukungan dan kasih sayangnya.
10. Teman-teman seperjuangan Bahan Alam 2012 dalam melakukan penelitian untuk tugas akhir, skripsi maupun tesis : Dewi Murni, Ziyadah Fitriana, Irwanto, Kak Dilla Fairusi, Nurul dan Ibu Dwi atas berbagai ilmu, bantuan, kasih sayang dan dukungannya selama kurang lebih 4 bulan di laboratorium BAPF LIPI-Serpong, serta kepada Oksa Rezza atas perhatian dan bantuannya selama penyusunan skripsi ini.
11. Teman-teman seperjuangan : FARMASI UI 2008 atas suka duka selama menempuh pendidikan, khususnya untuk sahabat tersayang dalam senyuman dan tangisan Nisa, Dian dan Neti. Kawan seatap Ima, Iri, Septi dan Kak Ika.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa penulis bukanlah makhluk yang sempurna, yang tak lepas dari kesalahan dan dosa. Penulis mengucapkan mohon maaf atas segala kesalahan dalam tutur kata maupun perbuatan. Penulis berharap Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu selama perkuliahan, penelitian dan penyusunan skripsi. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Penulis

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

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

Nama : Nurlisa Dwi Novianti
NPM : 0806327950
Program Studi : Reguler 2008
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia melanjutkan penelitian demi kepentingan akademis. Kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi, Uji Antioksidan dan Toksisitas Menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]

perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, LIPI berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Universitas Indonesia berhak untuk menyimpan mengelola dalam bentuk pangkalan data (database) dan merawat dengan tidak memublikasikan tanpa izin dari pihak LIPI seperti pada perjanjian kerjasama penelitian antara pihak mahasiswa dan pihak LIPI.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Juli 2012

Yang menyatakan



(Nurlisa Dwi Novianti)

ABSTRAK

Nama : Nurlisa Dwi Novianti
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Isolasi, Uji Antioksidan dan Toksisitas Menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]

Keunikan biodiversitas pegunungan Mekongga telah menarik perhatian banyak peneliti. Tim konservasi dari Amerika dan Indonesia telah menemukan sejumlah tanaman mengandung zat yang memiliki aktivitas antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang menyebabkan tanaman-tanaman lain memiliki potensial sebagai antikanker berdasarkan uji pendahuluan terhadap aktivitas antioksidan dan efek toksik, salah satunya adalah Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]. Aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan kemampuan meredam radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), sedangkan efek toksik dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Daun Jambo-Jambo diekstraksi dengan pelarut metanol dan dipartisi menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, butanol dan metanol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol mempunyai potensi toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} 243,5 ppm dan aktivitas antioksidan senilai IC_{50} 12,59 ppm. Isolasi dilakukan terhadap fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom silika dan kromatotron. Senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi struktur kimianya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, IR, NMR dan LCMS. Didukung dengan data hasil penapisan kimia, diduga senyawa tersebut golongan flavonoid yang mempunyai berat molekul 478.

Kata Kunci : antioksidan, toksisitas, *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr., BSLT, DPPH
xv + 78 halaman : 13 gambar; 8 tabel; 5 lampiran
Daftar Pustaka : 57 (1958-2012)

ABSTRACT

Name : Nurlisa Dwi Novianti
Program Study : Pharmacy
Title : Isolation, Antioxidant Assay and Toxicity using Brine Shrimp Lethality Test from Active Fraction of Methanolic Extract of Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. Leaves]

The unique biodiversity of Mekongga mountains have attracted many researches. Conservation team from US and Indonesia have discovered a number of plants growing on Mekongga mountains which have anticancer activity. This study is aimed to identify chemical compounds which have anticancer activity based on preliminary testing of the antioxidant activity and toxic effects, one of them is Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.]. The antioxidant activity of Jambo-jambo leaves was measured by its ability to scavenge free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), whereas the toxic effect was analyzed by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Jambo-Jambo leaves was extracted using methanol solvent and its methanolic extract was partitioned using the n-hexane, ethyl acetate, buthanol and methanol. Test results showed that the LC_{50} and IC_{50} value of its methanolic extract was 243,5 and 12,59 ppm. The ethyl acetate fraction which showed the best activity was isolated using silica column chromatography and chromatotron. Pure compounds was obtained by the chemical structures were identified using Spectrofotometer UV-Vis, IR, NMR and LCMS. Supported by data on the results of chemical screening, the compounds were suspected as flavonoid compound which has molecular weight 478.

Keywords : antioxidant, toxicity, *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr., BSLT, DPPH

xv + 78 pages : 13 figures; 5 table; 5 appendixes

References : 54 (1958-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Suku Myrtaceae	5
2.2 <i>Kjelbergiodendron celebicus</i> (Koord) Merr.	5
2.3 Simplisia dan Ekstrak	7
2.4 Fraksinasi dan Isolasi	9
2.5 Penapisan Fitokimia	16
2.6 Antioksidan	19
2.7 Toksisitas	26
2.8 Instrumen	27
3. METODE PENELITIAN	30
3.1 Lokasi Penelitian	30
3.2 Bahan dan Alat	30
3.3 Cara Kerja	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Penyiapan Bahan	40
4.2 Ekstraksi dan Partisi	40
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan	42
4.4 Uji Toksisitas	44
4.5 Penapisan Fitokimia	46
4.6 Isolasi Senyawa Aktif	48
4.7 Identifikasi Struktur Kimia	52

5. KESIMPULAN DAN SARAN	58
5.1 Kesimpulan	58
5.2 Saran	58
DAFTAR ACUAN	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Tanaman <i>Kjelbergiodendron celebicus</i>	5
Gambar 2.2.	Reaksi Peredaman Radikal Bebas DPPH oleh Antioksidan	23
Gambar 2.3.	Pembentukan radikal ABTS ^{•+} stabil dari ABTS+K ₂ S ₂ O ₈	24
Gambar 2.4.	Mekanisme Reduksi [Fe(TPTZ) ₂ ³⁺] oleh Antioksidan	26
Gambar 3.1.	Skema Ekstraksi dan Partisi	63
Gambar 3.2.	Skema Fraksinasi dan Isolasi Senyawa Aktif	64
Gambar 4.1.	Kurva Konsentrasi Dan % Inhibisi Fraksi-Fraksi Hasil Partisi Ekstrak Daun <i>Kjelbergiodendron Celebicus</i> pada Uji Antioksidan terhadap Radikal Bebas DPPH	65
Gambar 4.2.	Kurva Log Konsentrasi dan % Mortalitas fraksi-fraksi hasil partisi ekstrak daun <i>Kjelbergiodendron celebicus</i> pada uji toksisitas terhadap <i>Artemia salina</i> Leach.....	65
Gambar 4.3.	Kurva konsentrasi dan % inhibisi Fr11.32a pada uji antioksidan	66
Gambar 4.4.	Kurva log konsentrasi dan % mortalitas Fr11.32a pada uji toksisitas	66
Gambar 4.5.	Pola Kromatogram Fr11.32.....	50
Gambar 4.6.	Spektrum Infra Merah Fr 11.32a	55
Gambar 4.7.	Struktur Dasar Flavonoid	57

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Jenis-Jenis Bahan Penyerap Fase Diam pada KLT	13
Tabel 4.1.	Data Persentase Rendemen Ekstrak	41
Tabel 4.2.	Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dari Daun <i>Kjelbergiodendron celebicus</i> dengan Metode DPPH	43
Tabel 4.3.	Data Hasil Uji Toksisitas Daun <i>Kjelbergiodendron celebicus</i> dengan Metode BSLT	46
Tabel 4.4.	Data Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Metanol Awal dan Fraksi Etil Asetat Daun <i>Kjelbergiodendron celebicus</i>	48
Tabel 4.5.	Hasil Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Fraksi-Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Cepat	67
Tabel 4.6.	Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fr11.32a	50
Tabel 4.7.	Data Hasil Uji Toksisitas Fr11.32a	50



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil Determinasi daun <i>Kjelbergiodendron celebicus</i>	68
Lampiran 2.	Kurva Optimasi Panjang Gelombang DPPH.....	69
Lampiran 3.	Spektrum LC-MS dari Fr11.32a	70
Lampiran 4.	Spektrum ^{13}C NMR dari Fr11.32a.....	72
Lampiran 5.	Spektrum ^1H -NMR dari Fr11.32a.....	75



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pegunungan Mekongga merupakan sebuah wilayah tertinggi di daratan provinsi Sulawesi Tenggara. Secara geografis posisinya terletak di dua wilayah kabupaten, yaitu kabupaten Kolaka Utara dan Kolaka. Secara geologis, wilayah pegunungan ini terbentuk dari atol yang terangkat sekitar ratusan juta tahun lalu sehingga membentuk kawasan karst dataran tinggi yang sangat indah. Fenomena ini memungkinkan berbagai jenis flora dan fauna khas yang kemudian menjadi biodiversiti yang unik di wilayah ini sekaligus menjadi daya tarik bagi para peneliti. Mekongga memiliki potensi sumber daya alam yang harus dipertahankan keberadaannya. Berbagai hewan endemik dan langka banyak hidup disini. Hal ini sangat berguna dalam ilmu pengetahuan, bahkan sangat berguna di bidang kesehatan. Tim konservasi menemukan sejumlah tanaman di pegunungan ini mengandung zat yang positif dapat membunuh virus kanker (Kendari Pos, 2011).

Tim *International Cooperative Biodiversity Grup* (ICBG) dari Amerika bekerja sama dengan tim peneliti LIPI-Cibinong mengonservasi flora fauna pegunungan Mekongga secara bertahap mulai tahun 2009. Hasil eksplorasi dikirim ke laboratorium Puslit Kimia LIPI-Serpong untuk diidentifikasi. Ekstrak metanol awal dari seluruh tanaman tersebut diuji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) di LIPI-Serpong. Sedangkan uji antibakteri dilakukan di LIPI-Cibinong dan uji antikanker dilakukan di Amerika.

Data uji aktivitas antioksidan dan uji toksisitas LIPI-Serpong menunjukkan beberapa tanaman aktif sebagai antioksidan dan bersifat toksik. Uji antioksidan dan toksisitas biasa digunakan sebagai uji pendahuluan terhadap antikanker. Apabila suatu sampel bersifat aktif sebagai antioksidan dan bersifat toksik maka sampel berpotensi sebagai antikanker. Hal tersebut mendorong tim peneliti untuk meneliti lebih lanjut guna mengetahui fraksi dan senyawa aktif pada tanaman-tanaman yang berpotensi tersebut. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi lebih lanjut tanaman *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. yang pada

pengujian awal juga menunjukkan aktivitas antioksidan dan bersifat toksik. Tanaman ini merupakan salah satu tanaman khas Sulawesi yang keberadaannya mulai langka karena jenis kayu ini berpotensi sebagai kayu ramuan (bahan bangunan) yang banyak ditebang secara liar oleh pihak tak bertanggung-jawab.

Dalam beberapa tahun terakhir ini, banyak perhatian ditujukan kepada radikal bebas. *Reactive oxygen species* (ROS) merupakan jenis radikal bebas paling banyak dan berkaitan dengan sejumlah kerusakan jaringan/organ yang dipicu oleh senobiotik, iskemia, aktivasi leukosit, paparan UV dan lain-lain (Mena, Ortega dan Estrela, 2009). *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan molekul yang sangat reaktif yang berasal dari metabolisme oksigen. ROS (radikal superoksida, radikal hidroksil, hidrogen peroksida) dihasilkan sebagai produk reaksi biologis atau dari faktor eksogen (Chanda dan Dave, 2009). Ketidakseimbangan antara jumlah ROS dan kemampuan tubuh mengendalikan ROS atau memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh ROS menyebabkan keadaan stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan mekanisme patofisiologi yang berbahaya karena dapat mengakibatkan berbagai penyakit seperti kanker, aterosklerosis, malaria, arthritis rheumatoid dan penyakit-penyakit neurodegeneratif (Mena, Ortega dan Estrela, 2009).

Antioksidan berfungsi melindungi tubuh terhadap radikal-radikal bebas sehingga antioksidan penting dalam memelihara kesehatan (Arts, Haenen, Voss dan Bast, 2004). Keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan diperlukan untuk memelihara fungsi fisiologis tubuh. Oleh karena itu, pemberian sumber antioksidan dari luar perlu dilakukan untuk membantu tubuh mengatasi stress oksidatif ini. Antioksidan sintesis seperti BHA (*butylated hydroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*) baru-baru ini dilaporkan berbahaya bagi kesehatan manusia (Lobo, Patil, Phatak dan Chandra, 2010). Oleh karena itu, penggunaan antioksidan alami menjadi alternatif utama.

Antioksidan alami menarik perhatian untuk diteliti karena keamanan dan potensi efek terapetikanya. Penelitian mengenai tumbuhan yang memiliki aktivitas antioksidan telah diintensifkan (Rufino, Alves, Fernandes dan Brito, 2010). Terlebih lagi, Indonesia sebagai negara tropis mempunyai keanekaragaman hayati yang tinggi. Berdasarkan survey, Indonesia yang memiliki 13-15% dari seluruh

jenis tanaman di dunia atau sekitar 35.000-40.000 jenis tanaman (Pusat Penelitian Biologi-LIPI, 2011).

Pengujian antioksidan senyawa-senyawa bahan alam dapat dilakukan dengan menggunakan DPPH sebagai senyawa radikal bebas stabil yang ditetapkan secara spektrofotometri. Kapasitas antiradikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH pada panjang gelombang 515 nm. Suatu bahan dikatakan aktif sebagai antioksidan bila dapat meredam radikal DPPH sebesar 50% dengan konsentrasi kurang dari 1000 µg/mL (Blois, 1958). Daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. diekstraksi menggunakan metanol dan selanjutnya dipartisi secara gradien dengan pelarut n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan metanol membentuk lima fraksi dan fraksi teraktif dipisahkan menggunakan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi tersebut dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dan pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT. Isolasi senyawa aktif dilakukan terhadap fraksi-fraksi aktif yang memiliki aktivitas antioksidan dan bersifat toksik. Senyawa yang diperoleh diidentifikasi dengan spektrofotometri ultraviolet dan cahaya tampak (UV-Vis), spektrofotometri inframerah (IR), kromatografi cair - spektroskopi massa (LC-MS) dan spektrofotometri resonansi magnetik inti (NMR) serta diuji kembali aktivitas antioksidan dan toksisitasnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

- a. Mengukur aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak metanol daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.
- b. Mengukur aktivitas fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan dan toksisitas paling tinggi.
- c. Mengidentifikasi senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi aktif yang menunjukkan aktivitas antioksidan dan toksisitas paling tinggi.

1.3 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.] yang hingga saat ini belum ditemukan literturnya serta untuk memperkaya khasanah pengetahuan mengenai tanaman obat yang berada di Indonesia.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Suku Myrtaceae

Sebagian besar terdiri atas tumbuhan yang berupa semak-semak atau pohon-pohonan yang berbatang berkayu, jarang sekali berupa terna. Daunnya tunggal tanpa daun penumpu yang terletak menyebar atau berhadapan. Sebagian besar bunga aktinomorfi, hemaprodit dengan empat hingga lima daun kelopak dan juga memiliki empat hingga lima buah daun mahkota. Di bagian atas daun-daun mahkotanya seringkali berlekatan. Benang sari berkelompok berhadapan dengan daun mahkota yang jumlahnya sedikit dan terkadang dengan tangkai sari yang berwarna nyata. Bakal buah tenggelam dengan satu tangkai putik, beruang satu dengan tiga tembung yang menonjol ke dalam. Dapat pula beruang lebih dari satu, dua hingga lima, dengan delapan hingga satu bakal biji dalam tiap ruang. Buah sangat bermacam-macam, dapat berupa buah buni, buah keras, buah batu, biji dengan endosperma atau tidak. Dalam organ tumbuhannya seperti daun, seringkali terdapat ruang berisi minyak atsiri (Citrosupomo, 1994).

2.2 *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.



[Sumber : Koleksi penulis, 2012]

Gambar 2.1. Tanaman *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr

2.2.1 Taksonomi

Secara taksonomi, tanaman *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. diklasifikasikan sebagai berikut (Kebun Raya Bogor Plant List dan LIPI, 2006) :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta (Angiospermae)
Kelas	: Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Myrtaceae
Marga	: Kjelbergiodendron
Jenis	: <i>Kjelbergiodendron celebicus</i> (Koord) Merr.
Nama Daerah	: Jambo-Jambo, Bungur, Bungur Bumbung, Tombe Uwa

2.2.2 Morfologi Tumbuhan

Pohon *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. berbentuk model Koriba, yakni pada batang pokok tampak letak kelompok cabang yang pertama bertentangan arahnya dengan kelompok cabang kedua dan seterusnya, sehingga pertumbuhan batang tampak zig-zag (LIPI, 2006). Penampilan bagian luar batang bertipe batang menyerpih seperti kertas. Daun bertipe majemuk menjari dan susunan daun pada ranting berhadapan silang. Bangun umum helai daun berbentuk lanset sungsang dengan ujung daun yang tumpul dan pangkal daun yang berbentuk pasak. Pertulangan daun menyirip dengan urat daun dan sejajar dengan tepi daun.

2.2.3 Distribusi Geografis, Habitat dan Ekologi

Kjelbergiodendron celebicus (Koord) Merr. merupakan tanaman khas Sulawesi yang keberadaannya di alam semakin menipis (LIPI, 2002).

2.2.4 Kandungan Kimia dan Kegunaan

Hingga tahun 2012 belum ditemukan publikasi mengenai kandungan kimia daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. Batang dari pohon ini biasa digunakan masyarakat sekitar sebagai kayu untuk bahan bangunan (LIPI, 2002).

2.3 Simplisia dan Ekstrak

2.3.1 Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman tertentu atau eksudat tanaman. Simplisia nabati harus bebas dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan; tidak boleh menyimpang bau dan warnanya; tidak boleh mengandung lendir dan cendawan, atau menunjukkan tanda-tanda pengotoran lain; tidak boleh mengandung bahan lain yang beracun atau berbahaya. Jika dalam beberapa hal khusus ada sedikit penyimpangan dari beberapa ketentuan mengenai morfologik dan mikroskopik yang tertera dalam Materia Medika Indonesia, sedangkan semua persyaratan lain dipenuhi maka simplisia yang bersangkutan dapat dianggap memenuhi persyaratan Materia Medika Indonesia (Depkes, 1995).

Materia Medika Indonesia berlaku sebagai pedoman untuk simplisia yang akan dipergunakan untuk keperluan pengobatan, tetapi tidak berlaku bagi bahan yang dipergunakan untuk keperluan lain yang dijual dengan nama yang sama. Namun simplisia nabati secara umum merupakan produk hasil pertanian tumbuhan obat setelah melalui proses pasca panen dan proses preparasi secara sederhana menjadi bentuk produk kefarmasian yang siap dipakai atau siap diproses selanjutnya, yaitu (Depkes, 2000) :

- a. Siap dipakai dalam bentuk serbuk halus untuk diseduh sebelum diminum (jamu).
- b. Siap dipakai untuk dicacah dan digodok sebagai jamu godokan (infus).
- c. Diproses selanjutnya untuk dijadikan produk sediaan farmasi lain yang umumnya melalui proses ekstraksi, separasi dan pemurnian, yaitu menjadi ekstrak, fraksi atau bahan isolat senyawa murni.

2.3.2 Ekstrak

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. Sebagian besar ekstrak dibuat dengan mengekstraksi bahan baku obat secara perkolasi. Seluruh perkolat biasanya dipekatkan secara destilasi dengan pengurangan tekanan, agar bahan sesedikit mungkin terkena panas.

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisahkan dari bahan yang tidak bisa larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa-senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi dua golongan, yakni cara dingin dan cara panas yang didasarkan pada kestabilan senyawa kimia dalam simplisia. Berikut adalah metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut (Depkes, 2000) :

2.3.2.1 Cara dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia 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 kontinyu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

b. Perkolasi

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

2.3.2.2 Cara panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarutnya terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendinginan 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 pada umumnya dilakukan pada temperature 40°-50° C.

d. Infus

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

e. Dekok

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

2.4 Fraksinasi dan Isolasi Ekstrak

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non-polar akan masuk ke pelarut non-polar (Harbone, 1987). Dari proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Berbagai metode kromatografi memberikan cara pemisahan paling kuat di laboratorium kimia. Gagasan dasarnya sederhana untuk dipahami, caranya beragam mulai dari cara sederhana sampai

yang agak rumit dari segi kerja dan peralatan dan metode ini dapat dipakai untuk setiap jenis senyawa (Gritter, Bobbit dan Schwarting, 1991).

Kromatografi merupakan suatu teknik analisis biokimia berdasarkan metode pemisahan yang memerlukan waktu relatif singkat dan tidak membutuhkan alat yang rumit dibandingkan dengan metode pemisahan lainnya. Dikenal dua fase pada kromatografi, yaitu fase mobil atau fase gerak yang membawa sampel dan fase stasioner atau fase diam yang menahan sampel. Jika fase geraknya berupa cairan maka disebut kromatografi cair; dan jika fase geraknya berupa gas maka disebut kromatografi gas. Teknik pemisahan kromatografi yang sering digunakan ialah kromatografi adsorpsi dimana teknik pemisahannya didasarkan pada interaksi yang didominasi oleh mekanisme adsorpsi dari komponen dalam sampel terhadap fase diam dan fase gerak (Bintang, 2010).

Suatu metode pemisahan yang terbaik untuk memisahkan campuran dalam jumlah banyak yaitu menggunakan kromatografi kolom. Kolom kromatografi diisi dengan penyerap berupa zat padat seperti alumunina atau silika gel yang dialiri dengan satu pelarut atau menggunakan perbandingan dua atau beberapa pelarut. Campuran yang akan dipisahkan diletakkan pada bagian atas kolom penyerap, pelarut (fase gerak) dibiarkan mengalir melalui kolom. Pita senyawa pelarut bergerak melalui kolom dengan laju berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi yang keluar dari kolom (Hardjono, 1991).

Jika kita menangani senyawa tak bewarna, eluen yang keluar dari dasar kolom harus dipantau untuk mengetahui dimana linarut itu berada. Hal ini dapat dilakukan secara terus menerus dengan memakai detektor yang cocok atau dengan membagi eluen menjadi sejumlah cuplikan yang berurutan dan menganalisisnya, biasanya dengan kromatografi lapis tipis (KLT), atau dengan menimbang masing-masing fraksi setelah pelarutnya diuapkan. Kromatografi lapis tipis dan kertas lebih sering dikembangkan dengan pelarut tunggal atau campuran pelarut yang tetap, sedangkan kromatografi kolom dikembangkan dengan campuran pelarut yang terus menerus berubah dengan cara landaian (Gritter, Bobbit dan Schwarting, 1991).

2.4.1. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom klasik merupakan yang tertua dari cara kromatografi, dan seperti yang dipraktikkan secara tradisional, merupakan bentuk kromatografi cair. Fase diam, baik bahan yang menyerap (KCP) atau film cair pada penyangga (KCC), ditempatkan di dalam tabung kaca berbentuk silinder, pada bagian bawah tertutup dengan katup atau keran, dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Penyerap dapat dikemas ke dalam tabung baik cara basah (dibuat lumpuran terlebih dahulu) maupun dengan cara kering (langsung dituang ke tabung sedikit demi sedikit). Pada umumnya, cara basah lebih mudah dan lebih sering dipakai untuk silika gel, sedang cara kering lebih baik untuk alumina (Gritter, Bobbit dan Schwarting, 1991).

Kolom kromatografi biasanya dibuat dengan menuangkan lumpuran atau suspensi fase diam dalam pelarut yang sesuai ke dalam kolom dan dibiarkan memampat. Selanjutnya permukaan pelarut diturunkan sampai tepat pada bagian atas penyerap, dan cuplikan yang dilarutkan dalam pelarut yang sesuai diletakkan pada bagian atas kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam lapisan atas penyerap atau penyangga. Kemudian fase gerak dimasukkan dan dibiarkan mengalir mengembangkan kromatogram. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, linarut yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan dan dengan demikian dipisahkan. Linarut biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, seringkali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis (Gritter, Bobbit dan Schwarting, 1991). Pemisahan dengan kromatografi kolom dapat menggunakan bantuan tekanan oleh vakum dan dapat pula hanya mengandalkan gravitasi untuk penurunan fraksinya (Bintang, 2010).

Kromatografi kolom yang fase diamnya berupa gel filtrasi termasuk ke dalam kromatografi eksklusi atau filtrasi. Prinsip kerjanya adalah pemisahan berdasarkan perbedaan ukuran dan bobot molekul (BM) terhadap gel filtrasi. Komponen yang memiliki ukuran dan BM yang lebih besar akan terlebih dahulu terelusi dibandingkan dengan yang lebih kecil. Komponen dengan ukuran dan BM yang lebih besar langsung terelusi karena tidak dapat tertahan pada pori-pori gel filtrasi, sedangkan komponen dengan ukuran dan BM yang lebih kecil akan

tertahan sementara pada pori-pori gel filtrasi sehingga akan terelusi terakhir. Fraksi yang dihasilkan pun diharapkan mengandung komponen yang terpisah berdasarkan ukuran BM (Wu, 1995). Gel filtrasi yang biasa digunakan ialah sephadex, sepharosa dan poliakrilamida.

2.4.2. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan cara analisis cepat yang memerlukan bahan yang sedikit (Markham, 1988). (KLT) termasuk ke dalam kromatografi adsorpsi. Media yang digunakan berupa pelat tipis yang dilapisi oleh fase diam. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel, alumenita, kieselguhr maupun selulosa bergantung pada sampel yang akan dianalisis (Bintang 2010). Pada KLT, cuplikan yang akan dipisahkan ditotolkan pada lapisan tipis yang nantinya akan diabsorpsi oleh zat penyerap dan kemudian dielusi oleh fase gerak. Pemisahan didasarkan pada sifat polaritas senyawa. Senyawa yang memiliki polaritas hampir sama dengan fase geraknya akan terelusi terlebih dahulu dibandingkan senyawa dengan sifat polaritas yang berbeda dengan fase geraknya. Pada kromatografi lapis tipis ini terjadi persaingan antara proses penyerapan yang cenderung untuk menempelkan senyawa dalam fase diam dan Pelarutan yang cenderung membawa dalam fase gerak (Shellard, 1975).

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk tujuan kualitatif dan preparatif. KLT tujuan kualitatif digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil (misalnya menentukan jumlah kumpulan dalam campuran), menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif maupun kromatografi kolom dan juga untuk mengidentifikasi komponen penyusun campuran melalui suatu perbandingan dengan senyawa yang diketahui strukturnya (Townshend, 1995). Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai R_f. Untuk analisis preparatif, sampel yang ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara yang nondestruktif. Bercak yang mengandung analit yang dituju selanjutnya dikerok dan dilakukan analisis lanjutan. Adapun pelaksanaan KLT sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2007) :

2.4.2.1 Fase Diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Penyerap yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa. Sementara mekanisme sorpsi yang paling utama pada KLT adalah adsorpsi dan partisi. Berikut adalah beberapa penyerap fase diam yang digunakan pada KLT :

Tabel 2.1. Jenis-jenis bahan penyerap fase diam KLT

Penyerap	Mekanisme sorpsi	Penggunaan
Silika Gel	Adsorpsi	Asam amino, hidrokarbon, vitamin, alkaloid
Silika modifikasi dengan hidrokarbon	Partisi termodifikasi	Senyawa-senyawa non-polar
Serbuk selulosa	Partisi	Asam amino, nukleotida, karbohidrat
Alumina	Adsorpsi	Hidrokarbon, ion logam, pewarna makanan, alkaloid
Kieselgur	Partisi	Gula, asam-asam lemak
Selulosa penukar ion	Pertukaran ion	Asam nukleat, nukleotida, ion logam, halogen
Gel Sephadex	Eksklusi	Polimer, protein, kompleks logam

[Sumber : Gandjar dan Rohman, 2007]

2.4.2.2 Fase Gerak

Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana adalah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal.

Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak :

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga Rf terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai Rf.
- d. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu.

2.4.2.3 Penotolan sampel

Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μ L. Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2-10 μ L maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan.

2.4.2.4 Pengembangan

Selanjutnya mengembangkan sampel dalam bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhi dengan uap fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng tipis yang telah ditotoli sampel selanjutnya dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus di bawah lempeng yang telah berisi totolan sampel. Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin, akan tetapi harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan. Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, biasanya bejana dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung dari kertas saring maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh.

2.4.2.5 Metode Deteksi

Deteksi bercak pada KLT dapat dilakukan secara kimia dan fisika. Cara kimia yang biasa dilakukan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika

yang dapat dilakukan untuk menampakkan bercak adalah dengan cara pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Berikut adalah cara-cara kimiawi untuk mendeteksi bercak :

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi bewarna. Kadang-kadang dipanaskan terlebih dahulu untuk mempercepat reaksi pembentukan warna dan intensitas warna bercak.
- b. Mengamati lempeng di bawah lampu ultraviolet yang dipasang panjang gelombang emisi 254 atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam. lempeng yang diperdagangkan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan fluoresen yang tidak larut yang dimasukkan ke dalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi atau dapat pula dengan menyemprot lempeng dengan reagen fluoresensi setelah dilakukan pengembangan.
- c. Menyemprot lempeng dengan asam sulfat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam sampai kecoklat-coklatan.
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam *chamber* tertutup.
- e. Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer, suatu instrument yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Solut-solut yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak (*peak*) dalam pencatatan (*recorder*).

Perhitungan nilai R_f didasarkan atas rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}} \quad (2.1)$$

Nilai R_f dinyatakan hingga angka 1,0. Beberapa pustaka menyatakan nilai R_f yang baik yang menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8.

2.4.3 Kromatografi Radial

Kromatografi radial atau kromatografi sirkular termasuk ke dalam kromatografi planar. Kromatografi radial terdiri atas kromatografi kertas radial dan kromatografi lapis tipis radial. Prinsip pemisahannya sama seperti kromatografi lainnya, yakni berdasarkan interaksi antara komponen dalam sampel terhadap fase diam dan fase gerak. Lapis tipis yang digunakan pada KLT radial berupa fase diam yang diaplikasikan di atas pelat kaca berbentuk bundar yang memiliki diameter 24 cm. Fase diam yang digunakan sama seperti pada KLT, diantaranya alumina, silika gel dan lainnya. Komponen KLT radial terdiri dari pelat, motor penggerak, lampu UV, *chamber* dan wadah eluen. Penggunaannya dilakukan dengan cara mengalirkan sampel ke bagian tengah pelat yang telah dipasang dalam *chamber* lalu diikuti dengan mengalirkan eluen. Motor penggerak akan berotasi pada 800 rpm memutar pelat dalam *chamber* searah jarum jam dan proses elusi akan terjadi. Fase diam bergerak secara radial dari bagian tengah pelat ke bagian pinggir akibat daya kapilaritas pelat dan gaya sentrifugal yang dihasilkan dari pelat yang berotasi (Cazes, 2010).

Pada umumnya, campuran 50-500 mg dapat dipisahkan pada lapisan 2 mm sepanjang R_f pada pelat KLT analitik terletak antara 0,2 dan 0,5. Pada awal pemisahan harus dipakai sistem pelarut yang kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan selama pengelusian. Pemasukan cuplikan diikuti dengan pengelusian menghasilkan pita-pita komponen berupa lingkaran sepusat. Pada tepi pelat pita-pita terputar keluar dan ditampung dalam tabung. Fraksi eluat yang diperoleh dianalisis dengan KLT (Hostettmann, Marston dan Hostettmann, 1986). Beberapa alat yang digunakan untuk pemisahan kromatografi radial diantaranya adalah *Chromatotron*, *Rotachrom*, *Cyclograph* dan *Extrachrom* (Cazes, 2010).

2.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan.

Pemeriksaan diarahkan pada senyawa metabolit sekunder yang memiliki khasiat bagi kesehatan seperti, alkaloid, senyawa flavonoid, terpen, tanin, saponin, glikosida, kuinon dan antrakuinon (Harborne, 1987).

2.5.1 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa kimia yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta dapat dideteksi dengan cara pengendapan menggunakan pereaksi Mayer, Dragendorff, dan Bouchardat. Alkaloid sebagian besar berbentuk kristal padat dan sebagian kecil berupa cairan pada suhu kamar, memutar bidang polarisasi dan terasa pahit (Harborne, 1987).

2.5.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa kimia yang umumnya terdapat pada tumbuhan berpembuluh. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Biasanya dalam menganalisis flavonoid, yang diperiksa ialah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang sudah dihidrolisis. Proses ekstraksi flavonoid dilakukan dengan etanol mendidih untuk menghindari oksidasi enzim (Harborne, 1987).

2.5.3 Terpen

Terpen adalah suatu senyawa kimia yang tersusun oleh molekul isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit C_5 . Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang kurang menguap dan yang tidak menguap, triterpen, dan sterol. Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan golongan senyawa triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987).

2.5.4 Tanin

Tanin merupakan senyawa kimia yang umum terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, rasa sepat dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang protein. Tanin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tak larut dalam air.

Secara kimia, tanin dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi 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 terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer (Harborne, 1987).

2.5.5 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen yang merupakan senyawa aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987).

2.5.6 Glikosida

Glikosida merupakan suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi gula (glikon) dan senyawa lain (aglikon atau genin). Pada umumnya glikon berupa glukosa, fruktosa, laktosa, galaktosa dan manosa. Dapat pula berupa gula khusus seperti samentosa, oleandrosa, simarosa dan rutinosa. Sedangkan aglikon (genin) biasanya mempunyai gugus -OH dalam bentuk alkoholis atau fenolis. Glikosida dapat dibedakan atas α -glikosida dan β -glikosida. Pada tanaman, glikosida biasanya terdapat dalam bentuk β -glikosida. Kegunaan glikosida bagi tanaman adalah untuk cadangan gula sementara, sedangkan bagi manusia umumnya digunakan untuk obat jantung, diuretika dan prekursor hormon steroid (Harborne, 1987).

2.5.7 Kuinon dan Antrakuinon

Kuinon merupakan senyawa berwarna dan memiliki kromofor dasar. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dibagi menjadi empat kelompok, diantaranya adalah benzokuinon, naftokuinon dan antrakuinon diperlukan hidrolisis asam untuk melepas kuinon bebasnya. Sedangkan kuinon isoprenoid yang terlibat dalam respirasi sel dan fotosintesis diperlukan cara khusus untuk memisahkannya dari bahan lipid lain (Harborne, 1987).

2.6 Antioksidan

Radikal bebas (*free radical*) adalah satu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Jika elektron yang terikat oleh senyawa radikal bebas tersebut bersifat ionik, dampak yang timbul mungkin tidak terlalu berbahaya. Namun, bila elektron yang terikat radikal bebas berasal dari senyawa yang berikatan kovalen, akan sangat berbahaya karena ikatan digunakan secara bersama-sama pada orbital terluarnya. Umumnya, senyawa yang memiliki ikatan kovalen adalah molekul-molekul besar (biomakromolekul) seperti lipid, protein maupun DNA (Soetmaji, 1998).

Antioksidan berfungsi melindungi tubuh terhadap radikal-radikal bebas sehingga antioksidan yang penting dalam memelihara kesehatan (Arts, Haenen, Voss dan Bast, 2004). Keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan diperlukan untuk memelihara fungsi fisiologis tubuh. Oleh karena itu, pemberian sumber antioksidan dari luar perlu dilakukan untuk membantu mengatasi keadaan stres oksidatif ini (Lobo, Patil, Phatak dan Chandra, 2010). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif atau spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti kanker, kardiovaskuler dan penuaan (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

2.6.1. Penggolongan Antioksidan (Pokorni, 2001)

Tubuh memiliki sistem pertahanan internal terhadap radikal bebas. Sistem pertahanan tersebut dikelompokkan menjadi 3 golongan. Pertama adalah antioksidan primer (antioksidan endogen / antioksidan enzimatis). Contohnya *superoxide dismutase* (SOD), katalase dan *glutathion peroxidase*. Enzim - enzim ini mampu menekan atau menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk lebih stabil. Reaksi ini disebut sebagai *chain-breaking-antioxidant*. Golongan kedua adalah antioksidan sekunder (antioksidan eksogen/antioksidan non enzimatis). Contohnya adalah vitamin E, vitamin C, β -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin

dan albumin. Senyawa-senyawa ini dikenal sebagai penangkap radikal bebas (*scavenger free radical*). Golongan ketiga adalah antioksidan tersier. Misalnya enzim DNA-*repair* dan *metionin sulfoksida reduktase* yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas.

2.6.2 Sumber Antioksidan

Antioksidan sangat beragam jenisnya. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Pokorni (2001) menyatakan sebagai berikut :

2.6.2.1 Antioksidan Sintetik

Diantara beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk makanan, ada lima antioksidan yang penggunaannya meluas dan menyebar di seluruh dunia, yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial.

2.6.2.2 Antioksidan Alami

Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari : senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan.

Kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami adalah berasal dari tumbuhan. Kingdom tumbuhan, Angiosperm memiliki kira-kira 200.000 sampai 300.000 spesies dan dari jumlah ini kurang lebih 400 spesies yang telah dikenal dapat menjadi bahan pangan manusia. Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan. Antioksidan alami terbesar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, akar, daun, buah, biji dan serbuk sari (Pokorni, 2001).

2.6.3. Senyawa Kimia Antioksidan

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid

yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, flavonol dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat dan lain-lain. Senyawa antioksidan polifenolik ini adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam atau peredam terbentuknya singlet oksigen. Kira-kira 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya sehingga flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar. Lebih lanjut disebutkan bahwa sebenarnya flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan hijau sehingga pastilah ditemukan pula pada setiap telaah ekstrak tumbuhan. Kebanyakan dari golongan dan senyawa yang berkaitan erat dengannya memiliki sifat-sifat antioksidan baik di dalam lipida cair maupun dalam makanan berlipida (Pokorni, 2001).

Flavonoid mencakup banyak pigmen yang paling umum dan terdapat pada seluruh dunia tumbuhan dari Fungus sampai Angiospermae. Pada tumbuhan tingkat tinggi, flavonoid terdapat baik dalam bagian vegetatif maupun dalam bunga (Robinson, 1995). Sebagian besar flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida dimana unit flavonoid terikat pada satu gula. Flavonoid yang berupa glikosida merupakan senyawa polar sehingga dapat diekstrak dengan etanol, metanol maupun air. Senyawa fenol bila ditambah basa, warnanya akan berubah sehingga mudah dideteksi pada kromatogram.

Flavonoid merupakan pigmen bewarna yang terdapat pada tanaman, misalnya antosianin yang merupakan penyusun warna biru, violet dan merah; flavon dan flavonol penyusun warna kuning redup; khalkon dan auron penyusun warna kuning terang; sedangkan isoflavon merupakan senyawa tak bewarna. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi. Oleh karena itu menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah spektrum UV dan tampak (Harbone, 1987).

2.6.4. Mekanisme Kerja Antioksidan

Oksidasi dapat dihambat oleh berbagai macam cara diantaranya mencegah masuknya oksigen, penggunaan temperatur yang rendah, inaktivasi enzim yang mengkatalis oksidasi, mengurangi tekanan oksigen dan penggunaan pengemas yang sesuai. Cara lain untuk melindungi terhadap oksigen adalah dengan

menggunakan bahan tambahan spesifik yang dapat menghambat oksidasi secara tepat disebut penghambat oksidasi, tetapi baru-baru ini lebih sering disebut sebagai Antioksidan (Pokorni, 2001). Penambahan antioksidan primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi. Reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.

Mekanisme yang paling sering adalah reaksi antara antioksidan dan radikal bebas. Biasanya antioksidan bereaksi dengan radikal bebas peroksil atau hidroksil yang terbentuk dari hidroperoksida yang berasal dari lipid. Senyawa antioksidan lain dapat menstabilkan hidroperoksida menjadi senyawa non-radikal. Peruraian hidroperoksida dapat dikatalisis oleh logam berat akibatnya senyawa-senyawa dapat mengkelat logam juga termasuk antioksidan. Beberapa senyawa disebut sinergis karena senyawa tersebut dengan sendirinya tidak mempunyai aktivitas antioksidan akan tetapi senyawa tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan senyawa lain. Kelompok lain adalah senyawa-senyawa yang mampu menguraikan hidroperoksida melalui jalur non-radikal sehingga senyawa ini mampu mengurangi radikal bebas (Pokorni, 2001).

2.6.5. Metode Uji Antioksidan

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

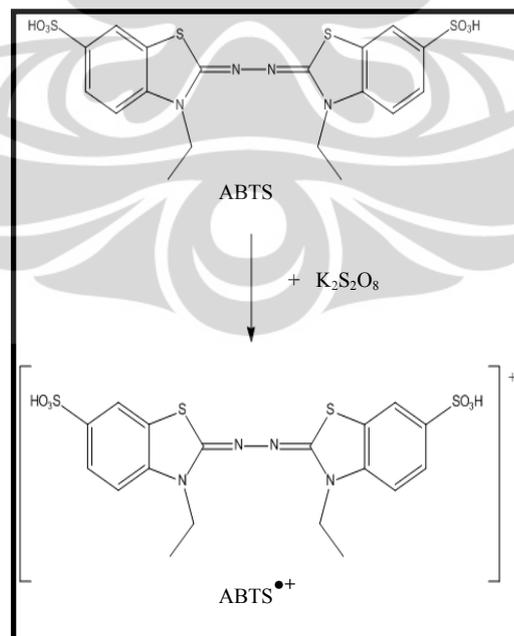
2.6.5.1 Metode Peredaman Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi yang mengukur kapasitas antioksidan untuk bereaksi secara langsung dengan radikal DPPH yang kemudian dilihat serapannya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Radikal DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dengan nitrogen organik sebagai pusatnya. Radikal DPPH berwarna ungu tua yang ketika berubah menjadi bentuk nonradikal memudar warnanya akibat antioksidan (Moore dan Yu, 2007). Metode ini merupakan metode yang paling sering dilaporkan dalam skrining aktivitas antioksidan dari berbagai jenis tanaman obat. Metode peredaman radikal bebas DPPH ini berdasarkan pada reaksi reduksi dari larutan metanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal

Metode uji ini berdasarkan pada pembentukan radikal bebas menggunakan 2,2-azobis-2-amindopropandihidroklorida (AAPH) dan pengukuran dari penurunan fluoresensi dengan penghambatan radikal. Pada uji ini, β -phycoerythrin (β -PE) digunakan sebagai target kerusakan radikal bebas, AAPH sebagai penghasil radikal peroksi dan trolox sebagai standar. Setelah penambahan AAPH ke larutan uji, fluoresensi direkam dan aktivitas antioksidan ditunjukkan sebagai trolox ekuivalen (TE). Selain β -PE senyawa lain yang dapat dijadikan target kerusakan oleh radikal bebas adalah *fluorescein* dan *pyrogallol red* (Lopez, Alarcon dan Lissi, 2006).

2.6.5.4 Metode Peredaman Kation Radikal ABTS

Metode peredaman kation radikal ABTS ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) merupakan metode dekolorisasi yang mengukur kemampuan antioksidan dengan cara berinteraksi secara langsung dengan kation radikal ABTS. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang berwarna biru-hijau, dimana jika tereduksi antioksidan berubah menjadi bentuk nonradikalnya (ABTS) yang tidak berwarna. Kemampuan antioksidan diketahui melalui pengukuran absorpsi dari campuran antioksidan-radikal pada 734 nm menggunakan spektrofotometer. Hasilnya dibandingkan dengan standar trolox (Moore dan Yu, 2007).



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.3. Pembentukan radikal $\text{ABTS}^{\bullet+}$ stabil dari $\text{ABTS} + \text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$

2.6.5.5 Aktivitas penghambatan Radikal Superoksida

Aktivitas penghambatan radikal superoksida secara *in vitro* diukur oleh reduksi riboflavin/cahaya/nitro blue tetrazolium (NBT). Reduksi NBT merupakan metode yang paling dikenal. Metode ini didasarkan pada pembangkitan radikal superoksida oleh autooksidasi dari riboflavin dengan adanya cahaya. Radikal superoksida mereduksi NBT menjadi formazon yang berwarna biru yang dapat diukur pada 560 nm. Kemampuan ekstrak untuk penghambatan warna hingga 50% diukur dalam EC_{50} . Radikal superoksida dapat juga dideteksi melalui oksidasi hidrosilamin, menghasilkan nitrit yang kemudian diukur dengan reaksi kolorimetri (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar dan Lakshman, 2005).

NBT berwarna kuning yang ketika tereduksi $O_2^{\bullet-}$ membentuk formazan berwarna biru yang dapat diukur pada 560 nm dengan spektrofotometer. Kemampuan penangkapan radikal $O_2^{\bullet-}$ dihitung sebagai persen $O_2^{\bullet-}$ yang tersisa (Moore dan Yu, 2007).

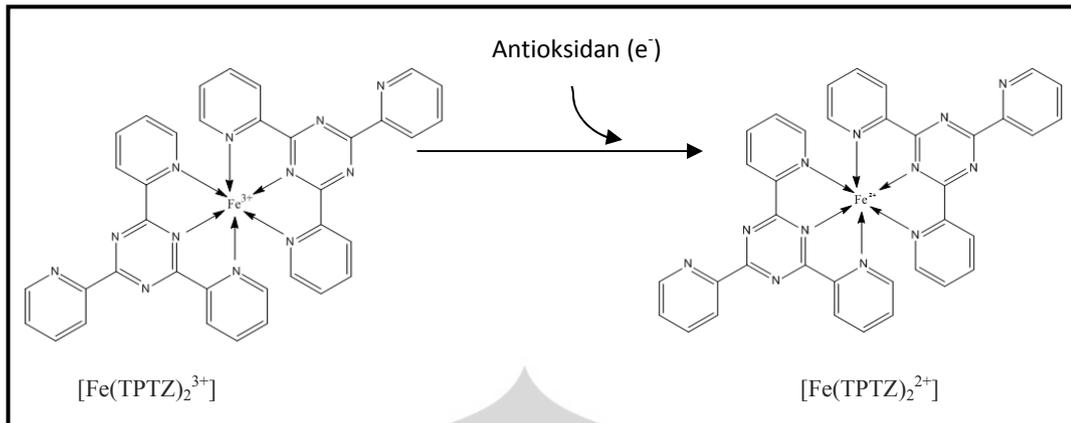
2.6.5.6 Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil

Kapasitas penghambatan radikal hidroksi dari suatu ekstrak dihubungkan secara langsung terhadap aktivitas antioksidannya. Metode ini melibatkan pembangkitan *in vitro* dari radikal hidroksi dengan menggunakan sistem Fe^{3+} , askorbat, EDTA atau H_2O_2 berdasarkan reaksi Fenton. Penghambatan dari radikal hidroksi dengan adanya antioksidan diukur.

Dalam metode ini, radikal hidroksi yang terbentuk oleh oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan dimetil sulfoksida (DMSO) untuk menghasilkan formaldehid. Formaldehid membentuk warna kuning intensif dengan pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M). Intensitas dari warna kuning yang terbentuk diukur pada 412 nm dengan spektrofotometer terhadap blanko pereaksi. Aktivitas dinyatakan sebagai % penghambatan radikal hidroksi (Shivaprasad, Mohan, Kharya, Shiradkar dan Lakshman, 2005).

2.6.5.7 Metode *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP)

Metode FRAP menggunakan kompleks besi-ligan 2,4,6-tripiridil-triazin $[Fe(TPTZ)_2^{3+}]$ sebagai pereaksi. Kompleks biru $[Fe(TPTZ)_2^{3+}]$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi $[Fe(TPTZ)_2^{2+}]$ yang berwarna kuning dengan reaksi sebagai berikut :



[Sumber: Joon Kwan dan Takayuki, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.4. Mekanisme reduksi kompleks $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ oleh antioksidan

2.7 Toksisitas

Toksisitas dari suatu senyawa secara umum dapat diartikan kepada potensi dari suatu senyawa kimia untuk dapat menyebabkan kerusakan ketika senyawa tersebut mengenai atau masuk ke dalam tubuh manusia. Suatu senyawa kimia dapat dikatakan bersifat racun akut jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu singkat dan bersifat racun kronis jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu panjang (Satmoko, 2002).

Untuk skrining dan fraksionisasi fisiologi aktif dari ekstrak tanaman dapat dilakukan uji standar toksisitas akut (jangka pendek). Suatu metode yang digunakan secara luas dalam penelitian bahan alam untuk maksud tersebut adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat toksik dan digunakan sebagai suatu bioassay yang pertama untuk penelitian bahan alam. Metode ini menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan coba. Uji toksisitas dengan metode BSLT ini merupakan uji toksisitas dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC_{50} dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina* Leach. Suatu ekstrak dikatakan toksik jika harga LC_{50} kurang dari $1000 \mu\text{g/ml}$ (Meyer, Ferrigni, Putnam, Jacobsen, Nichols dan McLaughlin, 1982).

Metode BSLT dapat dipercaya untuk menguji aktivitas farmakologis dari bahan-bahan alam. Beberapa senyawa bioaktif yang telah berhasil diisolasi dan aktivitasnya dimonitor dengan BSLT menunjukkan adanya korelasi terhadap suatu uji spesifik antikanker (Harmita dan Radji, 2008). Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik berdasarkan LC_{50} dengan metode BSLT maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* seperti mencit dan tikus secara *in vivo* (Carballo, Hernandez, Perez dan Garcia, 2002).

2.8 Instrumen

2.8.1 Spektrofotometer Uv-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan suatu metode identifikasi yang didasarkan pada struktur elektronik molekul, yang dikenal sebagai spektroskopi elektronik (Sastrohamidjojo, 1991). Penyerapan sinar tampak dan ultraviolet oleh suatu molekul dapat menyebabkan terjadinya eksitasi molekul dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron-elektron yang menyerap radiasi ultraviolet dalam suatu molekul organik adalah elektron-elektron yang terlibat langsung dalam ikatan antara dua atom dan elektron-elektron bebas seperti pada atom oksigen, halogen, nitrogen dan belerang (Hendayana, Kadarohman, Sumarna dan Supriatna, 1994).

Transisi yang penting pada daerah ultraviolet dan tampak yaitu transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$, sedangkan transisi $n \rightarrow \sigma^*$ jarang terjadi (Fessenden dan Fessenden, 1986). Transisi yang terjadi pada flavonoid yaitu transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ akibat adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan transisi $n \rightarrow \pi^*$ karena adanya elektron bebas. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi oleh karena itu menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah ultraviolet dan tampak (Harbone, 1987). Senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi seperti flavonoid akan mengalami penyerapan radiasi pada panjang gelombang yang lebih besar dari 217 nm (Sastrohamidjojo, 1991).

2.8.2 Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (Liquid Chromatography–Mass Spectrophotometry / LC-MS)

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) merupakan suatu metode pemisahan modern dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas dan uji kemurnian. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisis dengan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Untuk analisis dan pemisahan obat/bahan obat campuran rasemat optis aktif dikembangkan suatu fase pemisahan kiral (*Chirale Trennphasen*) yang mampu menentukan reseemis dan isomer aktif (Lindsay, 1992)

Pemisahan sampel dimulai dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen-komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yakni pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis massa (menyortir ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan (Kazakevich dan Lobrutto, 2007).

2.8.3 Spektrofotometri Inframerah (Infrared Spectrophotometry / IR)

Bila radiasi infra merah dilewatkan melalui suatu cuplikan maka molekul-molekulnya dapat menyerap energi dan terjadilah transisi di antara tingkat vibrasi dasar (*ground state*) dan tingkat energi tereksitasi (*excited state*). Pengabsorbsian energi pada berbagai frekuensi dapat dideteksi oleh Spektrofotometer Infra Merah yang memplot jumlah radiasi infra merah yang diteruskan melalui cuplikan sebagai fungsi frekuensi (panjang gelombang) radiasi (Hendayana, Kadarohman, Sumarna dan Supriatna, 1994). Penggunaan Spektroskopi inframerah pada bidang kimia organik hampir menggunakan daerah di $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Daerah dengan frekuensi lebih rendah dari 650 cm^{-1} disebut inframerah jauh dan daerah dengan frekuensi lebih tinggi dari 4000 cm^{-1} disebut inframerah dekat. Ikatan-ikatan yang

berbeda (C-C, C=C, C-O, O-H, N-H) mempunyai serapan yang berbeda dan ikatan-ikatan tersebut dalam molekul organik dapat dideteksi dengan mengidentifikasi frekuensi-frekuensi karakteristiknya sebagai pita serapan dalam spektrum IR (Sastrohamidjojo, 1991).

Sampel yang dianalisis diberi radiasi sinar inframerah. Sinar inframerah dapat menyebabkan getaran (vibrasi) pada ikatan molekul baik berupa rentangan (*stretching*) maupun berupa tekukan (*bending*). Tiap ikatan dari gugus fungsi pada molekul menyerap radiasi pada bilangan gelombang yang berbeda-beda sehingga tiap gugus memiliki bilangan gelombang yang khas dalam spektrum (Hermanto, 2009).

2.8.4 Spektrofotometri Resonansi Magnetik Nuklir (Nuclear Magnetic Resonance / NMR)

Spektrum IR suatu senyawa memberikan gambaran mengenai berbagai gugus fungsional dalam sebuah molekul organik, tetapi memberikan hanya sedikit petunjuk mengenai bagian hidrokarbon molekul itu. Spektroskopi resonansi magnetik nuklir mengisi kesenjangan ini dengan memberikan gambaran mengenai atom-atom hidrogen dalam sebuah molekul. Spektroskopi NMR didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul ini berada dalam medan magnet yang kuat (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Spektra Resonansi Magnetik Inti biasanya ditentukan dari larutan substansi yang akan dianalisis. Untuk itu pelarut yang digunakan tidak boleh mengandung atom hidrogen karena adanya atom hidrogen pada pelarut akan mengganggu puncak-puncak spektrum. Ada dua cara untuk mencegah gangguan oleh pelarut. Kita dapat menggunakan pelarut seperti Tetraklorometana, CCl_4 , yang tidak mengandung hidrogen atau pelarut yang atom-atom hidrogennya telah diganti oleh isotopnya, deuterium, sebagai contoh CDCl_3 sebagai ganti CHCl_3 . Atom-atom deuterium mempunyai sifat-sifat magnetik yang sedikit berbeda dari hidrogen sehingga mereka akan menghasilkan puncak pada area spektrum yang berbeda (Sudjadi, 1985).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam PUSLIT Kimia LIPI, Serpong dan Laboratorium Penelitian Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok. Waktu penelitian dilaksanakan kurang lebih selama empat bulan, yakni bulan Februari hingga Mei 2012.

3.2 Bahan dan Alat

3.2.1 Bahan Uji

Bahan yang diteliti adalah daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.] yang diperoleh dari hutan Mekongga, Sulawesi Tenggara. Tanaman dideterminasi di Herbarium Bogoriense LIPI-Cibinong.

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Dimetil sulfoksida (DMSO), asam klorida, kalium iodida, iodium, asam sulfat, raksa (II) klorida, serbuk magnesium, serbuk zink, serbuk asam borat, serbuk asam oksalat, gelatin, bismut (III) nitrat, asam nitrat, natrium sulfat anhidrat (Merck, Jerman); *n*-heksan, etil asetat, *n*-butanol, etanol, metanol, kloroform, isopropanol, air suling, natrium bikarbonat, timbal (II) asetat, asam asetat anhidrat (Univar, USA), α -naftol, aseton, eter, FeCl₃, NaCl (Mallinckrodt Chemicals, USA), KOH, AlCl₃, NH₄OH, benzen, hidrogen peroksida, silika gel 60 (35-70 mesh & 70-230 mesh, E. Merck 1.07734), pelat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (E. Merck 05554), pipa kapiler, aluminium foil, H₂SO₄ 10%, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Vitamin C, Kuersetin, Ekstrak Centella Herba, Ekstrak Rhei Radix, Ekstrak Orthosiphonis Folium, Ekstrak Theae Folium, Ekstrak Chinae Cortex, Ekstrak Psidii Folium dan Ekstrak Caryophulli Flos.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini (Uji Toksisitas) adalah larva udang (*Artemia salina* Leach).

3.2.4 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian antara lain : peralatan ekstraksi (perkolator), peralatan partisi, botol vial 12 cc, botol 150 mL, erlenmeyer asah 250 mL, gelas ukur 100 mL dan 500 mL, tabung reaksi, batang pengaduk, corong, mortar, lampu UV, *micro plate*, *chamber*, *ependorf*, pipet tetes, pinset, *hot plate*, *Chromatotron*, penguap putar (*rotary evaporator* Buchii), peralatan Kromatografi Kolom, Kromatografi Lapis Tipis, Spektrofotometri Uv-Vis (Hitachi U-2000), Infra Merah (Perkin Elmer 16 PC, FTIR Prestige-21 Shiimadzu), LC-MS Mariner Biospectrometry dan JEOL JNM ECA-500.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense (Pusat Penelitian Biologi, LIPI-Cibinong)

3.3.2 Preparasi Sampel

Sejumlah daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.] segar dipetik, dikumpulkan, disortir dan dikeringkan (pengumpulan dan pengeringan dilakukan oleh tim konservasi LIPI). Simplisia yang telah kering dihancurkan hingga menjadi partikel kecil.

3.3.3 Ekstraksi dan Partisi

Serbuk kering sebanyak 600 gram diekstraksi secara maseasi yang dimodifikasi dengan perkolasi menggunakan metanol sebanyak 6 L sehingga seluruh serbuk terendam selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Perkolasi dilakukan hingga larutan tampak jernih (± 5 hari). Seluruh ekstrak yang didapat ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven 40⁰C sehingga didapat ekstrak metanol awal (*Crude extract*). Ekstrak yang telah kering ditimbang untuk ditentukan rendemennya terhadap berat simplisia awal.

Ekstrak metanol awal dipartisi menggunakan beberapa pelarut yang semakin meningkat kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, butanol dan metanol (Gambar 3.1). Ekstrak metanol awal dihaluskan dan dilarutkan dengan sedikit aquadest lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dan dipartisi berturut-turut

menggunakan n-heksan : air (1:1), etil asetat : air (1:1), butanol : air (1:1) dan metanol, masing-masing sebanyak 700 ml. Seluruh ekstrak yang didapat dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven 40°C sehingga didapatlah ekstrak kental lima fraksi yaitu n-heksana, etil asetat, butanol dan metanol. Masing-masing fraksi dan ekstrak metanol awal selanjutnya ditimbang dan dilakukan uji aktivitas antioksidan dan toksisitas.

3.3.4 Uji Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (Hatano *et al.*, 1988; Yen dan Chen, 1995) yang telah dimodifikasi.

3.3.4.1 Pembuatan Larutan DPPH (BM 394,32)

Larutan DPPH dibuat dengan cara menimbang seksama lebih kurang 19,7 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. dalam labu ukur 50 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a. hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan DPPH 1mM.

3.3.4.2 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan terdiri atas 4000 µL metanol p.a. lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1000 µL larutan DPPH sehingga didapat konsentrasi DPPH akhir sebesar 0,2 mM.

3.3.4.3 Pembuatan Larutan Standar

Standar yang digunakan adalah Asam askorbat dan Kuersetin. Larutan induk standar konsentrasi 1000 µg/mL dibuat dengan sejumlah 5 mg standar ditimbang dan dilarutkan dalam 5 mL methanol p.a. kemudian dikocok hingga homogen.

Pembuatan larutan seri standar 1, 5,10,15 dan 20 µg/mL. Dipipet 5,0; 25,0; 50,0; 75,0 dan 100,0 µL larutan induk standar ke dalam lima tabung reaksi dan ditambah dengan methanol p.a. sampai volume total 4 mL.

3.3.4.4 Pembuatan Larutan Uji

Sejumlah 5 mg sampel dilarutkan dalam metanol p.a. 5 ml sehingga didapatkan konsentrasi 1000 µg/mL (1000 ppm) sebagai larutan induk. Selanjutnya dibuat larutan seri dengan konsentrasi antara 40-200 µg/mL yakni

dengan memasukkan larutan induk sebanyak 100-500 μL ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya masing-masing tabung reaksi dicukupkan volumenya dengan metanol hingga 4 mL.

3.3.4.5 Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH yang telah dibuat sebesar 1 mM diukur spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm lalu ditentukan panjang gelombang optimumnya.

3.3.4.6 Pengujian Sampel

Masing-masing tabung reaksi yang telah berisi 4 mL larutan uji dalam metanol p.a ditambah dengan 1 mL larutan DPPH 1mM lalu dikocok hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi 30 menit, serapan masing-masing larutan uji diukur pada panjang gelombang optimumnya. Nilai IC_{50} ditentukan dengan program komputer sederhana untuk analisis probit pada taraf kepercayaan 95% (Blois, 1958). Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus :

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

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan $y = a + bx$ ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y adalah persentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50% konsentrasi awal. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x apabila y senilai 50.

3.3.6 Uji Toksisitas

Metode Meyer digunakan untuk menguji toksisitas sampel secara umum dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach. Langkah pengerjaannya sebagai berikut (Meyer *et al.*, 1982) :

3.3.6.1 Penetasan Larva Udang

Disiapkan wadah untuk penetasan telur udang. Di satu ruang dalam wadah tersebut diletakkan lampu untuk menghangatkan suhu dalam penetasan,

sedangkan di ruang sebelahnya diletakkan telur udang. Wadah diisi air laut lalu dimasukkan 50-100 mg telur udang untuk ditetaskan. Pada bagian telur ditutup dengan aluminium foil dan lampu dinyalakan selama 48 jam untuk menetas telur. Diambil larva udang yang akan diuji dengan pipet.

3.3.6.2 Pembuatan larutan Uji

Ekstrak yang akan diuji dibuat dalam konsentrasi 20, 200, 1000 dan 2000 ppm dalam air laut. Pertama, ditimbang 10 mg ekstrak dan dilarutkan 10 μ L DMSO serta air laut 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 2000 ppm yang merupakan larutan induk. Selanjutnya dilakukan pengenceran menjadi konsentrasi 1000, 200 dan 20 ppm.

3.3.4.6 Prosedur Pengujian

Sebanyak 100 μ L air laut yang mengandung larva udang sebanyak 10-11 ekor dipipet, kemudian dimasukkan ke dalam wadah uji. Lalu ditambahkan larutan sampel yang akan diuji masing-masing sebanyak 100 μ L, dengan konsentrasi 20, 200, 1000 dan 2000 ppm, masing-masing konsentrasi dilakukan triplo. Untuk kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan masih hidup dari tiap wadah uji.

Selanjutnya dihitung mortalitas dengan cara : akumulasi mati dibagi jumlah akumulasi hidup dan mati (total) dikali 100%. Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap mortalitas sebagai sumbu y. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linier $y = a + bx$. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm untuk ekstrak dan < 30 ppm untuk suatu senyawa murni.

$$\text{Mortalitas} = \frac{\text{akumulasi mati}}{\text{akumulasi mati} + \text{akumulasi hidup}} \times 100\% \quad (3.2)$$

3.3.6 Fraksinasi dan Pemurnian

Fraksinasi atau pemisahan komponen-komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* dilakukan secara kromatografi,

yakni kromatografi kolom dan kromatografi radial serta diidentifikasi lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis.

3.3.6.1 Kromatografi Kolom

Pemisahan awal senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak dilakukan secara kromatografi kolom yang dipercepat dengan bantuan vakum. Kemudian hasil pemisahan kasar ini difraksinasi lebih lanjut secara kromatografi kolom dengan diameter kolom yang lebih kecil dan kecepatan pengelusan yang didasarkan pada gaya gravitasi. Preparasi kolom dilakukan dengan cara basah, yakni memasukkan silika dengan cara membuat suspensi dalam n-heksana. Kolom beserta kerannya dipasang tegak lurus pada statif, lalu dimasukkan sedikit kapas pada ujung mulut kolom sebelum keran. Suspensi silika dimasukkan ke dalam kolom sambil dialiri eluen secara terus menerus dengan keran terbuka sampai permukaan absorben tidak turun lagi.

Ekstrak etil asetat daun *Kjelbergiodendron celebicus* ditimbang sebanyak 11,99 g, kemudian ditambahkan silika gel 60 (35-70 mesh) sebanyak $\pm 6,00$ g selanjutnya digerus hingga homogen. Silika gel 60 G (ukuran partikel $< 55\mu\text{m}$) ditimbang sebanyak 70,04 g, lalu dibuat suspensi dengan cara menambahkan pelarut n-heksana secukupnya. Suspensi silika dimasukkan ke dalam kolom kromatografi ($d = 9,50$ cm) yang dilengkapi kolom vakum hingga padat diikuti penambahan n-heksana sambil vakum dinyalakan. Sampel yang telah dicampur dengan silika gel 60 dimasukkan ke dalam kolom kemudian ditutup dengan kapas secukupnya. Eluen n-heksana ditambahkan hingga seluruh sampel dalam kolom terendam sambil vakum tetap dibuka. Proses elusi dilakukan dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat dan etil asetat : metanol dielusi secara bergradien dengan kenaikan 1% (He : Ea 1-5%), 5% (He : Ea 5% - Ea : Me 25%), 25% (Ea : Me 25-100%), masing-masing eluen sebanyak 700 ml. Fraksi yang dihasilkan ditampung per 100 ml dan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, lalu diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dengan penyemprotan H_2SO_4 10%. Fraksi dengan pola kromatogram yang sama, digabung dalam satu vial yang telah ditimbang bobot kosongnya. Fraksi yang didapatkan sebanyak 15 fraksi, yaitu Fr1-Fr15. Fraksi 11 dianalisis lebih lanjut dengan kromatografi kolom lambat. Skema kerja dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Fraksi 11 hasil kromatografi kolom cepat ditimbang sebanyak 1,00 g dan ditambahkan dengan 0,50 g silika gel 60 (35-70 mesh) kemudian digerus hingga homogen. Kolom kromatografi dengan diameter 4,25 cm disiapkan. Suspensi silika gel dimasukkan ke dalam kolom seperti cara sebelumnya. Campuran Fr11 dan silika gel 60 dimasukkan lalu n-heksana ditambahkan hingga seluruh sampel terendam. Proses elusi dilakukan dengan eluen n-heksana : etil asetat dan etil asetat : metanol secara bergradien masing-masing sebanyak 500 ml. Fraksi yang didapatkan ditampung dalam botol setiap 50 ml. Masing-masing fraksi diidentifikasi dengan KLT dan penyemprotan H₂SO₄ 10%. Fraksi dengan pola kromatogram yang sama, digabung dalam satu vial yang telah ditimbang bobot kosongnya. Fraksi yang didapatkan sebanyak 45 fraksi, yaitu Fr11.1-Fr11.45. Fr11.32 dianalisis lebih lanjut.

3.3.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Radial

Fr11.32 dianalisis lebih lanjut menggunakan kromatografi lapis tipis radial yaitu kromatotron. Pelat kromatotron dengan fase diam silika gel 60 G dan tebal 2 mm dikeringkan dalam oven selama 5 menit pada suhu 50°C. Pelat kemudian diletakkan dalam *chamber* lalu motor penggerak dinyalakan dan pelat dibasahi dengan mengalirkan n-heksana. Aliran eluen langsung dihentikan setelah tetes pertama n-heksana keluar. Sebanyak 73,1 mg Fr11.32 dilarutkan dengan sedikit heksana. Sampel dimasukkan ke lubang *chamber* dengan bantuan pipet tetes dan diaplikasikan pada pelat setelah n-heksana sudah tidak keluar. Eluen n-heksana : etil asetat dan etil asetat : metanol dalam berbagai perbandingan dialirkan ke dalam *chamber* dan proses elusi dibiarkan berlangsung. Pita-pita hasil elusi pada KLT diidentifikasi dengan lampu UV. Fraksi yang dihasilkan ditampung dalam botol vial 12 cc per 6 ml. Masing-masing fraksi diidentifikasi dengan KLT dan penyemprotan H₂SO₄ 10%. Fraksi dengan pola kromatogram dan warna yang sama, digabung dalam 1 vial yang telah ditimbang bobot kosongnya. Fraksi yang didapat sebanyak 5 fraksi, yaitu Fr11.32a-Fr11.32e. Fraksi 11.32a membentuk satu spot pada identifikasi dengan KLT.

3.3.6.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Seluruh eluat hasil fraksinasi diidentifikasi keberadaan senyawa kimianya dengan kromatografi lapis tipis menggunakan lempeng silika GF₂₅₄. Eluen yang

digunakan mengacu pada pelarut yang mengelusikannya pada sistem kromatografi, yakni n-heksana-etil asetat dan etil asetat-metanol dalam berbagai perbandingan. Eluat yang telah ditotolkan pada pelat KLT selanjutnya dielusikan dalam *chamber* yang telah dijenuhkan dan diamati secara visual menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 serta disemprot dengan pereaksi semprot asam sulfat 10% dalam metanol. Fraksi yang menunjukkan pola kromatogram yang sama digabung.

3.3.7 Penapisan Fitokimia

3.3.7.1 Identifikasi Alkaloid (Depkes, 1995 dan Farnsworth, 1966)

Larutan Uji : 500 mg ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL air kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring sehingga diperoleh filtrat.

a. Pereaksi Bouchardat

Pereaksi : 2 g iodium P dan 4 g KI P dilarutkan dalam 100,0 mL aquades

Prosedur : 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Bouchardat. Jika terbentuk endapan coklat sampai hitam maka positif mengandung alkaloid.

b. Pereaksi Mayer

Pereaksi : campuran larutan raksa (II) klorida P (1,358 g HgCl_2 dalam 60 mL akuades) dengan larutan kalium iodida P (5 g kalium iodida P dalam 10 mL akuades) dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 mL.

Prosedur : 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan menggumpal putih atau kuning yang larut dalam metanol maka positif mengandung alkaloid.

c. Pereaksi Dragendorf

Pereaksi : campuran larutan bismuth nitrat P (8 g bismuth nitrat P dalam 20 mL asam nitrat) dan larutan kalium iodida P (27,2 g kalium iodida P dalam 50,0 mL akuades) yang didiamkan hingga memisah sempurna. Larutan jernih diambil dan dicukupkan volumenya dengan akuades hingga 100,0 mL.

Prosedur : 1 mL filtrat ditambahkan 2 tetes Pereaksi Dragendorf. Jika terbentuk endapan jingga coklat maka positif mengandung alkaloid.

Serbuk mengandung alkaloid jika sekurang-kurangnya terbentuk endapan dengan dua golongan larutan percobaan yang digunakan (Departemen Kesehatan RI, 1995).

3.3.7.2 Identifikasi Flavonoid (Depkes, 1995)

Beberapa mg ekstrak ditambahkan 4 mL etanol P hingga ekstrak larut. Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu daun kumis kucing.

- a. 2 mL larutan ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 2 mL HCl 2N, didiamkan selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 10 tetes HCl pekat P. Jika terbentuk warna merah intensif dalam waktu 2-5 menit menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
- b. 2 mL larutan ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 10 tetes HCl pekat P. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu (positif flavonoid) atau kuning jingga (flavon, kalkon dan auron)
- c. Ekstrak dilarutkan dalam aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk asam oksalat P, dipanaskan hati-hati dan dihindari pemnasan berlebihan. Sisa dicampur dengan 10 ml eter P. Diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berflurosensi kuning intensif menunjukkan adanya flavanoid. Hasil uji dibandingkan dengan standar yaitu *Ortosiphon folium*.

3.3.7.3 Identifikasi Sterol / Terpen (Farnsworth, 1966)

10 mg ekstrak ditambahkan 5 mL eter dan diuapkan di dalam cawan penguap. Residu ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Ekstrak mengandung sterol/terpen apabila terbentuk warna merah-hijau atau violet-biru. Hasil uji dibandingkan dengan standar yaitu *Caryophili flos*.

3.3.7.4 Identifikasi Tanin (Farnsworth, 1966)

Beberapa mg ekstrak kental ditambahkan 15 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Saring filtrat (filtrat c) :

- a. Ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1% menghasilkan hijau violet.
- b. Ditambahkan beberapa tetes gelatin membentuk endapan putih.
- c. Dijenuhkan dengan Na asetat ditambah FeCl_3 1% menghasilkan warna biru tinta atau hitam, menunjukkan adanya tanin galat.

Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu *Camellia folium*.

3.3.7.5 Identifikasi Saponin (Depkes, 1995)

500 mg ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, dinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap setinggi 1 hingga 10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang. Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu *Liquiritae radix*.

3.3.7.6 Identifikasi Gula (Depkes, 1995)

Terhadap gula dilakukan Reaksi Molisch. Pereaksi dibuat dari campuran 1,5 g α -naftol P dalam 50 mL metanol. 1 mL larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikeringkan di atas penangas air. Sisanya dilarutkan dalam 2 mL air dan 5 tetes Molisch LP. Kemudian ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat P. Terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya gula. Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu *Nerii folium*.

3.3.7.7 Identifikasi Kuinon & Antrakuinon (Depkes, 1995)

Beberapa mg ekstrak kental ditambahkan 10 mL air panas. Kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit. Filtrat disaring. Ke dalam 5 mL filtrat ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N, terbentuk warna merah (positif kuinon). Hasil identifikasi dibandingkan dengan standar yaitu *Rheii radix*.

3.3.8 Identifikasi Senyawa

Isolat murni (Fr11.32a) yang didapat diidentifikasi struktur kimianya dengan cara Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Spektrofotometri Ultraviolet-Visible (UV-Vis), Spektrofotometri Inframerah (IR), Kromatografi Cairan-Spektroskopi Massa (LCMS) dan Spektroskopi Resonansi Magnetik Nuklir (NMR). Selanjutnya terhadap isolat dilakukan uji toksisitas dan uji antioksidan.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Penyiapan Bahan

Sejumlah daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. segar dipetik dari pohonnya yang berada di hutan Mekongga, Sulawesi Tenggara oleh tim konservasi dari ICBG (*International Cooperative Biodiversity Group*) dan LIPI-Cibinong. Selanjutnya, daun dibersihkan dan dikeringkan. Kemudian dikirim ke LIPI-Cibinong untuk disempurnakan pengeringannya. Tujuan pengeringan adalah untuk menghilangkan kandungan air yang dapat menyebabkan reaksi enzimatik. Reaksi enzimatik dapat menyebabkan rusaknya sampel akibat susunan senyawa dalam simplisia yang berubah (Harborne, 1987). Selanjutnya, simplisia kering dihancurkan hingga menjadi serbuk untuk memperluas bidang kontak dengan pelarut sehingga proses pengekstraksiannya maksimal dan seluruh kandungan kimia dapat tersari. Serbuk kering dikirim ke laboratorium kimia bahan alam PUSLIT Kimia LIPI Serpong untuk diidentifikasi.

4.2. Ekstraksi dan Partisi

Serbuk kering daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. sebanyak 600 gram diekstraksi dengan metode maserasi dengan modifikasi perkolasi. Maserasi merupakan salah satu proses ekstraksi yang dilakukan pada suhu ruangan sehingga dipilih untuk mencegah rusaknya senyawa metabolit sekunder yang tidak tahan terhadap suhu tinggi.

Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana perkolator lalu direndam metanol selama 24 jam dengan sesekali pengadukan. Hal ini dimaksudkan agar pelarut metanol mampu menarik kandungan kimia dalam simplisia. Menurut Lenny (2006) proses perendaman sampel tumbuhan akan menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan luar sel. Hal ini menyebabkan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Ekstraksi dilakukan hingga warna larutan yang menetes bening. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia telah terekstrak seluruhnya.

Ekstrak cair yang didapat selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-50°C. Pengeringan dilanjutkan di dalam oven bersuhu 40°C sehingga menjadi ekstrak kering yang disebut sebagai ekstrak metanol awal (*crude extract*). Ekstrak metanol awal yang diperoleh sebanyak 65,08 gram (rendemen 10,84 %) berupa kepingan dan berwarna hijau pekat.

Pemisahan dalam penelitian ini sebagian besar dilakukan berdasarkan kepolaran. Oleh karena itu, ekstrak metanol dipisahkan secara partisi dengan corong pisah menggunakan dua pelarut yang berbeda kepolarannya. Pertama, ekstrak metanol dihaluskan dan dilarutkan dengan sedikit aquadest untuk memperbesar luas permukaan ekstrak sehingga penyarian lebih sempurna. Kemudian ditambah n-heksana : aquadest 1:1 dan dimasukkan ke dalam corong pisah dengan pengocokan perlahan sebelum didiamkan beberapa jam. Senyawa kimia yang bersifat nonpolar akan tertarik ke lapisan heksana yang terletak di atas. Lapisan heksana cenderung lebih hijau dan pekat karena klorofil yang merupakan zat warna daun bersifat nonpolar sehingga tertarik ke dalam lapisan heksana tersebut. Lapisan heksana dipisahkan, diuapkan dan dikeringkan sehingga diperoleh fraksi heksana sebanyak 5,35 gram. Lapisan air dipartisi kembali berturut-turut dengan pelarut yang lebih polar yakni etil asetat, butanol dan metanol dengan cara yang sama dan diperoleh berturut-turut 14,94 gram fraksi etil asetat; 6,45 gram fraksi butanol; 11,84 fraksi metanol dan 6,12 residu (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Data persentase rendemen ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus*

No	Jenis Fraksi	Bobot (gram)	Rendemen (%)
1	Ekstrak metanol awal	65,8	10,84
2	Fraksi n-heksana	5,35	10,09
3	Fraksi etil asetat	14,94	29,79
4	Fraksi butanol	6,45	12,97
5	Fraksi metanol	11,84	23,68
6	Residu	6,12	12,40

4.3 Uji Aktifitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode peredaman terhadap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan metode yang umum digunakan sebagai radikal untuk menguji aktivitas antioksidan karena sifatnya yang stabil dalam bentuk radikal bebas dan merupakan metode yang sederhana, cepat dan murah (Bozin, Mimica, Samojilik, Goran dan Igc, 2008).

Aktivitas antioksidan sampel diukur melalui pengukuran intensitas serapan dari setiap sampel setelah ditambahkan DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang tertentu. Berdasarkan hal tersebut, sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan, dilakukan terlebih dahulu penentuan panjang gelombang maksimum larutan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil. Hasil percobaan menunjukkan serapan maksimum 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil terletak pada panjang gelombang 515 nm. Hal ini berarti bahwa pengukuran serapan atas peredaman seluruh ekstrak maupun fraksi terhadap radikal bebas DPPH dilakukan pada panjang gelombang 515 nm.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (Hatano *et al.*, 1988; Yen dan Chen, 1995) yang prinsip kerjanya berdasarkan pada kemampuan sampel dalam meredam radikal bebas (DPPH) melalui donor atom hidrogen atau elektron. Pengujian aktivitas antioksidan terhadap ke-5 fraksi awal daun *Kjelbergiodendron celebicus* menunjukkan bahwa seluruh fraksi mempunyai aktivitas antioksidan, kecuali fraksi n-heksana. Selain dapat dilihat secara visual melalui perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning, keaktifan ini juga ditunjukkan secara kuantitatif melalui penurunan absorbansi larutan DPPH sehingga menyebabkan nilai IC_{50} nya yang kurang dari 1000 ppm yang bernilai kurang dari 50 ppm. Fraksi butanol memiliki aktivitas antioksidan yang paling baik dengan nilai IC_{50} sebesar 8,34 ppm (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Data hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak dari daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. dengan metode DPPH

Sampel	Absorbansi		Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	Persamaan Regresi Linear	IC50 (ppm)
	Blanko	Sampel				
Quersetin	1,823	0,127	15	93,03	$y = 6,514x + 4,108$ $r^2 = 0,942$	7,05
		0,343	10	81,18		
		1,083	5	40,59		
		1,758	1	3,57		
Vit C	1,823	0,732	15	59,85	$y = 4,218x - 1,029$ $r^2 = 0,986$	12,09
		0,994	10	45,47		
		1,481	5	18,76		
		1,776	1	2,58		
Metanol Awal	1,920	0,130	65	93,23	$y = 0,897x + 38,710$ $r^2 = 0,934$	12,59
		0,257	50	86,61		
		0,549	30	71,41		
		1,013	15	47,24		
Heksana	1,920	0,344	250	82,08	$y = 0,204x + 34,060$ $r^2 = 0,947$	78,14
		0,473	200	75,36		
		0,554	150	71,15		
		0,896	100	53,33		
		1,115	50	41,93		
Etil Asetat	1,920	0,136	80	92,92	$y = 0,921x + 23,690$ $r^2 = 0,92$	26,52
		0,471	50	75,47		
		0,947	20	50,68		
		1,476	10	23,13		
Butanol	1,920	0,121	80	93,70	$y = 0,663x + 44,470$ $r^2 = 0,925$	8,34
		0,215	65	88,80		
		0,374	50	80,52		
		0,571	30	70,26		
		0,993	15	48,28		
Metanol	1,920	0,128	80	93,33	$y = 0,702x + 42,580$ $r^2 = 0,917$	10,55
		0,186	65	90,31		
		0,286	50	85,10		
		0,974	15	49,27		

Aktivitas antioksidan dari suatu sampel uji didasarkan pada kemampuannya dalam meredam aktivitas radikal DPPH melalui donasi atom hidrogen atau elektron. Analisa DPPH merupakan salah satu metoda pengujian untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa dalam bertindak sebagai donor atom hidrogen (Stoilova *et al*, 2006). Dalam analisis tersebut, 1,1-difenil-2-

pikrilhidrazil (DPPH) bertindak sebagai senyawa radikal sintetis yang akan menerima atom hidrogen dari senyawa ekstrak yang aktif antioksidannya. Pendonoran atom hidrogen kepada DPPH akan mengubah bentuk DPPH yang radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) menjadi bentuk non-radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) yang dapat diamati secara visual melalui perubahan warnanya dan secara kuantitatif melalui absorbansinya. DPPH yang berbentuk radikal berwarna ungu pekat. Apabila terdonasi atom hidrogen, DPPH berubah menjadi bentuk nonradikal yang ditandai dengan memudarnya warna ungu menjadi lebih muda hingga kuning. Semakin memudar warna larutan DPPH maka ekstrak tersebut semakin aktif. Secara kuantitatif, kemampuan suatu ekstrak dalam meredam radikal DPPH ditunjukkan dengan penurunan absorbansi larutan uji yang dihitung terhadap larutan blanko. Semakin kecil nilai absorbansi maka semakin kuat ekstrak dalam meredam DPPH.

Ekstrak kasar metanol daun *Kjelbergiodendron celebicus* menunjukkan efek yang cukup signifikan dalam meredam DPPH yakni mencapai 86,61% pada konsentrasi 50 µg/mL dan IC_{50} sebesar 12,59 µg/mL. Hasil fraksinasi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi adalah fraksi butanol dengan nilai IC_{50} 8,34 µg/mL (Gambar 4.1.). Aktivitas antioksidan fraksi butanol menunjukkan bahwa di dalam fraksi tersebut terkandung senyawa aktif. Berdasarkan Tabel 4.2 aktifitas antioksidan semakin naik seiring dengan naiknya kepolaran fraksi. Hal ini sesuai dengan sifat-sifat senyawa antioksidan pada ekstrak tanaman yang sebagian besar berupa senyawa polifenol atau bergugus -OH yang merupakan gugus bersifat polar.

4.4. Uji Toksisitas

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan suatu metode pengujian menggunakan hewan uji yaitu *Artemia salina* Leach yang dapat dijadikan bioassay sederhana untuk meneliti toksisitas suatu senyawa dengan cara menentukan nilai LC_{50} baik dari komponen aktif maupun ekstrak dari suatu tanaman. Apabila ekstrak tergolong toksik maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker (Carballo, 2002). Metode ini dapat

digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam karena mudah, cepat murah dan cukup reproduibel (Harmita dan radji, 2008).

Suatu senyawa dinyatakan memiliki potensi toksisitas jika nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm. LC_{50} atau *Lethal Concentration 50* merupakan konsentrasi dimana zat dapat menyebabkan terjadinya kematian 50% pada hewan coba yakni *Artemia salina* Leach (Meyer *et al.*, 1982). Uji BSLT terhadap lima ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* bernilai antara 100-200 ppm (Tabel 4.3) yakni 243,5 ppm (Ekstrak metanol awal), 214,8 $\mu\text{g/mL}$ (fraksi n-heksana), 50,84 ppm (fraksi etil asetat), 228 ppm (fraksi butanol) dan 168,7 ppm (fraksi metanol). Fraksi etil asetat memiliki sifat toksik yang terbesar (Gambar 4.2.). Jadi, dapat dikatakan bahwa ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* pada pengujian ini memiliki potensi toksisitas menurut metode BSLT yakni pengujian dengan menggunakan hewan coba *Artemia salina* Leach.

Mekanisme kematian larva udang berhubungan dengan dimungkinkan karena keberadaan metabolit sekunder golongan alkaloid, terpen, tanin, saponin, antraquinon, glikosida maupun flavonoid dalam ekstrak-ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* yang bersifat toksik.

Jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach pada setiap tabung uji dalam berbagai konsentrasi ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* ditunjukkan pada Tabel 4.3. dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa pada berbagai konsentrasi ekstrak pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang cukup toksik terhadap kematian larva artemia *Artemia salina* Leach. Berdasarkan penelitian Rita, Suirta, dan Sadikin (2008) senyawa toksik yang terkandung dalam ekstrak buah pare dapat mengakibatkan efek antifedant. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu hingga menyebabkan larva mati. Mekanisme di atas menjadi kemungkinan penyebab sifat toksik dari ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus*.

Tabel 4.3. Hasil uji toksisitas daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr. dengan metode BSLT

NO	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Log	Mortalitas	Persamaan Regresi Linear	R ²	LC 50
1	Metanol Awal	10	1	11,54	$y = 30,668x - 23,189$	0,9305	243,50
		100	2	31,91			
		500	2,7	53,33			
		1000	3	77,27			
2	Heksana	10	1	7,84	$y = 36,098x - 34,179$	0,9194	214,80
		100	2	27,91			
		500	2,7	57,50			
		1000	3	84,09			
3	Etil asetat	10	1	23,53	$y = 39,302x - 17,057$	0,9935	50,84
		100	2	58,06			
		500	2,7	92,11			
		1000	3	100,00			
4	Butanol	10	1	4,17	$y = 36,829x - 36,838$	0,9554	228,00
		100	2	30,00			
		500	2,7	57,50			
		1000	3	81,40			
5	Metanol	10	1	11,76	$y = 35,577x - 29,232$	0,9316	168,70
		100	2	32,56			
		500	2,7	61,90			
		1000	3	86,36			

4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan pemeriksaan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel. Pemeriksaan terhadap ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat dari daun *Kjelbergiodendron celebicus* meliputi uji golongan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tanin, kuinon, glikosida dan saponin (Tabel 4.4.).

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan menggunakan larutan pereaksi Dragendorf, Mayer dan Bouchardat. Sampel ditambahkan HCl encer dalam tabung reaksi lalu diteteskan larutan pereaksi. Apabila suatu ekstrak mengandung senyawa alkaloid maka penambahan larutan pereaksi Mayer akan membentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning, dengan larutan pereaksi Bouchardat akan memberikan endapan berwarna coklat hingga hitam, dan hasil

Universitas Indonesia

elusi ekstrak ketika disemprot dengan larutan pereaksi Dragendorf akan menimbulkan bercak jingga. Hasil positif ditunjukkan oleh ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat.

Flavonoid dalam ekstrak diidentifikasi keberadaannya menggunakan Tes Shinoda. Serbuk seng atau magnesium dalam suasana asam akan menghasilkan reduktor hidrogen yang akan mereduksi flavonoid sehingga akan terbentuk kompleks berwarna. Pemberian logam seng akan membentuk warna merah intensif setelah 2 menit, sedangkan logam magnesium membentuk warna merah jingga hingga ungu atau kuning jingga. Hasil skrining fraksi etil asetat warna kuning jingga. Jadi fraksi etil asetat dan ekstrak metanol mengandung flavonoid.

Apabila suatu ekstrak mengandung tanin, penambahan ekstrak dengan larutan gelatin dan larutan natrium klorida akan menghasilkan endapan putih. Selain itu, pemeriksaan tanin bisa dilakukan dengan penambahan beberapa tetes larutan FeCl_3 1% yang akan membentuk warna hijau violet. Berdasarkan hasil skrining, ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat daun *Kjelbergiodendron celebicus* mengandung tanin.

Fitosterol dan terpen dapat diidentifikasi keberadaannya dengan tes Liebermann-Bouchard. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah-hijau atau violet-biru. Ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat keduanya membentuk warna violet-biru sehingga fraksi tersebut positif terhadap sterol/terpen. Dalam cairan, saponin dapat membentuk busa setelah pengocokan kuat selama 10 detik dengan air suling panas dan busa bertahan tidak kurang dari 10 detik. Kedua fraksi tersebut membentuk busa yang mantap lebih dari 10 menit.

Pada proses identifikasi glikosida dilakukan untuk identifikasi terhadap keberadaan gula, yakni dengan tes Molisch setelah dilakukan proses hidrolisis, yaitu dengan cara memanaskan ekstrak di dalam larutan asam terlebih dahulu. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin ungu setelah ditambahkan larutan pereaksi molisch dan H_2SO_4 pekat. Berdasarkan pengujian, ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat mengandung glikosida.

Tes Borntrager digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan antrakuinon dalam suatu ekstrak. Hasil positif tes Borntrager ditunjukkan dengan

dihasilkannya warna kuning saat dilakukan penarikan senyawa antrakuinon dengan benzene dan dihasilkan warna merah saat ditambahkan amonia encer. Berdasarkan hasil skrining, kedua fraksi dari daun *Kjelbergiodendron celebicus* tidak mengandung antrakuinon.

Tabel 4.4. Data penapisan fitokimia ekstrak metanol awal dan fraksi etil asetat daun *Kjelbergiodendron celebicus* (Koord)Merr.

Golongan Kimia	Pengamatan Sampel	
	Ekstrak metanol awal	Fraksi etil asetat
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Tanin	+	+
Sterol/Terpen	+	+
Saponin	+	+
Antraquinon	-	-
Glikosida	+	+

4.6. Isolasi Senyawa Aktif

Berdasarkan hasil uji antioksidan dan uji toksisitas 5 fraksi hasil partisi dari ekstrak metanol, dipilih fraksi etil asetat untuk difraksinasi lebih lanjut. Sebanyak 11,99 g fraksi etil asetat difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dipercepat (KKC) dengan silika gel 60 sebagai fase diam dan pengelusi dengan kepolaran bertingkat dalam berbagai perbandingan, yakni n-heksan : etil asetat dan etil asetat : metanol sebagai fase geraknya. Hasil dari KKC tersebut didapatkan 15 fraksi (Fr1-Fr15). Hasil penggabungan berdasarkan kesamaan pola kromatogram pada identifikasi KLT.

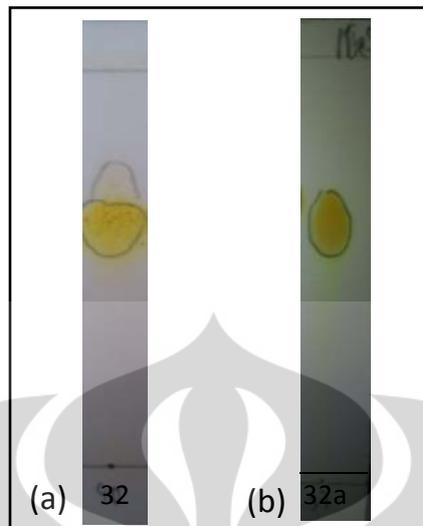
Lima belas fraksi hasil pemisahan fraksi etil asetat dilakukan uji pendahuluan antioksidan dengan reaksi semprot DPPH dan juga uji toksisitas metode BSLT (Tabel 4.5.). Pengujian antioksidan dengan reaksi semprot DPPH pada KLT menunjukkan bahwa terdapat 5 fraksi yang bersifat aktif sebagai antioksidan, yaitu Fr5, Fr11, Fr12, Fr14 dan Fr15 yang ditandai dengan

terbentuknya warna kuning pada totolan di KLT. Selanjutnya, ke-5 fraksi tersebut dilakukan pengujian antioksidan dengan metode DPPH secara *in vitro*. Hasil pengujian tersebut menunjukkan bahwa ke-5 fraksi memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik karena memiliki IC_{50} kurang dari 1000 ppm yakni Fr5 sebesar 28,22 ppm, Fr11 sebesar 29,13 ppm, Fr12 sebesar 11,93 ppm, Fr13 sebesar 19,02 ppm dan Fr15 sebesar 12,06 ppm. Sedangkan pada uji toksisitas ke-15 fraksi menggunakan metode BSLT memperlihatkan potensi toksisitas akut dengan nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm yakni berkisar antara 20–300 IC_{50} (Tabel 4.5) Sifat toksik terbesar dimiliki oleh Fr12 dengan nilai LC_{50} sebesar 22,88 ppm.

Berdasarkan nilai IC_{50} , LC_{50} dan berat fraksi maka dipilihlah fraksi 11 untuk difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam berupa silika dan fase gerak yang semakin meningkat kepolarannya berupa campuran pelarut berbagai perbandingan yakni n-heksan : etil asetat dan etil asetat : metanol.

4.6.1 Isolasi Senyawa Fr11.32

Pemisahan fraksi 11 menggunakan kromatografi kolom silika menghasilkan 151 fraksi (botol 50 mL). Setelah diidentifikasi dengan KLT, fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama digabungkan sehingga diperoleh fraksi gabungan sebanyak 45 (Fr11.1 - Fr11.45). Pada fraksi gabungan Fr 11.32 terdapat pasta kuning yang pada pelat KLT dengan eluen 2,0 mL etil-asetat 100% tampak 2 spot berwarna kuning (Gambar 4.5a). Sebanyak 73,1 mg Fr11.32 dilakukan pemurnian lebih lanjut menggunakan kromatotron.



Keterangan : (a) Kromatogram Fr11.32 hasil pemisahan dengan Kromatografi Kolom, eluen Etil Asetat 100% (b) Kromatogram Fr11.32a hasil pemisahan dengan Kromatotron, eluen Etil Asetat 100%

Gambar 4.5. Pola kromatogram Fr11.32 (a) dan Fr11.32a (b)

Pemisahan dengan kromatotron menggunakan pelat kaca berbentuk lingkaran dengan fase diam berupa silika gel G 60 (ukuran partikel $<55\mu\text{m}$) dengan tebal 2 mm. Sebelum digunakan, pelat dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 5 menit terlebih dahulu untuk menghilangkan sisa pelarut atau uap air yang terjerap sehingga dapat mengaktifkan silika gel. Pelat selanjutnya dipasang pada *chamber* dan dielusi dengan n-heksana. Elusi menggunakan pelarut n-heksana bertujuan untuk mencuci pelat dari komponen-komponen pengotor sekaligus membasahi pelat. Elusi dilakukan secara gradien, yakni menggunakan n-heksana : etil aetat dan etil aetat : metanol dalam berbagai perbandingan dengan kenaikan kepolaran 25%. Sampel membentuk pita-pita ke arah tepi pada saat dielusi menggunakan heksana-etil aetat 75%. Pemisahan terjadi optimal pada saat eluen yang digunakan etil aetat 100% dan etil aetat-metanol 25%.

Hasil pemisahan berupa pita-pita berbentuk cincin yang terbentuk pada pelat dimulai dari bagian tengah ke bagian pinggir pelat saat proses elusi terjadi. Banyaknya cincin dan warna cincin yang terbentuk tergantung dari sampel yang dianalisis. Cincin yang terbentuk saat proses elusi sampel Fr11.32 berwarna kuning sesuai dengan profil kromatogram KLT sebelumnya. Terbentuknya cincin diamati dengan lampu UV baik pada 254 nm maupun 366 nm karena

dikhawatirkan ada komponen yang hanya terlihat pada sinar UV. Posisi *chamber* yang miring pada *chromatotron* memungkinkan hasil elusi keluar dengan mudah dan dapat ditampung. Selain itu pemisahan dengan kromatografi radial memberikan persentase perolehan kembali yang tinggi yakni sebesar 90% dibandingkan dengan KLT preparatif yang hanya 80% (Hostettmann, Marston dan Hostettmann, 1998).

Fraksi yang dihasilkan ditampung per 6 ml dengan tujuan agar spot tunggal akan tertampung dan terpisah dari spot yang lain karena berdasarkan kromatogram KLT sebelumnya kedua spot memiliki jarak yang cukup dekat. Jika ditampung terlalu banyak dikhawatirkan saat diidentifikasi dengan KLT akan menunjukkan dua spot kembali. Eluen selanjutnya digunakan metanol saat hasil elusi sudah tidak berwarna dan tidak menunjukkan spot lagi saat diamati pada lampu UV. Hal ini bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa komponen sampel pada pelat yang sudah tidak dapat terelusi dengan eluen yang digunakan. Hasil elusi dengan metanol ditampung dan diidentifikasi dengan KLT. Pengelusian dengan metanol dilakukan hingga hasil elusi sudah tidak berwarna lagi. Eluat ditampung dan diidentifikasi melalui KLT. Didapat 5 fraksi gabungan berdasar kesamaan pola kromatogram (Fr11.32a-Fr11.32e). Identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa Fr11.32a dengan berat 11,3 mg membentuk satu spot berwarna kuning (Gambar 4.5b). Menurut Harborne (2006), reaksi positif berupa warna kuning yang dihasilkan setelah disemprot dengan vanilin-sulfat dan fluoresensi kuning pada UV 254 nm merupakan golongan senyawa flavonoid atau xanton. Sedangkan hasil penapisan fitokimia Fr11.32a terhadap pereaksi $AlCl_3$ memberikan warna biru kehitaman yang mengindikasikan bahwa senyawa kimia merupakan golongan flavonoid. Oleh karena itu, Fr11.32a kemungkinan besar merupakan golongan flavonoid. Flavonoid yang memiliki spot berwarna kuning redup dan apabila dilihat dibawah sinar UV berwarna coklat merupakan flavonoid flavon atau glikosilflavon (Harborne, 1987). Selanjutnya, Fr11.32a diidentifikasi menggunakan LC-MS, IR dan NMR untuk menganalisis struktur kimia isolat murni tersebut.

Senyawa murni Fr11.32a dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dan uji toksisitas menggunakan metode

BSLT. Fr11.32a memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik (Gambar 4.4). Hal ini ditunjukkan dengan IC_{50} senilai 95,83 ppm yang berarti bahwa senyawa kimia tersebut mampu meredam radikal bebas sebesar 50% pada konsentrasi 95,83 ppm. Sedangkan hasil uji toksisitas Fr11.32a dengan nilai LC_{50} 21,23 ppm mengindikasikan bahwa senyawa bersifat sangat toksik (Gambar 4.5.).

Tabel 4.6. Data hasil uji aktivitas antioksidan Fr11.32a

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbans		% Inhibisi	Persamaan Linier	IC_{50} (ppm)
		Blanko	Sampel			
Fr 11.32a	150	1,703	0,395	76,80	$y = 0,415x + 10,23$ $r^2 = 0,967$	95,83
	100		0,895	47,44		
	75		1,034	39,28		
	50		1,212	28,83		
	10		1,387	18,55		

Tabel 4.7. Data hasil uji toksisitas Fr11.32a

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Akumulasi Hidup	Akumulasi Mati	Mortalitas (%)	Persamaan Regresi	LC_{50} (ppm)
Fr11.32a	10	17	9	34,61	$y = 32,872x - 6,3818$ $r^2 = 0,9516$	21,3
	100	6	26	81,25		
	500	2	44	95,65		
	1000	0	64	100,00		

4.7. Identifikasi Struktur Kimia Senyawa Murni

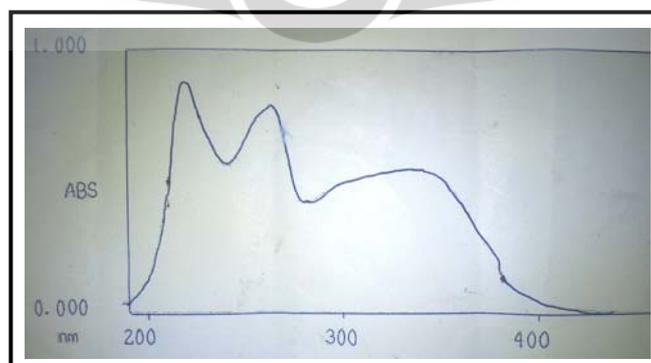
Identifikasi struktur senyawa kimia isolat murni (Fr11.32a) dilakukan melalui analisis data-data spektroskopi, yakni menggunakan spektroskopi ultraviolet dan visibel (UV-Vis), spektroskopi infra merah (IR), kromatografi cair-spektroskopi massa (LCMS) dan resonansi magnetik inti proton dan karbon (1H -NMR dan ^{13}C -NMR).

4.7.1 Analisis data spektrum UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis memberikan informasi adanya gugus kromofor dari senyawa organik dan membedakan senyawa aromatik atau ikatan rangkap yang terkonjugasi dari senyawa alifatik rantai jenuh. Analisis ini dilakukan karena dugaan awal yang berdasarkan hasil penapisan dan pola kromatogram menunjukkan bahwa isolat FR11.32a merupakan senyawa kimia golongan flavonoid. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan yang kuat pada daerah ultraviolet dan tampak (Harborne, 1987). Senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi seperti flavonoid akan mengalami penyerapan radiasi pada panjang gelombang yang lebih besar dari 217 nm (Sastrohamidjojo, 1991).

Hasil pengukuran absorbansi Fr11.32a dalam metanol menunjukkan 3 puncak pada panjang gelombang 220, 262 dan 337 nm (Gambar 4.6.) dengan absorbansi kuat masing-masing sebesar 0,876; 0,794 dan 0,555. Menurut Markham (1988), flavonoid yang memiliki puncak pada panjang gelombang 330-350 nm pada pita I dan 250-280 nm pada pita II merupakan flavonoid golongan flavon. Hal tersebut ditunjukkan oleh Fr11.32a yang memiliki spektrum pada 262 dan 337 nm.

Pita I (337 nm) yang terletak antara 300-550 nm menunjukkan adanya ikatan $\pi \rightarrow \pi^*$ seperti ikatan C=C terkonjugasi. Sedangkan adanya pita II (262 nm) yang terletak antara 210-285 nm maka dapat diperkirakan terdapat ikatan $\pi \rightarrow \pi^*$ seperti C=C terkonjugasi serta $n \rightarrow \pi^*$ berupa kromofor tunggal seperti ikatan C=O (Sastrohamidjojo, 1991).



Gambar 4.6. Spektrum UV-Vis Isolat Fr11.32a

4.7.2 Analisis data spektrum FT-IR (Fourier Transform – Infra Red)

Spektrum inframerah suatu senyawa dapat memberikan gambaran berbagai gugus fungsi yang terdapat dalam sebuah molekul organik (Fessenden dan Fessenden, 1986). Puncak kurva yang dihasilkan diidentifikasi dengan cara membandingkannya dengan pustaka. Gugus-gugus fungsi penting merupakan parameter identifikasi senyawa yang dianalisis (Sastrohamidjojo, 1991). Berdasarkan spektrum FT-IR fraksi 11.32a, terdapat pita-pita serapan pada bilangan panjang gelombang yang bisa dilihat pada Gambar 4.1. Pita-pita serapan tersebut kemudian dibandingkan dengan pustaka.

Pita serapan lebar antara $3400\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi rentangan gugus hidroksil (-OH) yang diakibatkan oleh ikatan hidrogen intermolekul, yang diperkuat juga oleh serapan berintensitas sedang pada bilangan gelombang 1448 cm^{-1} . Pita serapan pada daerah yang sama dan tumpang tindih dengan daerah serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang antara $3420\text{--}3250\text{ cm}^{-1}$ juga dapat menunjukkan adanya gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik benzene atau yang dikenal sebagai gugus fenol (Ar-OH), keberadaan gugus fenol tersebut diperkuat dengan serapan pada daerah bilangan gelombang 721 cm^{-1} .

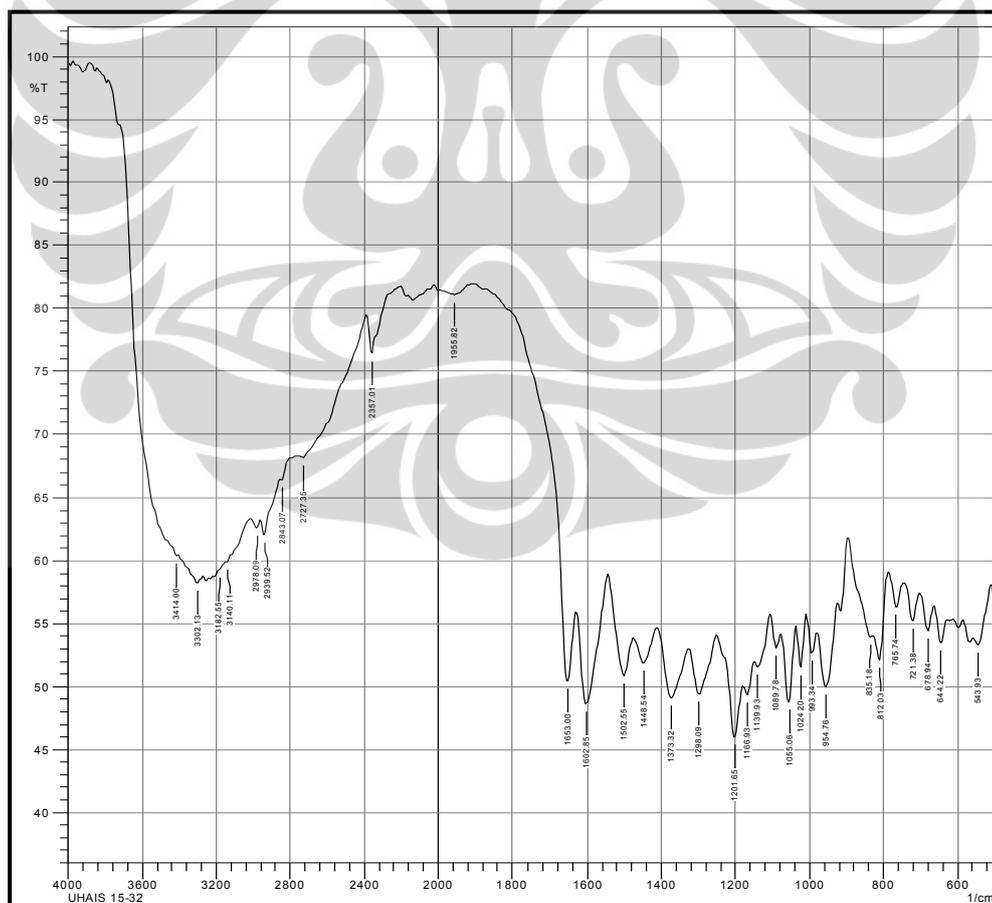
Daerah pada bilangan gelombang $3159\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya senyawa aromatik. Regangan C-H aromatik selalu berada di sebelah kiri daerah 3000 cm^{-1} . Pada gambar 4.1 terdapat pita pada $3140,11\text{ cm}^{-1}$ namun tidak terlihat jelas. Hal ini dikarenakan akibat adanya serapan lebar -OH. Untuk memastikan apakah $3140,11\text{ cm}^{-1}$ merupakan regangan C=C-H, harus diperkuat dengan pita serapan berintensitas kuat pada daerah bilangan gelombang $1600\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ dan pita serapan yang berupa sepasang serapan tajam dan pada bilangan gelombang $900\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan pita-pita informative senyawa aromatik. Kedua hal tersebut terbukti dengan adanya pita serapan tajam pada $1502,55\text{ cm}^{-1}$ & $1448,54\text{ cm}^{-1}$ dan pita serapan berdempetan sepanjang $835,18\text{--}644,22\text{ cm}^{-1}$.

Pita dengan panjang gelombang $2978,09\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya gugus metil (-CH₃) dengan vibrasi regangan asimetris dari ikatan C-H. Hidrogen metilen (-CH₂) mengakibatkan dua serapan rentangan C-H yang dihasilkan dari vibrasi rentangan simetri dan asimetri dari gugus fungsi tersebut, yakni pada $2843,07\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan regangan simetris dan regangan asimetrisnya pada

pada $2939,52 \text{ cm}^{-1}$. Pada literatur disebutkan bahwa gugus metil, metilen dan metin akan memberikan puncak pada kisaran panjang gelombang $1465\text{-}1370 \text{ cm}^{-1}$. Spektrum IR fraksi 11.32a memperlihatkan pita serapan dari $1448,54$ hingga $1373,32 \text{ cm}^{-1}$ yang berarti terdapat gugus metil, metilen dan metin dalam senyawa (Sastrohamidjojo, 1991).

Pita absorbansi sedang pada $1653,0 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya karbonil ($\text{C}=\text{O}$) pada ester β -keton. Absorbansi sangat kuat yang terletak pada bilangan gelombang $1280\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya C-O-C ester. Hal ini terjadi pada $1201,65 \text{ cm}^{-1}$ yang berarti bahwa Fr11.32a memiliki gugus C-O-C ester.

Berdasarkan analisis spektrum FT-IR di atas, isolat Fr11.32a memiliki gugus $-\text{OH}$, Ar-OH , $\text{C}=\text{O}$ dan C-O-C. Gugus-gugus fungsi tersebut merupakan gugus fungsi yang terdapat pada struktur umum flavonoid. Hal tersebut mendukung dugaan bahwa isolat Fr11.32a merupakan senyawa golongan flavonoid.



Gambar 4.6. Spektrum Infra Merah Fr11.32a

4.7.3 Analisis data spektrum NMR

Berdasarkan data hasil pengukuran $^1\text{H-NMR}$ dapat diketahui bahwa isolat 11.32a mempunyai 9 buah puncak proton dan 19 puncak karbon dengan data pergeseran kimia (δ) proton (ppm) adalah 0,94 (t, 3H); 3,32 (dd, 1H); 3,74 (dd, 1H); 3,87 (s, 3H); 4,23 (dd, 1H); 5,30 (d, 1H, $J=1.95$ Hz), 6,20 (d, 1H, $J=2.6$ Hz), 6,36 (d, 1H, $J=1.95$ Hz) dan 6,88 (s, 2H). Sedangkan δ karbon (ppm) 17,8; 61,0; 73,3; 72,1; 71,9; 94,9; 100,0; 103,8; 106,0; 109,8; 127,1; 136,8; 139,4; 152,0; 158,7; 159,1; 163,4; 166,3 dan 179,7.

Berdasarkan data-data nilai pergeseran kimia dari $^1\text{H-NMR}$ di atas dapat diketahui bahwa puncak pada δ 0,94 ppm merupakan gugus metil ($-\text{CH}_3$) hal ini didukung dengan letak dari puncak tersebut yang berada pada kisaran daerah pergeseran kimia untuk gugus metil dan didukung dengan nilai integrasi 3H yang menunjukkan jumlah atom proton yang dimiliki oleh gugus metil. Puncak pada δ 3,32; 3,74; 4,23 merupakan puncak-puncak dari gugus metin ($-\text{CH}-$) yang bergeser menjadi lebih *downfield/deshielded* dengan nilai integrasi masing-masing 1H, hal ini menunjukkan bahwa ketiga gugus metin ($-\text{CH}$) tersebut berdekatan letaknya dengan atom elektronegatif dan umumnya atom elektronegatif tersebut adalah atom oksigen (O), puncak pada δ 3,87 ppm dengan multiplisitas puncak tunggal (*singlet*), tajam dengan nilai integrasi 3H menunjukkan puncak khas untuk gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$), puncak pada δ 5,30 ppm yang terletak pada kisaran daerah pergeseran kimia khas untuk rantai karbon ikatan rangkap dan dengan nilai integrasi 1H, menunjukkan bahwa puncak tersebut merupakan puncak gugus metin ($-\text{CH}=\text{}$), puncak-puncak pada δ 6,20; 6,36 dan 6,88 ppm merupakan puncak-puncak khas dari H aromatik yang terletak pada kisaran daerah 6,5 – 8 ppm.

Berdasarkan data-data nilai pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$ dapat diketahui bahwa isolat Fr11.32a mempunyai 1 buah atom C metil pada δ 17,8 ppm, 2 buah atom C metin alifatik downfield yang khas menunjukkan daerah pergeseran kimia C yang mengikat O (C-O) pada δ 71,9; 72,1 dan 73,3 ppm, 1 buah gugus C metoksi ($-\text{OCH}_3$) pada δ 61,0 ppm, 13 buah puncak atom C ikatan rangkap ($-\text{C}=\text{C}-$) pada δ 94,9; 100,0; 103,8; 106,0; 109,8; 127,1; 136,8; 139,4; 152,0; 158,7; 159,1; 163,4 dan 166,3 ppm, dari puncak-puncak tersebut dapat diketahui bahwa

puncak pada δ 72,1; 109,8 dan 152,0 ppm masing-masing mewakili 2 buah atom karbon yang simetris, hal ini ditunjukkan dengan intensitas puncaknya yang hampir 2 kali lebih tinggi, 1 buah atom C karbonil ($-C=O$) khas untuk gugus asam ($R-COO-R$) pada δ 179,7 ppm.

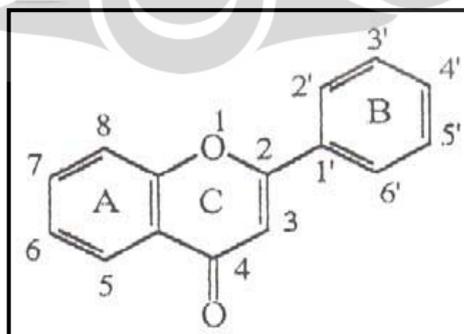
Dari uraian di atas dapat diketahui bahwa isolat 11.32a merupakan suatu senyawa yang memiliki gugus $-C=C-$ aromatik, $-C=C-$ alkena, metoksi ($-OCH_3$), metil ($-CH_3$), gugus $-C-O-$ dan gugus karbonil asam ($-RCOOR$).

4.7.4 Analisis data spektrum LC-MS

Identifikasi senyawa kimia dalam fraksi 11.32a pertama-tama dilakukan menggunakan LC-MS atau kromatografi cair–spektrofotometri massa. Pemisahan menggunakan kromatografi cair menunjukkan satu puncak kromatogram (Lampiran 9) dengan waktu retensi 1,8 menit (T 1,8). Puncak tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan spektrometri massa untuk mengetahui bobot molekul dari senyawa yang terkandung dalam Fr11.32a

Spektrum hasil MS Fr11.32a menunjukkan sebuah korelasi antara (m/z) 478,55; dan 977,29. Dari fragmentasi tersebut dapat diartikan bahwa (M^+) sebesar 478,55 mewakili berat molekul senyawa. Sedangkan (m/z) 977,29 merupakan ($2M^+ + Na$). Adanya penambahan berat molekul Natrium dikarenakan sistem eluen yang mengandung Na.

Berdasarkan hasil analisis penapisan fitokimia dan pola kromatogram serta analisis struktur kimia menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, IR, NMR dan LC-MS maka diduga isolat Fr11.32a merupakan senyawa flavonoid (Gambar 4.7) golongan flavon.



[Sumber : Markham, 1988]

Gambar 4.7. Struktur Dasar Flavonoid

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

- a. Aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan efek sitotoksik (LC_{50}) ekstrak metanol kasar, fraksi n-heksana, etil asetat, butanol, dan metanol dari daun Jambo-Jambo [*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merr.] berturut-turut adalah sebesar 12,59 dan 243,5 $\mu\text{g/mL}$; 78,14 dan 214,5 $\mu\text{g/mL}$; 26,52 dan 50,84 $\mu\text{g/mL}$; 8,34 dan 228,00 $\mu\text{g/mL}$; serta 10,56 dan 168,70 $\mu\text{g/mL}$.
- b. Aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh fraksi butanol dengan IC_{50} 8,34 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan toksisitas tertinggi ditunjukkan oleh fraksi etil asetat dengan LC_{50} 50.84 $\mu\text{g/mL}$.
- c. Senyawa kimia aktif yang diisolasi dari fraksi etil asetat diperkirakan merupakan golongan flavonoid (flavon) dengan berat molekul sebesar 478 yang berdasarkan hasil analisis ^{12}C -NMR memiliki atom C sejumlah 22 yang berupa ikatan $-\text{C}=\text{C}-$ aromatik, $-\text{C}=\text{C}-$ alkena, metil ($-\text{CH}_3$), metoksi ($-\text{OCH}_3$), $-\text{C}-\text{O}-$ dan ikatan karbonil asam ($-\text{RCOOR}$) dan berdasarkan analisis FT-IR memiliki gugus hidroksil $-\text{OH}$, fenol $\text{Ar}-\text{OH}$, karbonil $\text{C}=\text{O}$ dan $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ester.

5.2 Saran

- a. Diperlukan analisis data hasil NMR lebih lanjut (HMBC, HMQC dan COSY) untuk memastikan struktur kimia senyawa murni.
- b. Diperlukan pemisahan lebih lanjut beberapa fraksi yang memiliki potensi keaktifan terhadap aktivitas antioksidan dan toksisitas.

DAFTAR ACUAN

- Arts, M.J.T.J., Haenen, G.R.M.M., Voss, H.P. dan Bast, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 45–49.
- Bintang, Maria. (2010). *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga, 141-148.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bozin, B., Mimica, D.N., Samojilik, I., Goran, A. dan Igcic, R. (2008). Phenolics as antioxidant in garlic. *Food Chemistry*, 111, 925-929.
- Carballo, J.L., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P. dan Garcia-Gravaloz, M.D. (2002) Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 1472-6570.
- Cazes, J. (2010). *Encyclopedia of Chromatography*. London: CRC Press, 71-75.
- Chanda, S. dan Dave, R. (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research Vol 3*(13), 981-996.
- Citrosupomo, Gembong. (1994). *Taksonomi, Tumbuhan Obat-Obatan*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press, 221.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 308, 322-324, 328, 333-337.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1-33.
- Farnsworth, N.R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science*, 55(3), 226-276.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. (1986). *Kimia Organik Edisi ke-3*. Diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana Pudjaatmaka Ph.D. Jakarta : Penerbit Erlangga, 315-316, 327, 354-355.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar, 353-359.
- Gritter, J.R., Bobbit, J.M. dan Schwarting, A.E. (1991). *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Bandung : ITB, 107-109, 140-147, 160-163.

- Halliwell, B. dan Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radical in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, 23-31, 105-115.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* Edisi ke-2. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung : Penerbit ITB, 47-69, 85-88, 102-109, 123, 245.
- Hardjono. (1991). *Kromatografi*. Yogyakarta : Liberty, 57.
- Harmita dan Radji, M. (2008). *Analisis Hayati*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran, 77.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T. dan Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root : their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1090-2097.
- Hendayana, S., Kadarohman, A., Sumarna, A.A. dan Supriatna, A. (1994). *Kimia Analitik Instrumen*. Semarang : IKIP Semarang Press, 155-156, 189-191.
- Hermanto S. 2009. *Mengenal Lebih Jauh Teknik Analisis Kromatografi dan Spektroskopi*. Jakarta : UIN Jakarta, 98.
- Hostettmann, K., Marston A. dan Hostettmann, M. (1998). *Preparative Chromatography Techniques*. Berlin: Springer, 9-11.
- Joon-Kwan Moon dan Takayuki Shibamoto. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chemistry*, 57, 1655–1666.
- Kendari Pos. (2011). Eksotisme Pegunungan Mekongga : Peneliti Dalam dan Luar Negeri Tertantang untuk Menjajal Keunikannya. Kendari : Graha Pena. Edisi 31 Juli 2011.
- Kazakevich Y dan Lobrutto R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey : John Wiley & Sons, 282.
- Lenny, S. (2006). *Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shrimp Lethality*. USU Repository. <http://www.usu.ac.id/penelitian/maserasi>. diakses tanggal 26 Mei 2012.
- Lindsay, S. (1992). *High Performance Liquid Chromatography* second edition. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore : John Wiley & Sons, 157.
- LIPI - Kebun Raya Bogor Plant List.
<http://www.nbinindonesia.org/krb/krbview.asp/ID=13367>. Diunduh tanggal 4 februari pukul 15.00 WIB
- Lopez-Alarcon, C. dan E. Lissi. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. *Free Rad Res*, 40 (9), 979-985.

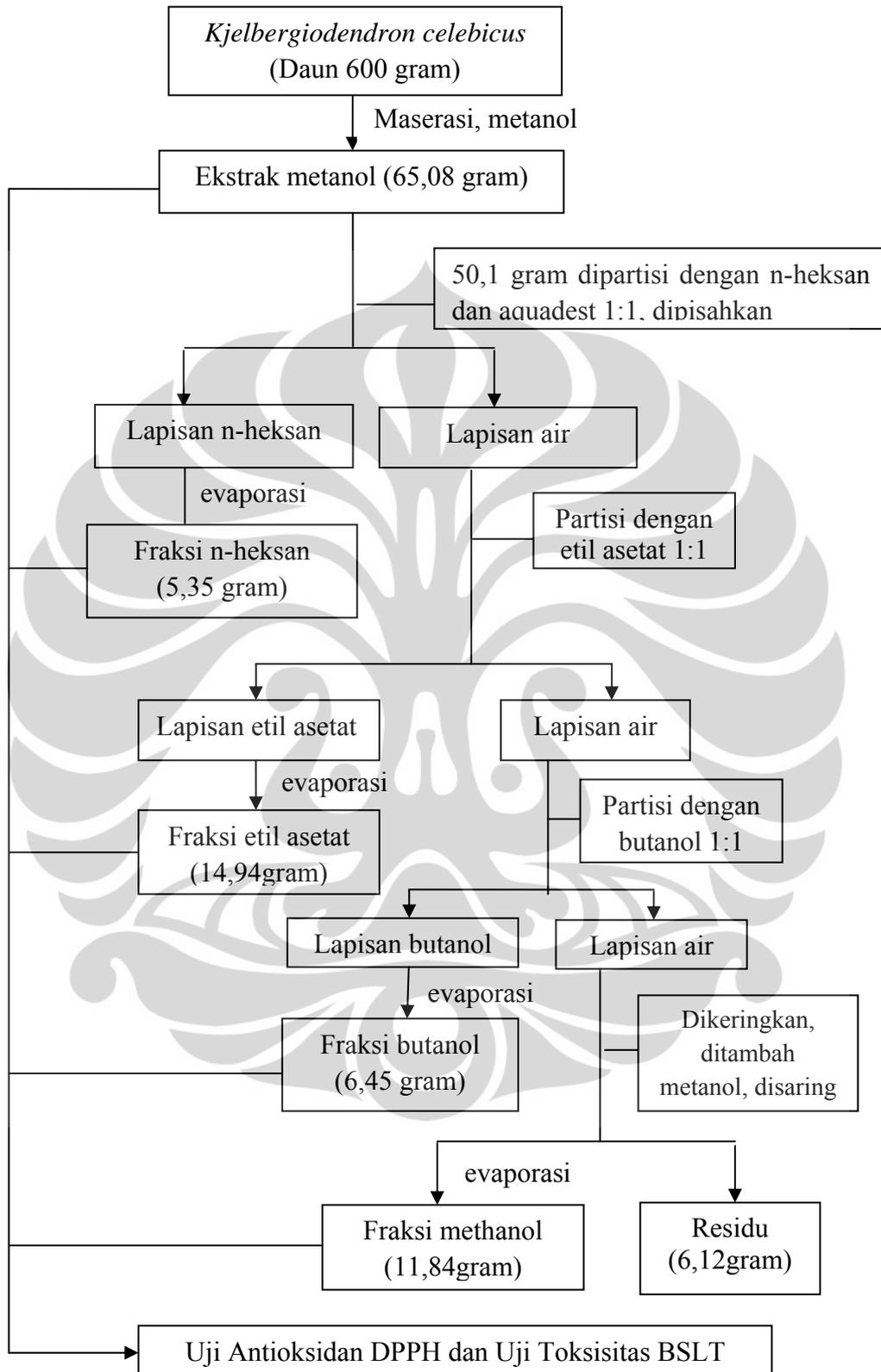
- Markham, K.R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung : Penerbit ITB, 15-35; 43-55; 85-89.
- Mena, S., Ortega, A. dan Estrela, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutation Research*, 674, 36–44.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen L.B., Nichols, D.E. dan McLaughlin J.L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31-4.
- Moore, J. dan Yu, L. (2007). Methods for antioxidant capacity estimation of wheat-based food products. Liangli Yu (Ed.). *Wheat Antioxidants*. USA : John Wiley & Sons., 22-24.
- Nguyen, H. dan Widodo, S. (1999). *Momordica L. In: Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia 12*. De Padua L. S. N. Bunyapraphatsana and R.H. M. J. Lemmens (eds.). Pudoc Scientific Publisher, Netherland : Wageningen, 353-359.
- Pokorni. (2001). *Antioxidant in Food : practical applications*. New York : CRC Press, 5-33.
- Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bali. (2006) *Koleksi Pohon Sulawesi*. Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya “Eka Karya” Bali – LIPI, 36-47.
- Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI. (2002). *Flora Sulawesi: Unik, endemik dan langka*. Bogor: Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, 17.
- Pusat Penelitian Biologi-LIPI. (2011). *Status Keanekaragaman Hayati Indonesia*. Bogor: LIPI Press, 7.
- Rita W.S., Suirta I.W. dan Sabikin A. (2008). Isolasi&Identifikasi Senyawa Yang Berpotensi aebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica charantia L.*). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. *Jurnal Kimia Vol.2*, ISSN 1907-9850.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Padmawinata K. Bandung : Penerbit ITB, 191.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Fernandes, F.A.N. dan Brito, E.S. (2010). Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, 44, 2072–2075.
- Sastrohamidjojo, H. (1991). *Spektroskopi*. Yogyakarta : Liberty, 34-35.
- Satmoko, W. (2002). Efek Toksik dan Cara Menentukan Toksisitas Bahan Kimia. *Cermin Dunia Kedokteran*, 135, 32-37.
- Shellard, E. J. (1975). *Quantitative Paper and Thin Layer Chromatography*. New York : Academic Press, 157-158.

- Shivaprasad, H.N., Mohan, S., Kharya, M.D., Shiradkar, M.R. dan Lakshman, K. (2005). In-Vitro Models For Antioxidant Activity Evaluation: A Review. *Pharmaceutical Reviews*, 3 (4). 2005.
- Soetamaji, D.W. (1998). Peran stress oksidatif dalam patogenesis angiopati mikro dan makro DM. *Medica*, 5 (24), 318-325.
- Stahl, E. (1985). *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Bandung : Penerbit ITB.
- Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P. dan Gargova, S. (2006). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102, 764-770.
- Sudjadi. (1985). *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Jakarta : Ghalia Indonesia, 128.
- Townshend, A. (1995). *Encyclopedia of Analytical Science*, Vol. 2. London : Academic Press Lnc, 714-728.
- Ukra, Mark. (2008). *The Ultimate Tea Diet*. New York: Harper Collins ebooks, 47.
- Winarsi, Hery. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta : Kanisius, 15-17.
- Wu C. (1995). *Handbook of Size Exclusion Chromatography*. New Jersey : Marcel Dekker, 5.
- Yen, G.C. dan H.Y. Chen. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food. Chemistry*, 27-32.

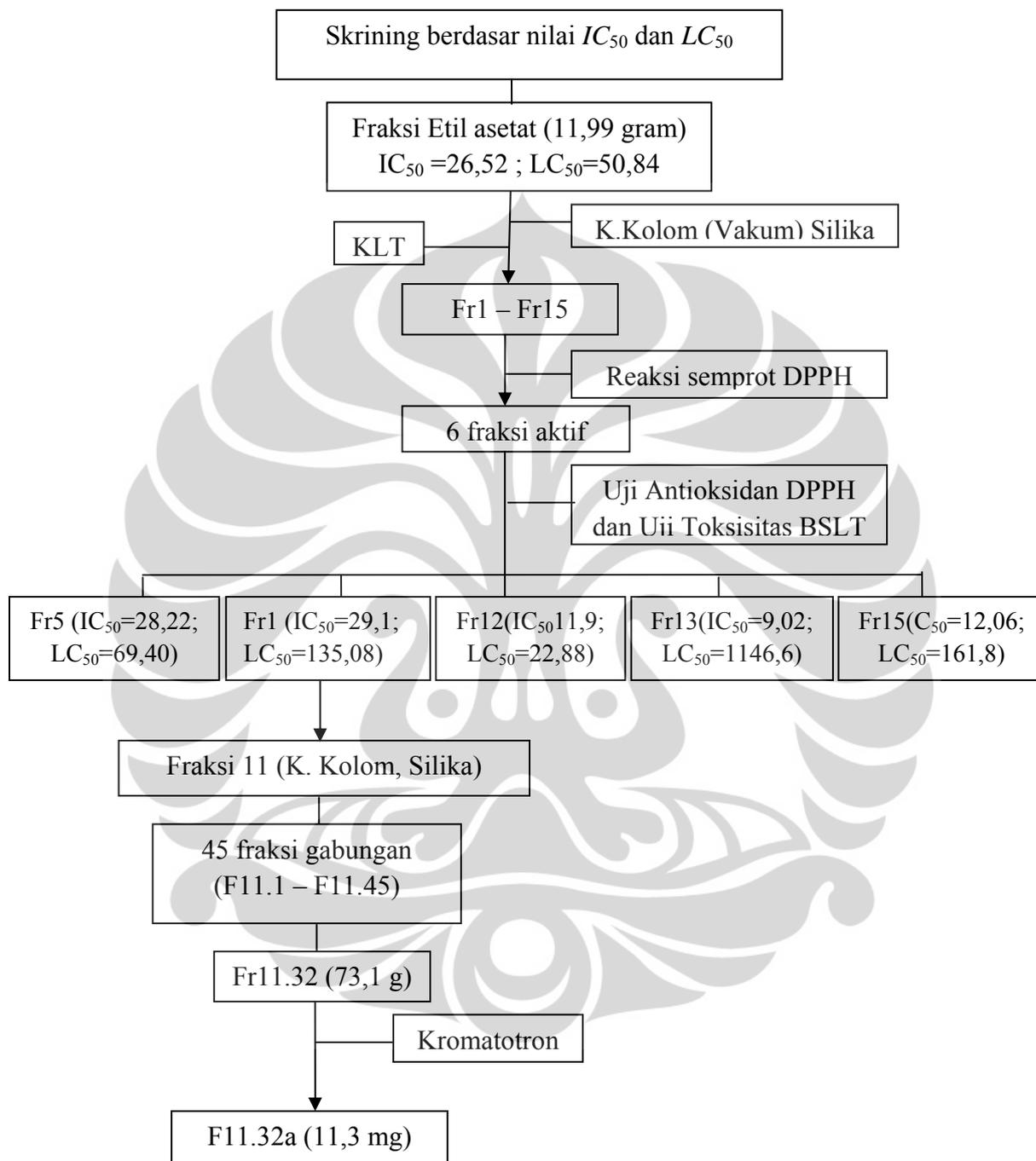


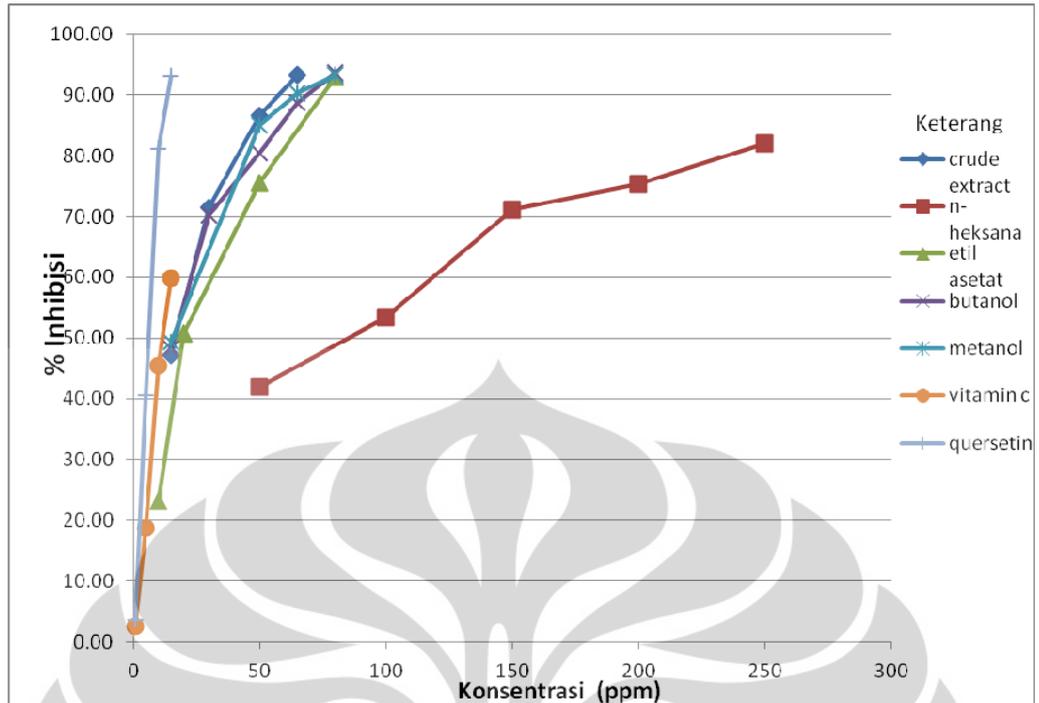
GAMBAR

Gambar 3.1. Skema Kerja Ekstraksi dan Partisi

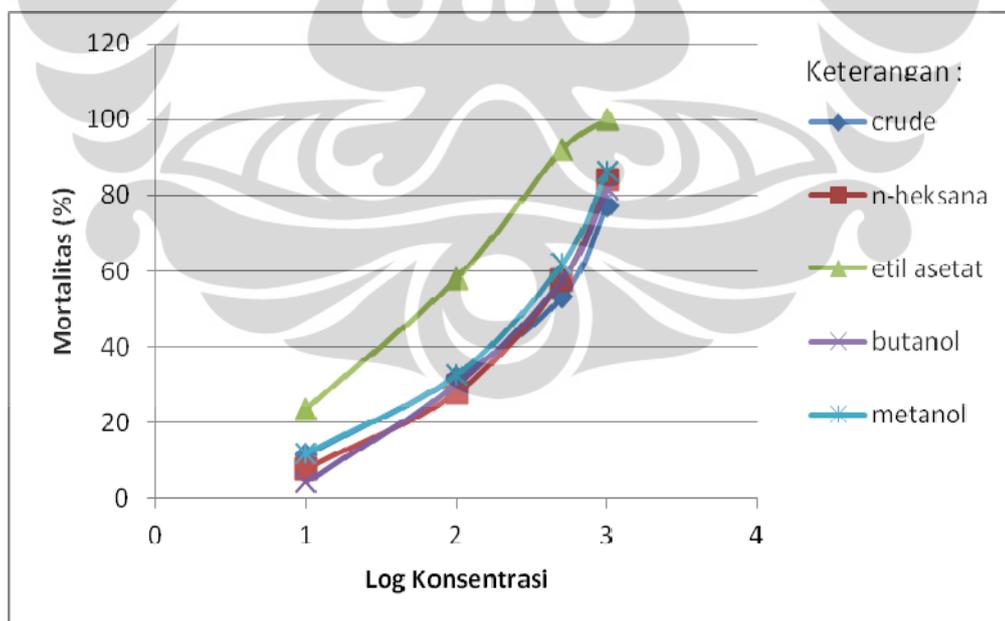


Gambar 3.2. Skema Kerja Fraksinasi dan Isolasi Senyawa Aktif

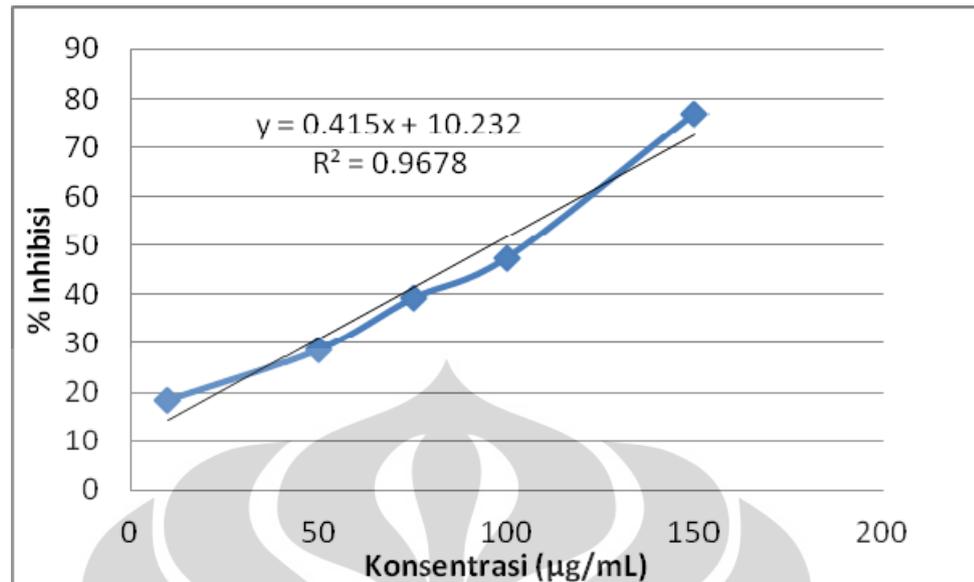




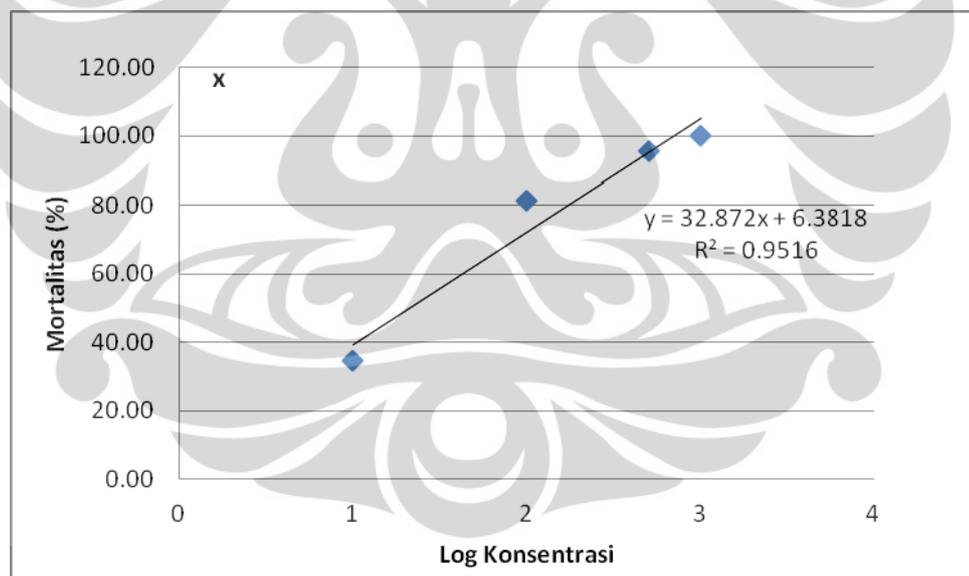
Gambar 4.1. Kurva konsentrasi dan % inhibisi fraksi-fraksi hasil partisi ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* pada uji antioksidan



Gambar 4.2. Kurva log konsentrasi dan % mortalitas Fr11.32a fraksi-fraksi hasil partisi ekstrak daun *Kjelbergiodendron celebicus* pada uji toksisitas



Gambar 4.3. Kurva konsentrasi dan % inhibisi Fr11.32a pada uji antioksidan terhadap radikal bebas DPPH



Gambar 4.4. Kurva log konsentrasi dan % mortalitas Fr11.32a pada uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach



Tabel 4.5. Hasil uji aktivitas antioksidan dan uji toksisitas fraksi-fraksi hasil Kromatografi Kolom Cepat

Fraksi	Berat (mg)	IC_{50} (ppm)	LC_{50} (ppm)
1	1,3	-	-
2	304,4	-	287.30
3	304,1	-	112.17
4	465,5	-	188.75
5	1973,1	28,22	69.41
6	a.169,1; b.50,7	-	182.17
7	a.50,8; b.150,3	-	68.87
8	a.57,7; b.141,8	-	190.88
9	a.85,0; b.154,9	-	-
10	a.37,5; b.99,98	-	-
11	1573,1	29,13	135.08
12	6211,5	11,93	22.88
13	43,17	19,02	1146.58
14	5,7	-	-
15	468,6	12,06	161.83



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi daun *Kjelbergiodendron celebicus*(Koord) Merr.



LIPI

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, 14 Juni 2012

Nomor : 990/IPH.1.02/If.8/VI/2012
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Nurlisa Dwi Novianti
NPM : 0806327950
Mhs. FMIPA - UI

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	UHA 15	<i>Kjelbergiodendron celebicus</i> (Koord.) Merr.	Myrtaceae

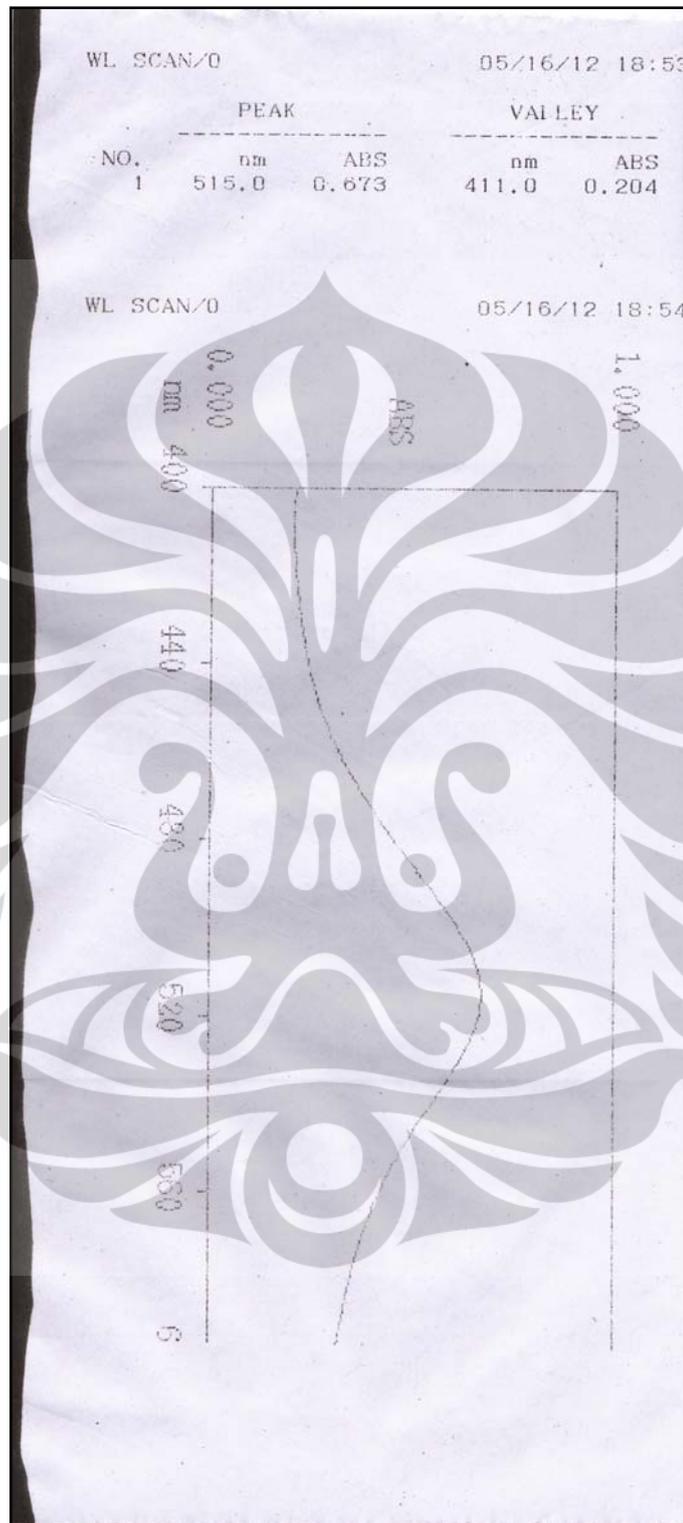
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.



Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
Dr. Joeni Setijoe Rahajoe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2012\Nurlisa Dwi Novianti.doc\EAW-EAW Page 1 of 1

Lampiran 2. Kurva Optimasi Panjang Gelombang DPPH



Lampiran 3. Spektrum LC-MS dari Fr11.32a

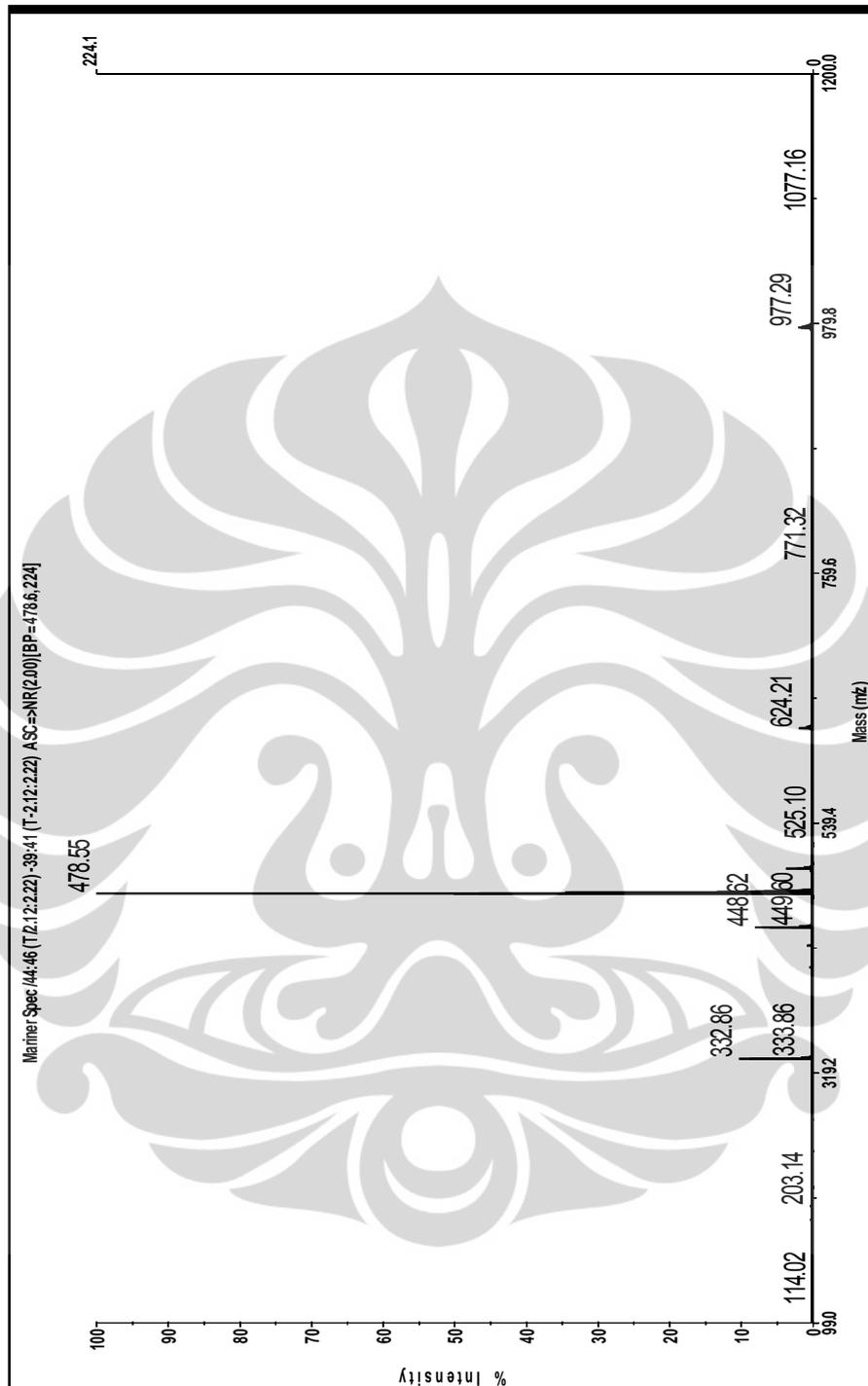
3.1. Kromatogram

LC MS –ESI pos ion

UHA 15 32 : Vol injection 20 ul; Flow 1 ml/min; Eluent Methanol+Water = 90+10

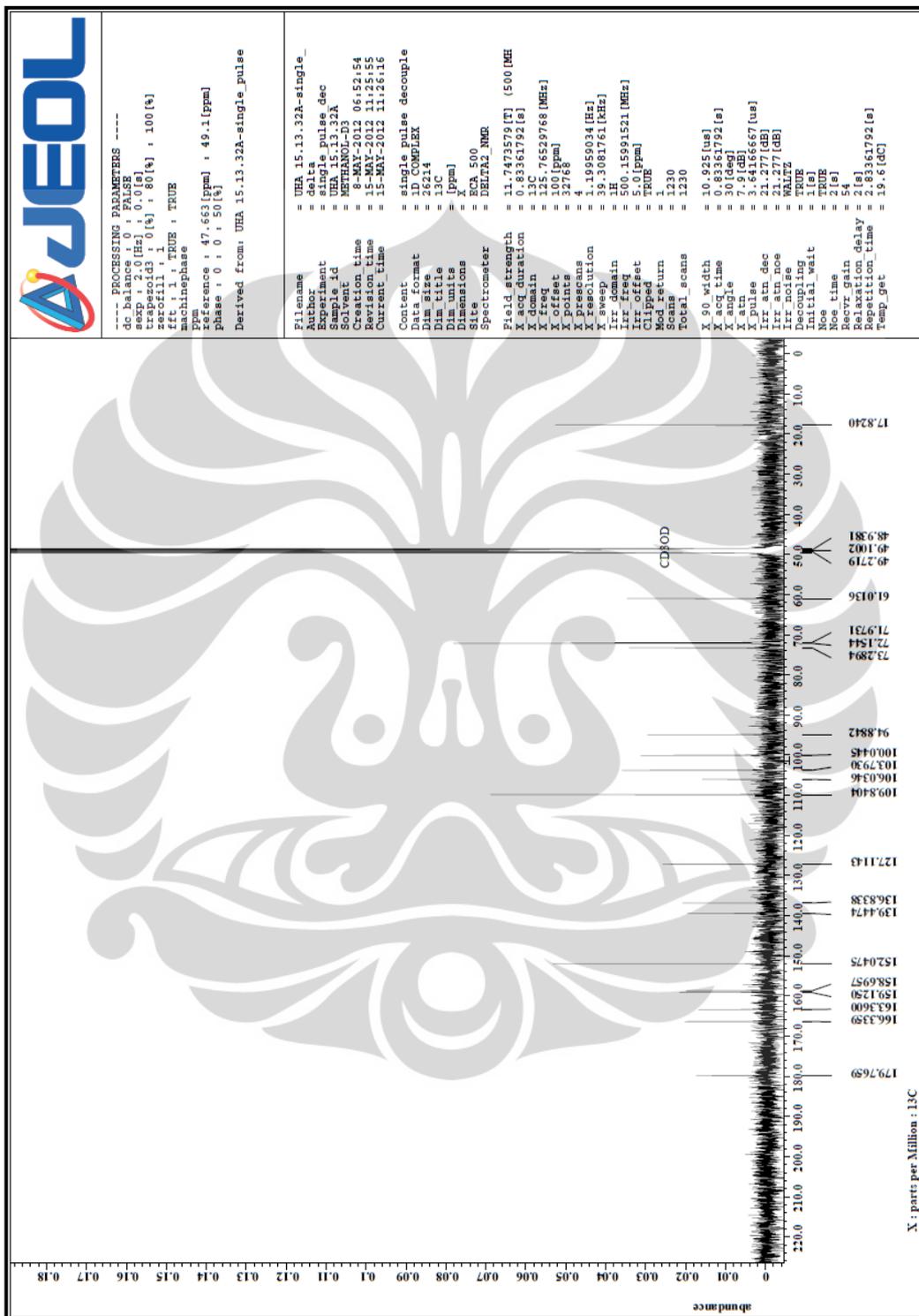


3.2. Spektrum massa

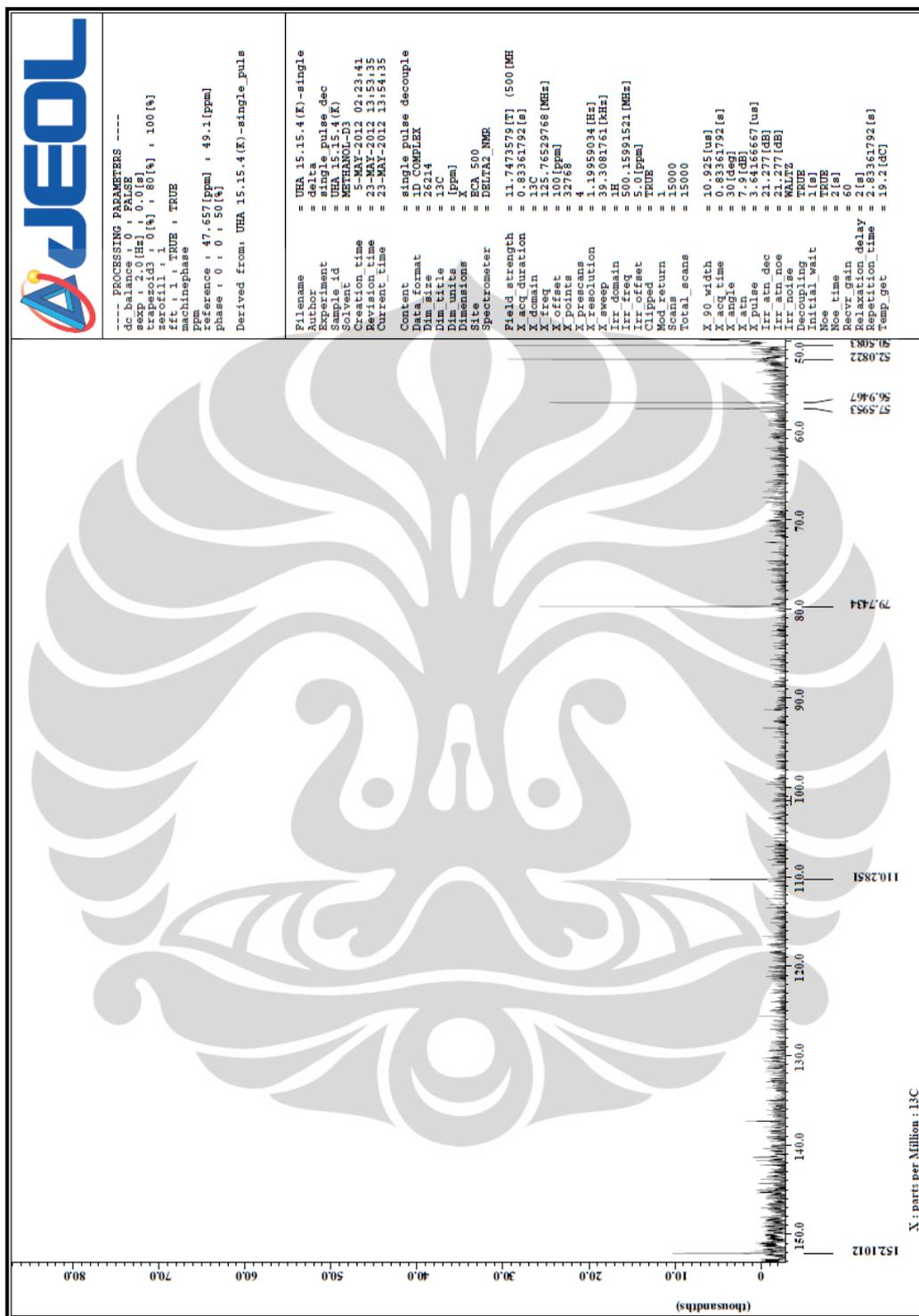


Lampiran 4. Spektrum ^{13}C NMR dari Fr11.32a

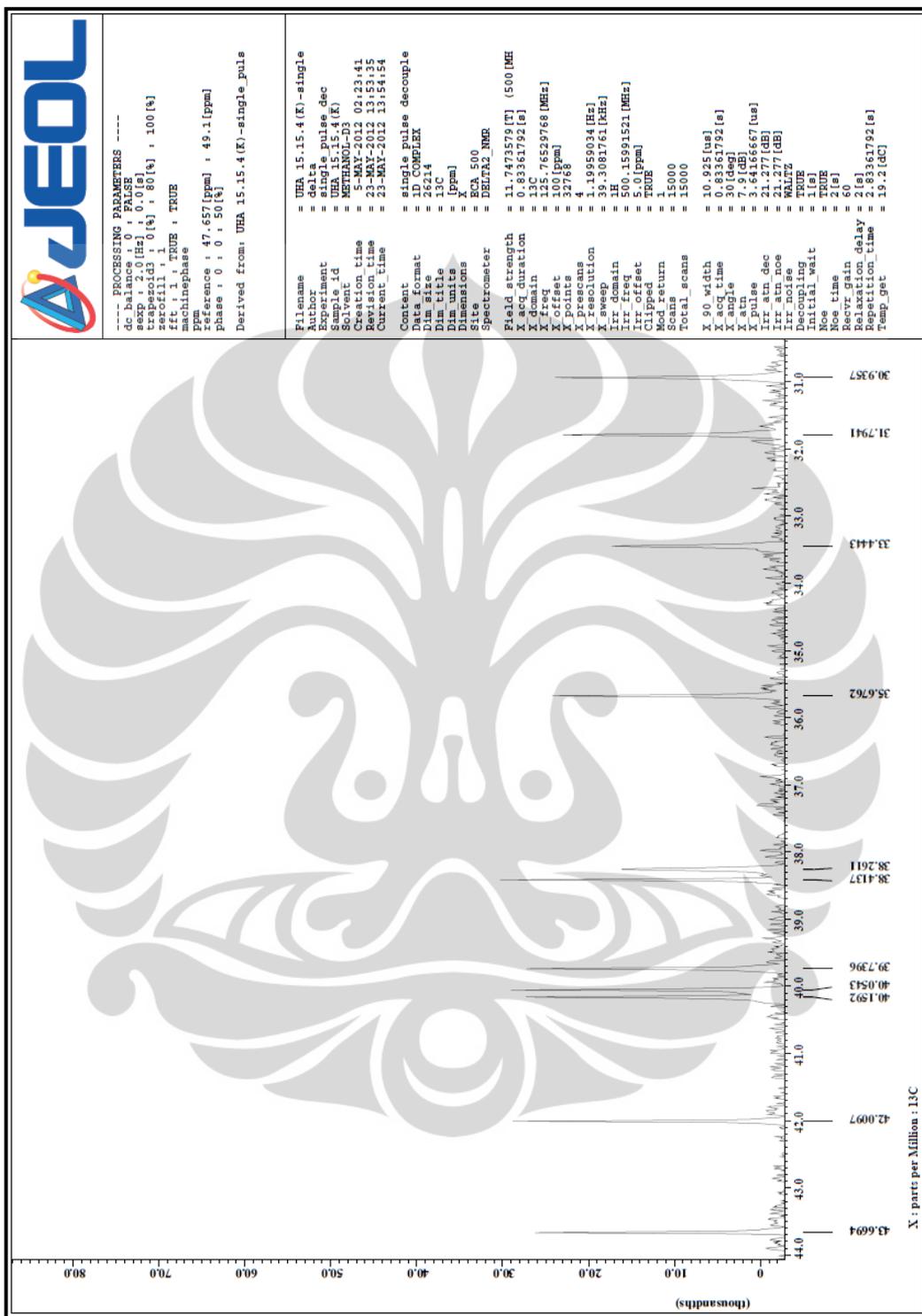
4.1. Spektrum pada konsentrasi 0 – 220 ppm



4.2. Spektrum pada konsentrasi 50 – 150 ppm

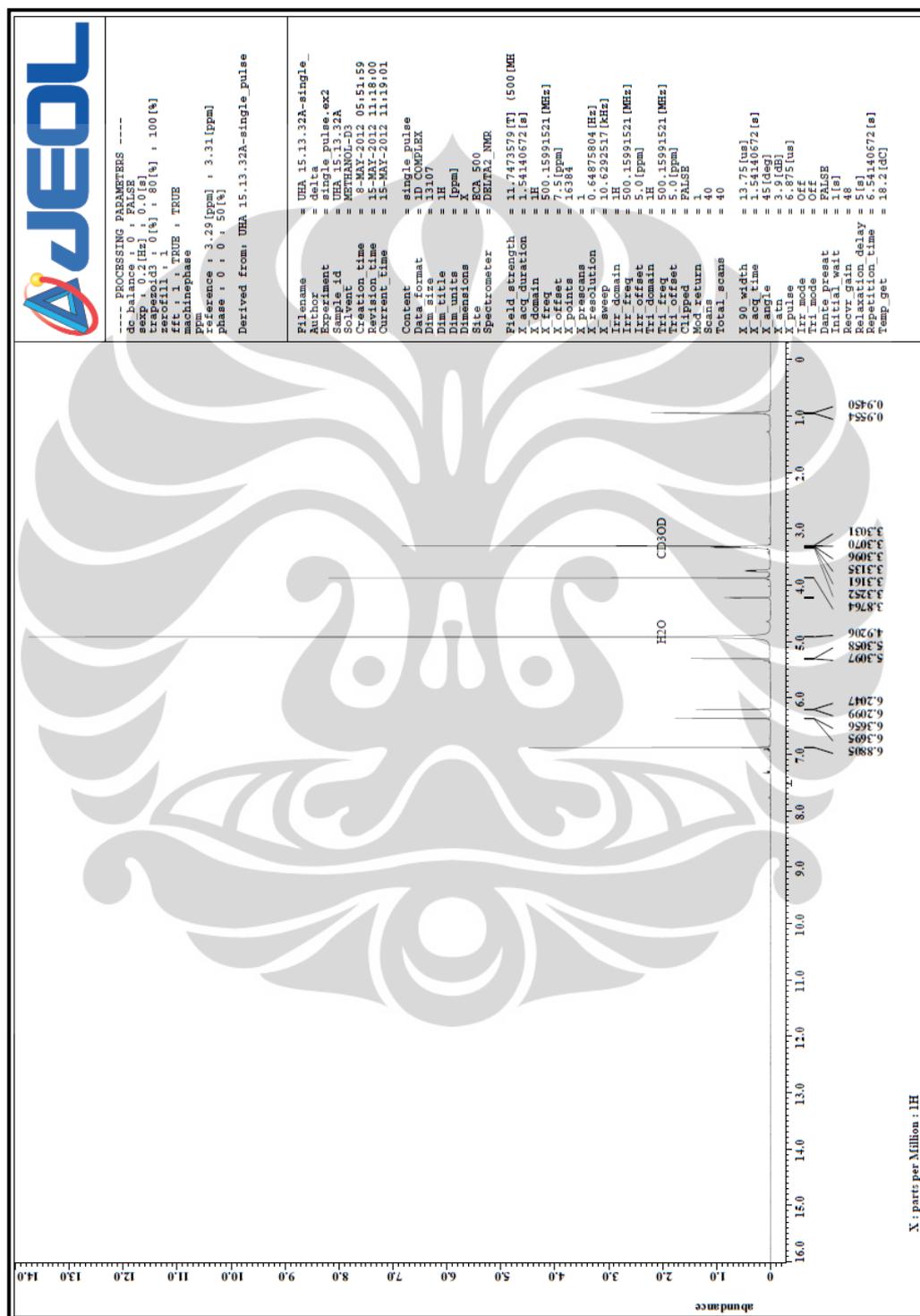


4.3. Spektrum pada konsentrasi 31-44 ppm

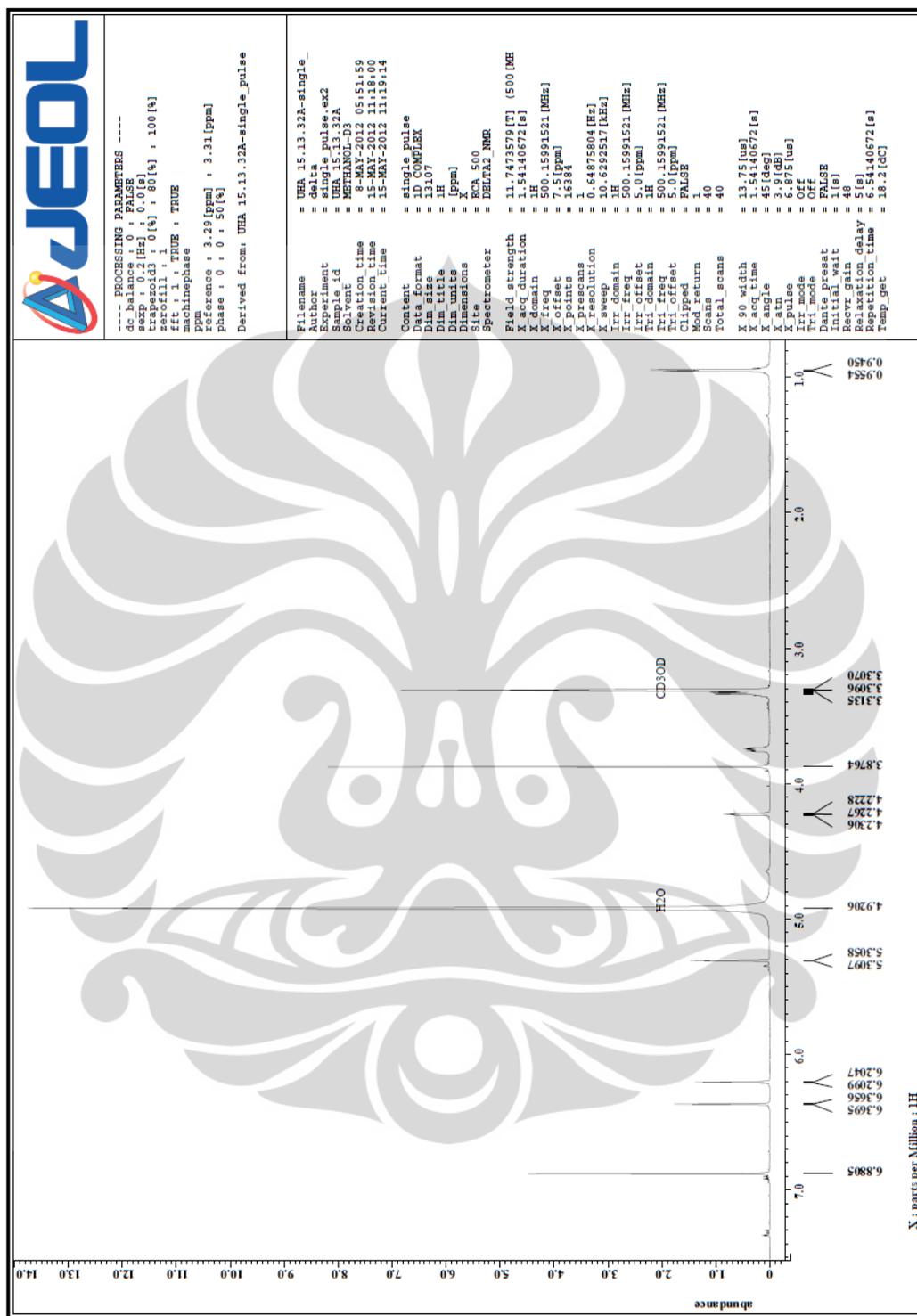


Lampiran 5. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari Fr11.32a

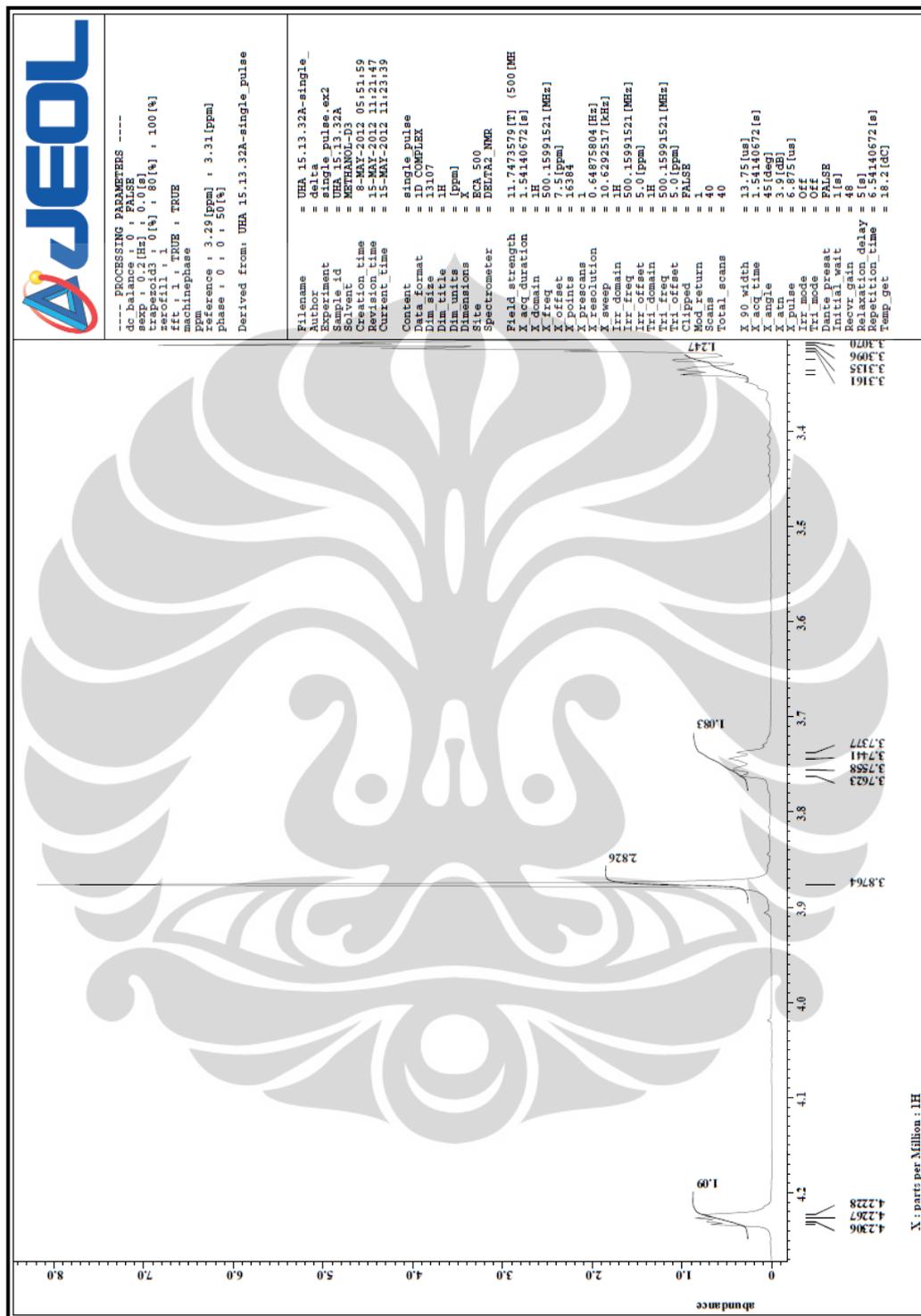
5.1. Spektrum pada konsentrasi 0.0 -16.0 ppm



5.2. Spektrum pada konsentrasi 1.0 -7.0 ppm



5.3. Spektrum pada konsentrasi 3.3 – 4.2 ppm



5.4. Spektrum pada konsentrasi 5.2 – 6.9 ppm

