

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BAYUR ELANG
(*Pterospermum diversifolium*) DENGAN METODE DPPH (1,1-diphenyl-2-
picrylhydrazyl) DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI AKTIF**



SKRIPSI

**Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Strata 1 Pada Program Studi Pendidikan Kimia
Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Bengkulu**

Oleh:

TRI UTAMI PUTRI

A1F010025

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN KIMIA
JURUSAN PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS BENGKULU**

2014

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BAYUR ELANG
(*Pterospermum diversifolium*) DENGAN METODE DPPH (1,1-diphenyl-2-
picrylhydrazyl) DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

OLEH:

TRI UTAMI PUTRI

A1F010025

Disahkan Oleh:

FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN

Dekan FKIP,

Ketua Jurusan PMIPA,

Prof. Dr. Rambat Nur Sasongko, M. Pd

Dra. Diah Arvulina, M.A., Ph.D

NIP 19611207 198601 1 001

NIP 19620718 198702 2 001

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BAYUR ELANG
(*Pterospermum diversifolium*) DENGAN METODE DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI AKTIF**

SKRIPSI

OLEH:

TRI UTAMI PUTRI

A1F010025

**Telah dipertahankan di depan Tim Penguji Program Studi Pendidikan
Kimia Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan**

Hari, Tanggal : Rabu, 5 Maret 2014

Pukul : 10.00-12.00 WIB

**Tempat : Ruang Dosen Program Studi Pendidikan
Kimia Dekanat FKIP Universitas Bengkulu**

Skrripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh Dosen Pembimbing:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



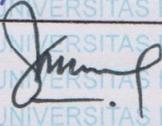
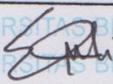
Dr. Agus Sundaryono, M. Si

Dr. M. Lutfi Firdaus, M. T

NIP. 19600806 198703 1 005

NIP. 19731022 200003 1 001

Skrripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh Tim Penguji:

Penguji	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penguji I	Dr. Agus Sundaryono, M. Si NIP. 19600806 198703 1 005		17/3/14
Penguji II	Dr. M. Lutfi Firdaus, M. T NIP. 19731022 200003 1 001		17/3/14
Penguji III	Drs. Amrul Bahar, M. Pd NIP. 19541023 198403 1 002		17/3/14
Penguji IV	Elvinawati, M. Si NIP. 19781010 200312 2 001		17/3/14

MOTTO DAN PERSEMBAHAN

Motto:

- Berjalan sampai ke batas, berlajar sampai ke pulau. Never half hearted, full tilt on everything you do!
- If you want something you've never had, you must be willing to do something you've never done. Success is a journey, not a destination.
- Selalu ada Allah yang menemani. Yakinkan!

Persembahan:

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillahirobbilalamin kupersembahkan skripsi ini untuk:

- ♥ *Ayahanda (Drs. M. Ilyas Remiasip) dan Ibunda (Karlina Tausi) yang selalu memberikan doa, motivasi, semangat, bimbingan, dan segala yang terbaik kepada ananda. Yi janji akan selalu berusaha memberikan yang terbaik untuk Ayah dan Mak tersayang :**
- ♥ *Dang Bily dan Nga Ica yang selalu siap sedia memberikan waktu, semangat, dorongan dan menjadikan adik kecilmu ini selalu berambisi untuk menjadi lebih baik dari kalian, hehe.. I do love you brothers!*
- ♥ *Bapak Ibu Guru TK Pertiwi II, SDN 5, SMPN 2, SMAN 2 Bengkulu Selatan dan Bapak Ibu Dosen Pendidikan Kimia UNIB yang telah memberikan ilmu dan kasih sayang selama ini. Semoga Bapak Ibu selalu sehat dan bahagia. You inspired me, really!*
- ♥ *Rekan-rekan penelitian KOBA: Fanny, Hanny, Mbak Ois, Mbak Winda & Theo. I miss the moments, hoho*
- ♥ *Member Keluarga Chemistry Sepuluh (Kechepul). Kalian tak hanya teman, tapi sudah menjadi keluarga bagiku. Mari kita berikan yang terbaik. Sukses untuk kita semua!*
- ♥ *BESWAN DJARUM 28 INDONESIA, Pak Prim, Mas Sapto, Mas Wenny, Mas Edy, Nidya, Juju, Fauzi, Yoyo. Terimakasih telah memberi kesempatan dan pengalaman berharga yang tak mungkin terlupakan selama 1 tahun kemarin. Being a part of you is my pride! Salam Bersatu Seikat!*

- ♥ *Semua laboran yang telah membantu penyelesaian skripsi ini: Mbak Ria, Uni Devi, Mbak Susi, Kak Can, Mas Yono, Bu Sum, Pak Suroto, dan tak lupa mbak Mona yang telah membantu mengurusinya ☺*
- ♥ *Sepupu-sepupuku Susan, Dwi, Wenny, Erly, Pika, Yoya, Yeyen, Azi, dll. Kalian harus lebih baik dari wa mu ini!*
- ♥ *My besties Delpi (Apek). Meski jalan yang kita lalui kini telah berbeda, aku selalu berharap yang terbaik untukmu, sayang ^^*
- ♥ *Temen main yang super kece Ovet, Dora, Lia, Zuma, and Alen. Let's show the best of us girls!*
- ♥ *Almamaterku Universitas Bengkulu. I Prove it to you!*

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tri Utami Putri
NPM : A1F010025
Program Studi : Pendidikan Kimia
Fakultas : Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya ilmiah yang disusun berdasarkan prosedur penelitian/ pengembangan yang penulis lakukan sendiri dan bukan merupakan duplikasi skripsi/ karya ilmiah orang lain. Pendapat atau temuan orang lain yang terdapat dalam skripsi ini dikutip atau dirujuk berdasarkan kaidah ilmiah. Demikian pernyataan ini penulis buat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bengkulu, Maret 2014

Yang menyatakan,



TRI UTAMI PUTRI

NPM. A1F010025

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BAYUR ELANG
(*Pterospermum diversifolium*) DENGAN METODE DPPH (1,1-diphenyl-2-
picrylhydrazyl) DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER PADA
FRAKSI AKTIF**

Tri Utami Putri¹, M. Lutfi Firdaus², Agus Sundaryono³
Program Studi Pendidikan Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan
Universitas Bengkulu

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung pada fraksi aktif. Isolasi senyawa aktif daun *Pterospermum diversifolium* dilakukan dengan cara maserasi menggunakan etanol yang kemudian dipartisi dengan n-heksana, dan etil asetat. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak kasar, fraksi n-heksana, etil asetat, etanol, dan asam askorbat sebagai pembanding. Fraksi aktif dipisahkan dengan kromatografi kolom dan diidentifikasi metabolit sekundernya dengan uji fitokimia. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak etil asetat sebagai fraksi paling aktif dengan nilai IC_{50} 3,7 ppm. Hasil pemisahan kromatografi kolom fraksi aktif (ekstrak etil asetat) diperoleh 6 fraksi yakni fraksi A-F dengan nilai R_f berturut-turut 0,14; 0,05; 0,17; 0,09; 0,11; 0,2. Nilai IC_{50} untuk fraksi A, B, C, D, E, dan F hasil pemisahan kromatografi kolom secara berturut-turut adalah 41,1; 49; 2,8; 84,9; 44,3; dan 5,6 ppm. Fraksi C menunjukkan aktivitas antioksidan terkuat dengan nilai IC_{50} 2,8 ppm paling kecil di antara 5 fraksi lainnya. Hasil uji fitokimia fraksi C menunjukkan adanya senyawa fenolik dan flavonoid.

Kata kunci: Antioksidan, DPPH, Daun Bayur Elang, *Pterospermum diversifolium*, Flavonoid, Fenol

- ¹ : Mahasiswa Pendidikan Kimia FKIP Universitas Bengkulu
² : Pembimbing Pendamping (email: ml.firdaus@gmail.com)
³ : Pembimbing Utama (email: sundaryono_2005@yahoo.fr)

**ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST FROM EXTRACT OF BAYUR
ELANG'S LEAF (*Pterospermum diversifolium*) BY DPPH (1,1-diphenyl-2-
picrylhydrazyl) METHOD AND SECONDARY METABOLITE
IDENTIFICATION FROM THE ACTIVE FRACTION**

Tri Utami Putri¹, M. Lutfi Firdaus², Agus Sundaryono³
Chemistry Education, Teacher Training and Education Faculty,
University of Bengkulu

ABSTRACT

This study aimed to know antioxidant activity of Bayur Elang's leaf extract (*Pterospermum diversifolium*) by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method and to identify secondary metabolite from the active fraction. The DPPH method measures the ability of extract to against stable radical DPPH by spectrophotometry at λ 517 nm. Isolation the active compound of *Pterospermum diversifolium*'s leaf was made by maseration using ethanol which is partitioned n-hexane and ethyl acetate. Antioxidant activity test has done for crude extract, n-hexane, ethyl acetate, and ethanol fraction and ascorbic acid as standart. The active extract was fractionated by colom chromatography and identified the secondary metabolite with phytochemical test. Antioxidant activity test showed ethyl acetate was the most active fraction with IC₅₀ 3,7 ppm. Column chromatography of the most active fraction (ethyl acetate extract) produced 6 fractions, those were A-F fraction with Rf 0,14; 0,05; 0,17; 0,09; 0,11; 0,2. IC₅₀ for A, B, C, D, E, and F fraction were 41,1; 49; 2,8; 84,9; 44,3; and 5,6 ppm. C fraction showed the strongest antioxidant activity with IC₅₀ 2,8 ppm whose the lowest value among five fractions. Phytochemical identification showed C fraction containing phenolyc compound and flavonoid.

Keywords: Antioxidant, DPPH, Bayur Elang's leaf, *Pterospermum diversifolium*, Flavonoid, Phenol

¹ : Chemistry Education Student, University of Bengkulu

² : Co-supervisor (email: ml.firdaus@gmail.com)

³ : Supervisor (email: sundaryono_2005@yahoo.fr)

KATA PENGANTAR



Puji dan syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan Identifikasi Metabolit Sekunder pada Fraksi Teraktif.**”

Skripsi ini dapat selesai tidak hanya karena usaha dan kemampuan penulis sendiri, melainkan begitu banyak bantuan, saran, informasi dan bimbingan dari berbagai pihak baik secara langsung, maupun tidak langsung. Untuk itulah dalam kesempatan ini penulis menghaturkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Rambat Nur Sasongko, M. Pd, sebagai Dekan FKIP UNIB
2. Ibu Dra. Diah Aryulina, M. A, Ph. D, sebagai ketua jurusan PMIPA.
3. Ibu Dewi Handayani, S. Pd, M. Si dan Ibu Elvinawati, M. Si sebagai ketua dan sekretaris Progran Studi Pendidikan Kimia.
4. Bapak Dr. Agus Sundaryono, M. Si sebagai pembimbing utama yang telah banyak memberikan waktu, ilmu, perhatian, motivasi, semangat, masukan, bantuan dan nasehat yang berarti sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan baik.
5. Bapak Dr. M. Lutfi Firdaus, M. T selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan arahan, bimbingan, waktu, perhatian dan masukan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Ibu dewan Penguji, terimakasih atas saran yang telah diberikan.
7. Bapak ibu dosen program studi Pendidikan Kimia Universitas Bengkulu yang telah memberikan ilmu pengetahuan selama penulis belajar di bangku kuliah.
8. Semua pihak yang turut membantu dan memberi dukungan selama penulis melakukan penelitian dan penyusunan skripsi yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan yang memerlukan perbaikan dan penyempurnaan, namun penulis berharap kiranya skripsi ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan.

Bengkulu, Maret 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN	iv
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Ruang Lingkup Penelitian	3
1.4 Keaslian Penelitian	4
1.5 Tujuan Penelitian	4
1.6 Kegunaan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Studi Pustaka	6
2.2 Landasan Teori	8
2.2.1 Antioksidan	8
2.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan	11
2.2.3 Bayur Elang (<i>Pterospermum diversifolium</i>)	13
2.2.3.1 Morfologi	15
2.2.3.2 Ekologi dan Penyebaran	15
2.2.3.3 Kandungan Kimia dan Kegunaan	15
2.2.4 Senyawa Metabolit Sekunder	16
2.2.4.1 Flavonoid	17
2.2.4.2 Tanin	18
2.2.4.3 Alkaloid	19
2.2.4.4 Saponin	19
2.2.4.5 Terpenoid/ Steroid	20
2.2.4.6 Senyawa Fenolik	20
2.2.5 Ekstraksi	21
2.2.6 Kromatografi	23
2.2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis	23
2.2.6.2 Kromatografi Kolom	25
2.2.7 Spektrofotometer UV-Vis	26

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	28
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	28
3.2.1 Alat	28
3.2.2 Bahan	28
3.3 Prosedur Penelitian	29
3.3.1 Penyiapan Sampel	29
3.3.2 Uji Fitokimia.....	29
1) Uji Flavonoid.....	29
2) Uji Saponin.....	30
3) Uji Tanin	30
4) Uji Steroid dan Terpenoid	30
5) Uji Alkaloid.....	31
6) Uji Senyawa Fenolik	31
3.3.3 Ekstraksi	31
3.3.4 Fraksinasi.....	32
3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Bayur Elang (<i>Pterospermum diversifolium</i>) terhadap DPPH (1,1-Diphenyl- 2-Picrylhydrazyl).....	33
3.3.5.1 Pembuatan Larutan DPPH	33
3.3.5.2 Pembuatan Larutan Blanko	33
3.3.5.3 Persiapan Larutan Uji Fraksi n-heksana, etil asetat, etanol.....	33
3.3.5.4 Pembuatan Larutan Asam Askorbat sebagai Pembanding	34
3.3.5.5 Penentuan Panjang Gelombang maksimum Pengukuran	34
3.3.5.6 Pengujian Aktivitas Antioksidan terhadap Fraksi dan Asam Askorbat	34
3.3.5.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Aktif	34
3.3.5.8 Uji Fitokimia (Metabolit Sekunder) terhadap Fraksi Aktif	35
3.3.6 Isolasi Fraksi Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	35
3.3.7 Pemisahan Fraksi dengan Kromatografi Kolom.....	36
3.4 Analisis Data	37

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Fitokimia Awal Daun Bayur Elang (<i>Pterospermum diversifolium</i>)	38
4.2 Ekstraksi dan Fraksinasi	38
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Bayur Elang (<i>P. diversifolium</i>)	40
4.4 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder	47
4.4.1 Pemilihan Eluen dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	47
4.4.2 Kromatografi Kolom	48

4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Fitokimia fraksi Aktif.....	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	51
B. Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Reaksi umum oksidasi lemak	11
Gambar 2. Struktur kimia DPPH.....	12
Gambar 3. Struktur DPPH bentuk radikal dan bentuk tereduksi	13
Gambar 4. Bayur Elang (<i>Pterospermum diversifolium</i>)	14
Gambar 5. Struktur umum kelompok flavonoid	18
Gambar 6. Reaksi identifikasi tanin.....	19
Gambar 7. Fraksinasi dengan n-Heksana.....	39
Gambar 8. Fraksinasi dengan etil asetat	40
Gambar 9. Panjang gelombang DPPH 100 ppm dalam etanol	41
Gambar 10. Warna fraksi etil asetat setelah direaksikan dengan DPPH	44
Gambar 11. Kurva penentuan IC ₅₀ fraksi etil asetat	44
Gambar 12. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas.....	45
Gambar 13. Pemisahan fraksi etil asetat dengan eluen etil asetat: etanol.....	48
Gambar 14. Pemisahan fraksi etil asetat dengan eluen n-heksana: etil asetat..	48
Gambar 15. Fraksi hasil penggabungan eluat setelah diamati menggunakan KLT	49

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Awal Daun Bayur Elang (<i>P. diversifolium</i>).....	38
Tabel 2. Absorbansi & % Inhibisi ekstrak daun <i>P. diversifolium</i> dan asam askorbat	42
Tabel 3. Hasil uji fitokimia fraksi daun Bayur Elang (<i>P. Diversifolium</i>).....	46
Tabel 4. Nilai IC ₅₀ fraksi aktif etil asetat hasil pemisahan kromatografi kolom	50

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta unsur DNA termasuk karbohidrat (Winarsi, 2007). Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Kikuzaki dkk, 2002).

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut stabil. Berdasarkan sumbernya ada dua macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik). Antioksidan sintetik yang paling sering digunakan adalah *Propil Galat* (PG), *Butylated Hydroxynasole* (BHA), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT), dan *Tertbutylhydroquinone* (TBHQ). Penggunaan BHA pada level tinggi diketahui mempunyai sifat toksik dan efek penggunaan BHT dapat menyebabkan liver membesar, tumor paru-paru, tumor hati, serta tumor kandung kemih pada tikus (Wisnu, 2006). Antioksidan sintetik ini dikhawatirkan dapat memberi efek samping yang berbahaya bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik (Bendra, 2012). Kekhawatiran akan adanya kemungkinan efek samping dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi pilihan. Antioksidan alami adalah hasil ekstraksi dari bahan-bahan alami. Senyawa antioksidan alami dalam tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik dan polifenolik, seperti golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin,

tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Melihat kekayaan alam di Indonesia penelitian tumbuhan sebagai sumber antioksidan alami menjadi sangat potensial untuk dikembangkan.

Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) adalah pohon yang biasa diambil kayunya untuk dijadikan papan sebagai bahan membangun rumah. Namun selain dijadikan papan, masyarakat suku Mulak Kabupaten Kaur Provinsi Bengkulu juga memanfaatkan tanaman Bayur Elang sebagai obat tradisional. Akar Bayur Elang digunakan untuk mengobati bisul, bengkak, dan megak, daunnya untuk mengobati malaria, serta kulit kayunya untuk mengobati penyakit kanker.

Penelitian efek farmakognostik *P. diversifolium* masih sangat sedikit. Salah satunya Hidayathulla (2011) telah melakukan penelitian dengan judul “*Phytochemical Evaluation and Antibacterial Activity of Pterospermum diversifolium* Blume.” Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Pterospermum diversifolium* dari empat macam pelarut yang berbeda mengandung berbagai senyawa seperti terpenoid, flavonoid, fenolik, saponin, alkaloid dan glikosida, serta ekstrak *P. diversifolium* berpotensi sebagai antibakteri (antibiotik).

Penggunaan *P. diversifolium* sebagai obat tradisional kanker oleh masyarakat suku Mulak serta adanya kandungan senyawa fenolik dan flavonoid hasil penelitian Hidayathulla (2011) melatarbelakangi peneliti untuk melakukan pengujian aktivitas antioksidan serta meneliti metabolit sekunder apakah yang terkandung dalam fraksi teraktif *P. diversifolium* yang berpotensi sebagai antioksidan.

Uji aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Metode ini dipilih karena merupakan metode yang sederhana, cepat, dan mudah untuk skrining aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat dan praktis (Prakash dkk, 2001). Dalam penelitian ini diuji aktivitas antioksidan ekstrak kasar, fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana daun *P. diversifolium* serta aktivitas antioksidan dari fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom. Fraksi yang diketahui aktif sebagai antioksidan

dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui metabolit sekunder apakah yang terkandung di dalamnya.

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan baru mengenai *P. diversifolium* sebagai sumber antioksidan alami dan memberi nilai tambah bagi *P. diversifolium* selain pemanfaatannya sebagai bahan bangunan (meubel) yang selama ini telah digunakan masyarakat.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat diangkat rumusan masalah sebagai berikut:

- a. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak kasar, fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)?
- b. Bagaimana aktivitas antioksidan fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)?
- c. Bagaimana hasil identifikasi metabolit sekunder fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) secara fitokimia?

1.3 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Sampel yang diuji adalah daun tanaman Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) yang diambil di kebun warga di desa Gunung Kayo Kecamatan Bunga Mas Kabupaten Bengkulu Selatan.
- b. Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol.
- c. Uji aktivitas antioksidan daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dilakukan untuk ekstrak kasar, fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

- d. Uji aktivitas antioksidan juga dilakukan untuk fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*).
- e. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
- f. Identifikasi metabolit sekunder dilakukan dengan uji fitokimia fraksi aktif.

1.4 Keaslian Penelitian

Penelitian tentang tumbuhan bergenus *Pterospermum* telah beberapa kali dilakukan oleh negara-negara di Asia, seperti Indonesia, Jepang, dan India. Di Indonesia penelitian tanaman bergenus *Pterospermum* yang pernah dilakukan ialah uji aktivitas antioksidan *Pterospermum celebicum* Miq. dan uji toksisitas *Pterospermum subpeltatum* C.B. Rob. Di Jepang penelitian yang dilakukan adalah perbedaan tingkat pertumbuhan dan strategi pertumbuhan antara *Pterospermum diversifolium* dengan *Pterospermum javanicum*. Di India penelitian yang dilakukan ialah uji fitokimia dan aktivitas antibakteri dari *Pterospermum diversifolium* Blume. Sedangkan penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan identifikasi metabolit sekunder pada fraksi teraktif belum pernah dilakukan dan belum ditemukan dalam publikasi ilmiah.

1.5 Tujuan Penelitian

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kasar, fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).
- b. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom ekstrak (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

- c. Untuk mengetahui hasil identifikasi metabolit sekunder fraksi aktif hasil pemisahan kromatografi kolom ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) secara fitokimia.

1.6 Kegunaan Penelitian

- a. Bagi Peneliti
Dapat menambah wawasan, pengetahuan, dan keterampilan sesuai dengan bidang ilmu yang ditekuni serta dapat menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut
- b. Bagi Masyarakat
Dapat dijadikan landasan bagi masyarakat dalam mengaplikasikan tumbuhan Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) sebagai tanaman obat khususnya sebagai antioksidan alami.
- c. Bagi Ilmu Pengetahuan
Memberikan informasi tentang aktivitas antioksidan ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dan bagaimana hasil identifikasi metabolit sekunder fraksi aktif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Studi Pustaka

Penelitian aktivitas antioksidan dari tanaman telah banyak dilakukan, salah satunya penelitian yang dilakukan Febriani (2012) yang menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun *Cocculus orbiculatus* (L.) DC. dengan metode DPPH dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia dari fraksi yang aktif. Hasil penelitian Febriani (2012) menunjukkan bahwa dari ketiga fraksi yang diuji (fraksi n-heksana, etil asetat, dan methanol), ekstrak methanol merupakan fraksi teraktif dengan nilai IC_{50} sebesar 74,32 $\mu\text{g/ml}$. Fraksi aktif metanol kemudian difraksinasi dan diuji kembali sehingga diperoleh fraksi teraktif ialah fraksi G dengan kandungan senyawa flavonoid, tannin, dan senyawa gula. Suyoso (2011) juga telah melakukan pengujian aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa aktif ekstrak tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.). Hasil penelitian menyebutkan bahwa ekstrak etanol tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) berpotensi sebagai antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 147 ppm, dan isolate ekstrak etanol yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi adalah auron dan triterpenoid karboksilat.

Penelitian aktivitas antioksidan dari tanaman bergenus *Pterospermum* sudah pernah dilakukan yakni pada spesies *Pterospermum celebicum* Miq. Marzuki dkk (2012) menguji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat kayu batang Banyuru Sulawesi (*Pterospermum celebicum* Miq.) dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat kayu batang Banyuru Sulawesi (*Pterospermum celebicum* Miq.) memiliki nilai IC_{50} 180 bpj, dengan aktivitas antioksidan bersifat kuat. Untuk *Pterospermum diversifolium* sendiri telah dilakukan penelitian oleh Hidayathulla (2011) dengan judul “*Phytochemical Evaluation and Antibacterial Activity of Pterospermum diversifolium Blume.*” Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Pterospermum diversifolium* dari empat macam pelarut yang berbeda

mengandung berbagai senyawa seperti terpenoid, flavonoid, fenolik, saponin, alkaloid dan glikosida, serta ekstrak *Pterospermum diversifolium* berpotensi sebagai antibakteri (antibiotik).

Selain pengujian aktivitas antioksidan, tanaman bergenus *Pterospermum* juga diuji terkait toksisitasnya, seperti yang dilakukan Salempa, dkk (2009) yang menguji toksisitas ekstrak methanol beberapa bagian jaringan tumbuhan Bayur (*Pterospermum subpeltatum* C.B. Rob) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Dari hasil uji toksisitas dengan metode *Brine shrimp lethality test* (BLST) terhadap beberapa bagian jaringan *Pterospermum*, diperoleh data bahwa ekstrak metanol kayu akar mempunyai aktivitas yang paling tinggi dibanding dengan bagian yang lain dengan nilai LC_{50} adalah 220 ppm.

Tak hanya di bidang kesehatan, pengujian tanaman Bayur (genus *Pterospermum*) juga pernah dilakukan terkait perbedaan pertumbuhan dan distribusinya. Seperti penelitian yang dilakukan Yamada, dkk (2005) dengan judul “*Differences in Growth Trajectory and Strategy of Two Sympatric Congeneric Species in an Indonesian Floodplain Forest*” yang membandingkan perbedaan tingkat pertumbuhan dan strategi pertumbuhan antara *Pterospermum diversifolium* dengan *Pterospermum javanicum*, hasilnya *Pterospermum diversifolium* lebih cepat pertumbuhannya pada kondisi cahaya yang tinggi (terang) dibandingkan dengan *Pterospermum javanicum*, begitu pula sebaliknya

Selanjutnya, Setiadi (2004) pada penelitian keanekaragaman spesies tingkat pohon di taman wisata alam Ruteng, Nusa Tenggara Timur telah menghitung nilai penting spesies Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terkait distribusi dan komposisinya berdasarkan ketinggian, sehingga dapat ditentukan strategi pengelolaan yang paling relevan dengan kondisi alamnya.

2.2 Landasan Teori

2.2.1 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu menunda, memperlambat, atau menghambat reaksi oksidasi (Pokorny dkk, 2001). Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, dan menahan pembentukan oksigen reaktif atau radikal bebas dalam tubuh. Senyawa antioksidan memegang peranan penting dalam pertahanan tubuh terhadap pengaruh buruk yang disebabkan radikal bebas.

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta unsur DNA termasuk karbohidrat. Radikal bebas memiliki reaktivitas yang tinggi, yaitu sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron di sekelilingnya. Senyawa radikal bebas juga dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal bebas (Winarsi, 2007). Senyawa radikal bebas di dalam tubuh dapat merusak asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel yang mengakibatkan dinding sel menjadi rapuh. Senyawa radikal bebas ini berpotensi merusak DNA sehingga mengacaukan sistem info genetika dan berlanjut pada pembentukan sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida yang memicu munculnya penyakit degeneratif (Winarsi, 2007; Juniarti, dkk 2009).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralsir radikal bebas dengan cara menyumbangkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*elektron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan

senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami merupakan antioksidan hasil ekstraksi dari bahan-bahan alami, sedangkan antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia. Contoh antioksidan alami adalah senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam/ bahan makanan seperti senyawa-senyawa turunan fenol, flavonoid, vitamin C, dan E (Febriani, 2012). Senyawa antioksidan alami dalam tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik dan polifenolik, seperti golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki fungsi sebagai antioksidan meliputi flavon, flavanol, isoflavon, katekin dan kalkon, sedangkan turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain (Santoso, 2005). Contoh antioksidan sintetik adalah *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *tertbutyl hydroxylquinone* (TBHQ) (Febriani, 2012).

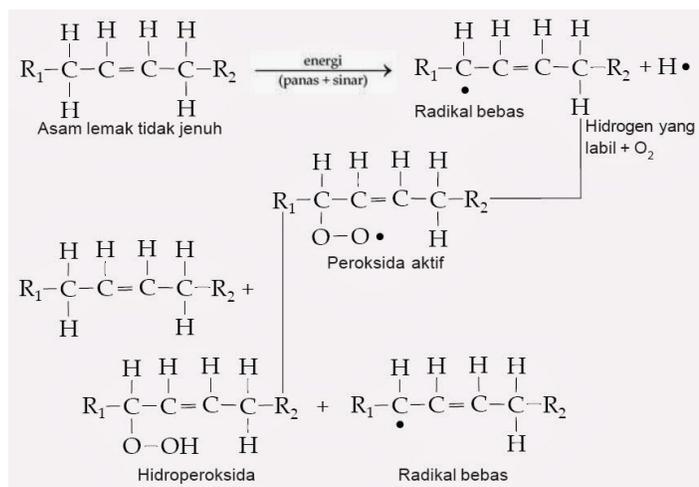
Mekanisme Kerja Antioksidan

Menurut Eskin dan Przybylski (2001) mekanisme kerja senyawa antioksidan adalah mengkelat ion logam, menghilangkan oksigen radikal, memecah reaksi rantai inisiasi, menyerap energi oksigen singlet, mencegah pembentukan radikal, menghilangkan dan atau mengurangi jumlah oksigen yang ada. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh 4 mekanisme reaksi, yaitu 1) pelepasan hidrogen dari antioksidan, 2) pelepasan elektron dari antioksidan, 3) adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan dan 4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Ketaren, 2008).

Antioksidan dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok berdasarkan mekanisme reaksinya, yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Antioksidan primer disebut juga antioksidan endogenous atau enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hydrogen secara cepat kepada radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi), kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder disebut juga sebagai antioksidan eksogeneus atau non-enzimatis. Antioksidan kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif, yaitu terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal atau dirusak pembentukannya. Kerja antioksidan sekunder yaitu dengan cara memotong reaksi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin. Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang tereduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya struktur pada gugus non-basa maupun basa (Winarsi, 2007). Mekanisme kerja serta kemampuan antioksidan sangat bervariasi. Kombinasi beberapa antioksidan dapat memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap oksidasi dibandingkan satu jenis antioksidan saja (Siagian, 2002).

Secara umum antioksidan bereaksi dengan menghambat oksidasi lemak atau autooksidasi melalui beberapa tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Tahap inisiasi merupakan tahap pembentukan radikal bebas asam lemak, yaitu asam lemak metastabil dan sangat reaktif akibat kehilangan satu atom hidrogen (H). Reaksi selanjutnya adalah propagasi dimana radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksida. Radikal peroksida selanjutnya akan menyerang asam lemak dan menghasilkan hidroksiperoksida dan

radikal asam lemak baru lagi, ini yang disebut tahap terminasi. Adapun mekanisme reaksi tersebut dapat dilihat pada gambar 1.

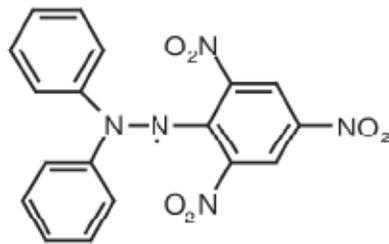


Gambar 1. Reaksi umum oksidasi lemak

2.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan

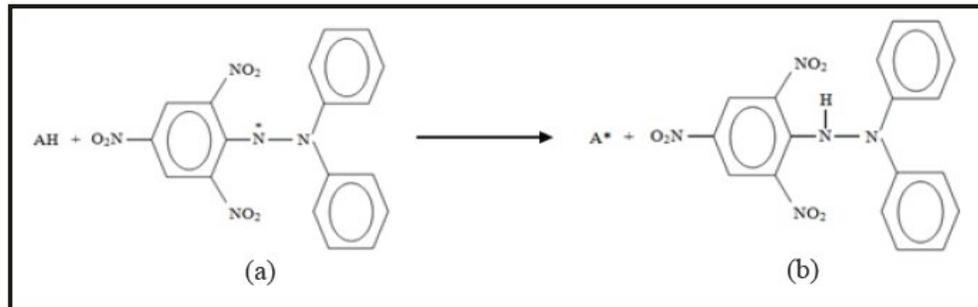
Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada sampel yang diduga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Pengukuran aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas dapat dilakukan dengan bermacam metode, seperti DPPH, ORAC, ABTS (TEAC), *Cupric Ion Reducing Antioxidant* (CUPRAC) dan *Ferric Reducing Ability of Plasma* (FRAP). Metode yang digunakan pada penentuan aktivitas antioksidan Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) pada penelitian ini adalah metode DPPH. Metode ini dipilih karena memiliki beberapa kelebihan seperti teknis simpel, dapat dikerjakan dengan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis (Karadag dkk, 2009). Prinsip metode uji antioksidan DPPH didasarkan pada reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari senyawa antioksidan. DPPH berperan sebagai radikal bebas yang diredam oleh antioksidan dari sampel. Selanjutnya DPPH akan diubah menjadi DPPH-H (bentuk tereduksi DPPH) oleh senyawa antioksidan.

DPPH (Diphenyl pikrilhidrazil) merupakan radikal bebas yang stabil dalam larutan berair atau metanol pada suhu kamar dan sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan.



Gambar 2. Struktur kimia DPPH (Juniarti, 2009)

Radikal bebas DPPH bersifat peka terhadap cahaya, oksigen dan pH, tetapi bersifat stabil dalam bentuk radikal sehingga memungkinkan untuk dilakukan pengukuran antioksidan (Molyneux, 2004). Radikal bebas DPPH dapat menangkap atom hidrogen dari komponen aktif ekstrak yang dicampurkan kemudian bereaksi menjadi bentuk tereduksinya yaitu yang terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. Struktur DPPH: (a) DPPH bentuk radikal, (b) DPPH bentuk tereduksi
(Sumber: Molyneux, 2004)

Berdasarkan reaksi tersebut, senyawa antioksidan (AH) melepas atom hidrogen menjadi radikal senyawa antioksidan (A*). DPPH merupakan radikal bebas yang direaksikan dengan senyawa antioksidan dan menjadi DPPH bentuk tereduksi (DPPH2). Mekanisme penangkapan radikal DPPH, yaitu melalui donor atom H dari senyawa antioksidan yang menyebabkan peredaman warna radikal pikrilhidrazil yang berwarna ungu menjadi pikrilhidrazil berwarna kuning yang nonradikal (Molyneux, 2004).

Penelitian ini menggunakan antioksidan vitamin C sebagai pembanding. Larutan DPPH yang berisi ekstrak sampel diukur serapan cahayanya dan dihitung aktivitas antioksidannya dengan persen inhibisi, yaitu banyaknya aktivitas senyawa antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas DPPH. Parameter yang umum digunakan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan pada suatu ekstrak bahan adalah dengan menentukan nilai *inhibitor concentration* 50% (IC₅₀) bahan antioksidan tersebut. IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas radikal sebesar 50% (Molyneux, 2004).

2.2.3 Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*)

Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) adalah pohon berkayu yang biasanya hidup di hutan-hutan atau di perkebunan daerah tropis. Bayur Elang tumbuh di dataran rendah dengan ketinggian di bawah 1000 m dpl. Tanaman

Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) juga dikenal dengan nama lain di berbagai negara. Di Indonesia sendiri Bayur Elang dikenal dengan Bayur Jantan, Cerlang, Balangkoras (Sumatra), dan Balang. Di Jepang dikenal dengan Balang, Malaysia: Bayur Jantan, Filipina: Bayok, Thailand: Champa Thet, Sa La Pang, Yu.

Tanaman *P. diversifolium* secara taksonomi memiliki klasifikasi ilmiah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Pterospermum</i>
Spesies	: <i>Pterospermum diversifolium</i> Bl



Gambar 4. Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*)

2.2.3.1 Morfologi

Bayur adalah pohon berukuran sedang hingga besar, tingginya mencapai 45 m dan berdiameter hingga mencapai (100- 120) cm, diameter batang 1 m, biasanya terdapat akar banir yang tingginya dapat mencapai 2 m. Kulit batang berwarna sawo matang atau kelabu coklat, permukaan kulit batang halus, bersisik atau bercelah dangkal, berlentisel, kulit bagian dalam berserabut. Bayur memiliki daun tunggal, menyamping, bentuk daun di bagian dasar tidak sama, tepi daun rata atau bergelombang atau bergigi, berambut banyak di bagian bawah daun, terdapat stipula, sisi atas daun berwarna hijau terang, sisi bawah daun berambut bintang halus kecoklatan. Bunga di ketiak, berwarna kuning serta berbiji banyak dan bersayap. Bayur dibudidayakan dengan biji (Boer dan Lemmens, 2013).

2.2.3.2 Ekologi dan Penyebaran

Pterospermum tumbuh tersebar di hutan-hutan primer atau tumbuh melimpah secara lokal di hutan-hutan sekunder dan terutama pada pinggir sungai, pada tanah-tanah aluvial, hingga tumbuh pada ketinggian 1400 m dpl. *Pterospermum* terdiri dari 40 jenis, tumbuh di India, Burma (Myanmar), Indo-China, China Selatan, Thailand dan seluruh wilayah Malesia kecuali New Guinea (Boer dan Lemmens, 2013). *Pterospermum diversifolium* sendiri berasal dari India, China dan Asia Tenggara termasuk Filipina (Rey, 2012).

2.2.3.3 Kandungan Kimia dan Kegunaan

Peraturan Menteri Kehutanan Nomor : P.35/ Menhut-II/ 2007 tentang hasil hutan bukan kayu mengelompokkan Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) ke dalam kelompok tumbuhan obat. Hal ini didukung dengan hasil penelitian Hidayathulla (2011) yang menyatakan bahwa ekstrak *Pterospermum diversifolium* dari empat macam pelarut yang berbeda mengandung berbagai senyawa seperti terpenoid, flavonoid, fenolik, saponin, alkaloid dan glikosida. Selain Bayur Elang

(*Pterospermum diversifolium*), Marzuki dkk (2008) juga telah melakukan penelitian terhadap salah satu jenis *Pterospermum*, yakni meneliti kandungan kimia etil asetat kayu batang Banyuru Sulawesi (*Pterospermum celebicum* Miq.). Penelitian mengenai pemeriksaan farmakognostik tumbuhan *Pterospermum celebicum* Miq. dan penapisan komponen kimia secara kromatografi lapis tipis ini dilaporkan bahwa pada daun, kulit batang, dan batang ditemukan adanya senyawa tannin, katekin, fenol dan steroid.

Kayu Bayur umumnya dimanfaatkan sebagai bahan untuk pembuatan kayu lapis, furnitur, perkapalan, jembatan, pulp dan kertas. Daun dan kulit batang yang banyak mengandung tannin dapat berkhasiat mengobati gatal-gatal dan disentri. Jenis tumbuhan ini juga dapat digunakan untuk memulihkan kembali lahan-lahan kritis. Manfaat yang diberikan dalam penghijauan adalah memiliki struktur tajuk yang baik sebagai penahan air hujan (Boer dan Lemmens, 2013). Hasil penelitian Marzuki dkk (2012) tentang ekstrak etil asetat kayu batang Banyuru Sulawesi (*Pterospermum celebicum* Miq.) juga menunjukkan bahwa Bayur bermanfaat sebagai sumber antioksidan alami.

2.2.4 Senyawa Metabolit Sekunder

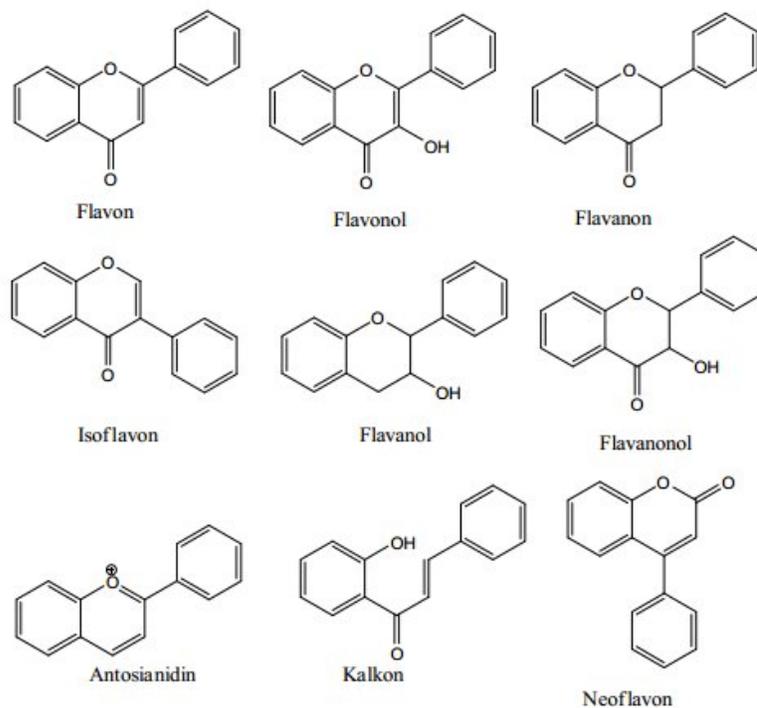
Senyawa metabolit sekunder merupakan molekul kecil yang dihasilkan oleh suatu organisme tetapi tidak secara langsung dibutuhkan dalam mempertahankan hidupnya, tidak seperti protein, asam nukleat, dan polisakarida yang merupakan komponen dasar untuk proses kehidupan (Ariefta, 2012). Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri maupun lingkungannya. Senyawa kimia sebagai hasil metabolit sekunder telah banyak digunakan sebagai zat warna, racun, aroma makanan, obat-obatan, dan sebagainya serta sangat banyak jenis tumbuh-tumbuhan yang digunakan untuk obat-obatan

yang dikenal sebagai obat tradisional sehingga diperlukan penelitian tentang penggunaan tumbuh-tumbuhan berkhasiat (Lenny, 2006). Senyawa metabolit sekunder ini di antaranya flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, terpenoid, steroid, dan senyawa fenolik.

2.2.4.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa bahan alam yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Flavonoid adalah senyawa fenolat yang terhidroksilasi dan merupakan senyawa $C_6-C_3-C_6$ dimana C_6 diganti dengan benzene dan C_3 adalah rantai alifatik yang terdiri dari cincin piran (Mustarichie dkk, 2011). Umumnya, flavonoid terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida, gugusan gula pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid mengandung system aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV dan spektrum tampak. Flavonoid terdapat pada seluruh bagian tanaman, termasuk pada buah, tepung sari, dan akar. Berdasarkan pada tingkat ketidakjenuhan dan oksidasi dari segmen karbon, flavonoid selanjutnya dibagi menjadi beberapa kelas seperti pada gambar 5.

Flavonoid merupakan golongan senyawa alami dari senyawa fenolik yang banyak merupakan pigmen tumbuhan. Saat ini lebih dari 6.000 senyawa yang berbeda masuk ke dalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan bagian penting dari diet manusia karena banyak manfaatnya bagi kesehatan. Fungsi kebanyakan flavonoid dalam tubuh manusia adalah sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, memiliki hubungan sinergis dengan vitamin C (meningkatkan efektifitas vitamin C), anti inflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Mustarichie dkk, 2011).



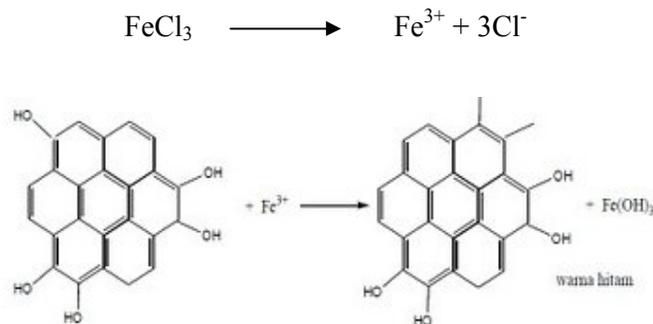
Gambar 5. Struktur umum kelompok flavonoid (Ariefta, 2012)

2.2.4.2 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang terdapat pada daun, buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekin dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Robinson dalam Sriwahyuni, 2010).

Untuk mengetahui senyawa tanin digunakan larutan gelatin dan FeCl_3 . Perubahan warna yang terjadi karena penambahan FeCl_3 karena terbentuknya Fe^{3+} tanin dan Fe^{3+} polifenol. Atom oksigen pada tanin dan polifenol mempunyai pasangan elektron yang mampu mendonorkan elektronnya pada Fe^{3+} yang mempunyai orbital d kosong membentuk ikatan kovalen koordinat sehingga menjadi satu kompleks (Mustarichie

dkk, 2011). Terjadinya warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin galat sedang warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin katekol (Praptiwi dkk, 2006).



Gambar 6. Reaksi identifikasi tanin

2.2.4.3 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa-senyawa organik yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan, bersifat basa dan struktur kimianya mempunyai sistem lingkaran heterosiklik dengan nitrogen sebagai hetero atomnya. Unsur-unsur penyusun alkaloid adalah karbon, hidrogen, nitrogen, dan oksigen. Adanya nitrogen dalam lingkaran pada struktur kimia alkaloid menyebabkan alkaloid tersebut bersifat alkali. Oleh karena itu golongan senyawa-senyawa ini disebut alkaloid (Sumardjo, 2009). Alkaloid biasanya tanpa warna, seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal dan hanya sedikit yang berbentuk cairan pada suhu kamar, contohnya pada nikotina. Senyawa-senyawa golongan alkaloid misalnya *caffeine*, *theobromine* dan *theophylline* (Sirait, 2007).

2.2.4.4 Saponin

Saponin terdapat pada tanaman tinggi. Senyawa ini dapat membentuk larutan koloidal dalam air dan bila dikocok akan membuih. Saponin memiliki rasa pahit atau getir, dapat mengiritasi membran mukosa dan membentuk senyawa kompleks dengan kolesterol. Selain itu, saponin

juga bersifat toksik terhadap ikan dan hewan berdarah dingin lainnya. Hal ini menyebabkan saponin dimanfaatkan sebagai racun ikan. Pada konsentrasi yang rendah, saponin sering menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus (Harborne, 1987).

2.2.4.5 Terpenoid/ Steroid

Terpenoid adalah suatu senyawa yang berasal dari molekul isoprena $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpen yang lebih sukar menguap (C_{20}) sampai ke senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoid dan sterol (C_{30}), serta pigmen karetonoid. Secara umum senyawa ini larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Biasanya senyawa ini diekstraksi dengan menggunakan etil dan kloroform.

Sterol atau steroid adalah triterpenoid yang kerangka dasarnya cincin siklopentana perhidrofenantren. Senyawa sterol pada tumbuhan disebut dengan fitosterol, yang umum terdapat pada tumbuhan tinggi adalah sitosterol, stigmasterol dan kampesterol. Senyawa ini dapat diklasifikasikan menjadi steroid dengan atom karbon lebih dari 21, yaitu sterol, sapogenin, glikosida jantung dan vitamin D. Senyawa ini dapat digunakan dalam pembuatan obat (Harborne, 1987).

2.2.4.6 Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik terdiri dari sebuah cincin fenol tersubstitusi. Asam sinamat dan asam kafeat biasanya mewakili kelompok besar dari turunan senyawa fenilpropan yang mempunyai tingkat oksidasi yang tinggi (Mustarichie dkk, 2011).

Menurut Gould dalam Mawaddah (2008) senyawa fenolik merupakan substansi yang mempunyai cincin aromatik dengan satu atau

lebih gugus hidroksil dan alkil. Senyawa fenolik dikelompokkan menjadi tiga, antara lain:

1. Fenol sederhana (vanillin, gingerol, shogaol, gualakol, dan eugenol) dan asam fenol (p-kresol, 3-etilfenol, hidrokuinon, asam galat, dan siringit).
2. Turunan asam hidroksisinamat (p-kumarin, kafein, dan ferulin).
3. Flavonoid (antosianin, flavonon, flavanon, flavonol, dan tannin).

2.2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Prinsip metode ekstraksi ini adalah didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur, seperti benzene, karbon tetraklorida atau kloroform. Batasannya adalah zat terlarut dapat ditransfer pada jumlah yang berbeda dalam kedua fase pelarut. Proses pemisahan dengan cara ekstraksi terdiri dari tiga langkah dasar, yaitu:

1. Proses penyampuran sejumlah massa bahan ke dalam larutan yang akan dipisahkan komponen – komponennya.
2. Proses pembantuan fase seimbang.
3. Proses pemisahan kedua fase seimbang

Terdapat berbagai macam metode ekstraksi, salah satunya adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut dengan cara dingin atau cara panas. Metode ekstraksi cara dingin seperti maserasi dan perklorasi, sedangkan metode ekstraksi cara panas antara lain refluks, soxhlet, digesti, infus, dekok dan fraksinasi (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Metode ekstraksi yang digunakan untuk proses ekstraksi dalam penelitian ini adalah maserasi. Prinsip dari metode ini adalah proses difusi pelarut ke dalam dinding sel tanaman untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang ada dalam tanaman tersebut.

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana, tetapi masih digunakan secara luas. Proses awal ekstraksi komponen-komponen aktif dari suatu jaringan tanaman adalah dengan meghaluskan jaringan tanaman tersebut. Hal ini bertujuan untuk memperbesar peluang terlarutnya komponen-komponen metabolit yang diinginkan. Tetapi sebelum diekstraksi, jaringan tanaman dikeringkan untuk mempertahankan kandungan metabolit dalam tanaman yang telah dipotong sehingga proses metabolisme terhenti.

Prosedur maserasi dilakukan dengan merendam bahan tanaman (simplisia) dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup pada suhu kamar. Metode ini sesuai baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun untuk jumlah besar. Pengadukan sesekali atau secara konstan (dengan menggunakan alat pengocok mekanik untuk menjamin kehomogenan) dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Proses ekstraksi dapat dihentikan ketika tercapai keseimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam bahan tanaman. Setelah ekstraksi, residu bahan tanaman (maserat), harus dipisahkan dari pelarut. Hal ini melibatkan proses pemisahan kasar dengan cara dekantasi, biasanya diikuti dengan tahap penyaringan. Sentrifugasi mungkin diperlukan jika serbuk terlalu halus untuk disaring. Untuk memastikan ekstraksi yang menyeluruh, umumnya dilakukan maserasi pendahuluan, yang diikuti pemisahan dan penambahan pelarut baru (*fresh solvent*) ke maserat. Hal ini bisa dilakukan secara periodik dengan semua filtrat dikumpulkan.

Kelebihan maserasi adalah peralatan yang digunakan sederhana, dan efektif untuk senyawa-senyawa yang tidak tahan panas karena dilakukan pada temperatur kamar, sehingga tidak menyebabkan degradasi senyawa-senyawa tidak tahan panas. Kelemahan dari maserasi adalah prosesnya memakan waktu yang cukup lama dan dapat berlangsung beberapa jam sampai beberapa minggu. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut dan dapat berpotensi hilangnya metabolit. Selain itu, beberapa senyawa tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut dalam temperatur kamar (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000).

2.2.6 Kromatografi

Kromatografi adalah cara pemisahan campuran yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen campuran tersebut di antara dua fase. Menurut pengertian ini kromatografi selalu melibatkan dua fase yaitu fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*). Fase diam dapat berupa padatan atau cairan yang terikat pada permukaan padatan (kertas atau adsorben), sedangkan fase gerak dapat berupa cairan disebut eluen atau pelarut atau gas pembawa yang inert. Gerakan fase ini mengakibatkan terjadinya migrasi diferensial komponen-komponen dalam sampel (Soebagio, 2002).

Dalam teknik kromatografi, sampel yang merupakan campuran dari berbagai macam komponen ditempatkan dalam situasi dinamis pada sistem. Semua pemisahan pada kromatografi tergantung dari gerakan relative dari masing-masing komponen di antara dua fase tersebut. Senyawa atau komponen yang tertahan lebih lemah oleh fase diam akan bergerak lebih cepat daripada komponen yang tertahan lebih kuat. Perbedaan pergerakan ini disebabkan oleh perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan atau penguapan kedua fase (Yazid, 2005).

2.2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu teknik pemisahan komponen-komponen campuran senyawa-senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa di antara padatan penyerap (*adsorbent*, fasa diam) yang dilapiskan pada pelat kaca atau plastik kaku dengan suatu pelarut (fasa gerak) yang mengalir melewati *adsorbent* (padatan penyerap). Pengaliran pelarut dikenal sebagai proses pengembangan oleh pelarut (elusi). Karena kesederhaan dan kecepatan analisisnya, KLT mempunyai peranan penting dalam pemisahan senyawa-senyawa yang volatilitasnya relatif rendah, baik senyawa organik maupun senyawa anorganik.

Di dalam analisis dengan KLT, suatu contoh dalam jumlah yang sangat kecil ditempatkan (sebagai titik noda) di atas permukaan pelat tipis

fasa diam (*adsorbent*), kemudian pelat diletakkan dengan tegak dalam bejana pengembang yang berisi sedikit pelarut pengembang. Oleh aksi kapiler, pelarut mengembang naik sepanjang permukaan lapisan pelat dan membawa komponen-komponen contoh. Komponen-komponen contoh memanjat pelat KLT dengan kecepatan yang berbeda-beda, tergantung pada kelarutan komponen dalam pelarut dan derajat kekutan komponen teradsorpsi pada fasa diam. Hasilnya adalah sederetan bercak-bercak (noda-noda) yang tegak lurus terhadap permukaan pelarut dalam bejana.

Kecepatan senyawa-senyawa sebagai komponen-komponen contoh memanjat pelat dibandingkan dengan kecepatan pelarut yang mendahuluinya. Harga perbandingan ini dikenal sebagai harga R_f , dan didefinisikan sebagai:

$$\text{Harga } R_f : \frac{\text{jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}}$$

dengan titik asal adalah titik tengah noda contoh yang terdapat pada pelat KLT (Firdaus, 2011).

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. Penjerap yang paling sering digunakan adalah silica dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah *adsorpsi* dan *partisi* (Meronda, 2009).

Fase gerak KLT yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*). Fase gerak pada KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dengan mencoba-coba karena

waktu yang diperlukan hanya sebentar. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 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:

1. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
2. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
3. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solute yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metal benzene akan meningkatkan harga R_f secara signifikan.
4. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan methanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan solute-solut yang bersifat basa dan asam (Meronda, 2009).

2.2.6.2 Kromatografi Kolom

Salah satu metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar adalah menggunakan kromatografi kolom. Dalam penelitian ini, kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan fraksi teraktif dari ekstrak daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*).

Pada kromatografi kolom fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel, selulosa atau poliamida. Sedangkan fase geraknya dapat dimulai dengan pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal ataupun kombinasi dua pelarut yang

berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan.

Pemisahan ini kemudian akan menghasilkan fraksi-fraksi yang kemudian ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang diperoleh dari kolom kromatografi dan memiliki profil KLT yang sama digabung kemudian pelarutnya diuapkan sehingga akan diperoleh beberapa fraksi. Noda pada plat KLT dideteksi dengan lampu ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm untuk senyawa-senyawa yang dapat berflorosensi dengan penampakan noda seperti larutan Iod, FeCl_3 dan H_2SO_4 dalam methanol 10%. Selanjutnya, dilakukan proses pemurnian bila ingin mendapatkan senyawa murni hasil isolasi (Febriani, 2012).

2.2.7 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. Spektrum serapan merupakan hubungan antara serapan dengan panjang gelombang dan umumnya digambarkan dalam bentuk grafik. Untuk mengidentifikasi suatu zat pada daerah ultraviolet dilakukan dengan menggambarkan spektrum serapan larutan zat dalam pelarut dan dengan kadar yang tertera seperti pada monografi, untuk menetapkan serapan maksimum atau minimum. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa kadang-kadang perlu dibandingkan dengan pembanding kimia yang sesuai. Pembanding kimia tersebut dikerjakan dengan cara dan kondisi yang sama dengan zat yang diperiksa. Blanko digunakan untuk koreksi serapan yang disebabkan pelarut, pereaksi, sel, ataupun pengaturan alat. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum atau yang tercantum dalam monografi.

Spektrofotometer UV-Vis digunakan terutama untuk analisis kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisis kualitatif. Analisis kuantitatif dengan cara pembuatan kurva kalibrasi atau dengan menggunakan rumus Lambert-Beer. Analisis secara kualitatif dengan membandingkan panjang gelombang maksimum,

membandingkan serapan, daya serap, persen ekstinksi dan membandingkan spectrum serapannya. Spectrum serapan dipengaruhi oleh beberapa factor seperti jenis pelarut, pH pelarut, kadar larutan, tebal larutan dan lebar celah (Febriani, 2012).

Dalam penelitian ini spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun Bayur Elang dalam meredam radikal bebas DPPH. Pengukuran kapasitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm (Marzuki, dkk, 2012). Penurunan absorbansi menunjukkan adanya aktivitas *scavenging* (aktivitas antioksidan).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2013- Februari 2014 di Laboratorium Pendidikan Kimia (Lab 7) Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, laboratorium *Basic Science* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan laboratorium Ilmu Tanah Fakultas Pertanian Universitas Bengkulu.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: neraca analitik, corong pisah 500 mL, labu ukur 10-100 mL, Erlenmeyer 250 mL, pengaduk kaca, *rotary evaporator*, penangas air, pipet mikro (10-100 μ L dan 100-1000 μ L), pipet ukur 10 & 25 mL, tabung reaksi, gelas beker 250 mL, mesin penggiling (blender), spektrofotometer UV-VIS, kolom kromatografi 50 mL diameter 2 cm, UV-Box 366 nm, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*), DPPH (1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl*), etanol teknis 96%, n-heksana, etil asetat, aquades, asam askorbat, kertas saring, plat KLT, asam sulfat pekat, FeCl_3 1%, asam klorida 6 M, asam asetat glasial, methanol p.a, silika gel, pita magnesium, pereaksi Mayer's dan Wagner.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Penyiapan Sampel

Sampel daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) diambil dari perkebunan warga di desa Gunung Kayo Kecamatan Bunga Mas Kabupaten Bengkulu Selatan. Sampel daun segar (kurang lebih sebanyak 5 kg) sebagian digunakan untuk uji fitokimia, sisanya dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan terlindung dari sinar matahari langsung selama 5-7 hari. Tujuan dikeringkan adalah untuk mengurangi kadar air, aktifitas mikroba dan mencegah timbulnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama (pengawetan) dan tidak mudah rusak serta komposisi kimianya tidak mengalami perubahan. Pengeringan tanpa menggunakan sinar matahari langsung bertujuan agar senyawa yang terkandung tidak mengalami kerusakan. Sampel kemudian dipotong kecil-kecil. Hasil potongan dikeringkan kembali dengan cara yang sama selama 2 hari agar sampel benar-benar kering. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan dengan mesin penggiling (blender) agar diperoleh potongan kecil (serbuk) daun *P. diversifolium*. Hal ini dilakukan untuk memperluas permukaan, sehingga kontak antara sampel dan pelarut semakin besar dan senyawa organik yang terdapat di dalam sampel dapat terlarut sebanyak mungkin didalam pelarut.

3.3.2 Uji Fitokimia

Uji fitokimia ini dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*). Prosedur kerjanya adalah sebagai berikut:

1) Uji Flavonoid

Sebanyak 4 gram bahan dari daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) yang masih segar yang telah dipotong-potong dididihkan

dalam gelas kimia yang berisi 30 mL etanol teknis 96% dengan menggunakan penangas air. Kemudian dilakukan penyaringan dalam keadaan panas. Filtrat dipekatkan sampai setengahnya setelah itu ditambahkan 1 tetes HCl pekat 6 M dan pita magnesium sepanjang 2 cm yang dipotong halus seperti serbuk magnesium dan jika terbentuk warna jingga sampai merah bata menunjukkan adanya flavonoid (Djamil dan Anelia, 2009).

2) Uji Saponin

Sebanyak 2 gram sampel Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 20 mL aquades yang mendidih, kemudian disaring. Filtrat dikocok selama 15 menit. Terbentuknya lapisan busa setinggi 2 cm mengindikasikan adanya saponin (Mustarichie dkk, 2011).

3) Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquades yang mendidih, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Adanya warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman menunjukkan sampel mengandung tannin (Djamil dan Anelia, 2009).

4) Uji Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL aquades yang mendidih, kemudian disaring. Filtrat diuapkan sampai semua pelarut menguap. Kemudian ditambahkan 2 mL CH_3COOH glasial dan 3 mL H_2SO_4 pekat untuk membentuk lapisan. Terbentuk warna biru sampai hijau menunjukkan steroid positif. Warna merah kecoklatan sampai ungu menunjukkan terpenoid positif (Mustarichie dkk, 2011).

5) Uji Alkaloid

Sebanyak 50 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 10 mL HCl 1 M kemudian disaring. Filtrat kemudian diuji dengan beberapa pereaksi:

a. Pereaksi Mayer's

Sebanyak 4 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi Mayer's. terbentuknya endapan putih atau krem mengindikasikan uji positif alkaloid. Pereaksi Mayer's dibuat dengan melarutkan 1,3858 g HgCl_2 dalam 60 mL aquades dan 5 g KI dilarutkan dalam 10 mL aquades. Kemudian kedua larutan dicampur dan diencerkan sampai 100 mL.

b. Pereaksi Wagner

Sebanyak 4 mL filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi Wagner. Endapan jingga sampai merah coklat mengindikasikan sampel mengandung alkaloid. Pereaksi Wagner dibuat dengan cara melarutkan sebanyak 1,27 g iodine dan 2 g KI dalam 100 mL aquades (Djamil dan Anelia, 2009).

6) Uji Senyawa Fenolik

Sampel ditambahkan larutan FeCl_3 1%. Fenolik positif jika terjadi perubahan warna hijau, merah ungu, biru dan hitam (Mustarichie dkk, 2011).

3.3.3 Ekstraksi

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman. Sebanyak 1,3 Kg serbuk daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) diekstraksi secara maserasi menggunakan 10 liter pelarut etanol selama 7 hari, sambil dilakukan pengocokan. Kemudian disaring dan filtrat yang diperoleh dikumpulkan. Residu

dimaserasi kembali dengan 5 L etanol selama 3 hari. Filtrat yang telah dikumpulkan, digabung menjadi satu, lalu dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etanol. Filtrat yang diperoleh kemudian ditimbang.

3.3.4 Fraksinasi

Ekstrak etanol hasil pemekatan dengan *rotary evaporator* masih mengandung senyawa polar, semipolar, dan non polar. Untuk itu perlu difraksinasi cair-cair terlebih dahulu dengan menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat berturut-turut yaitu pelarut n-heksana (non polar) dan etil asetat (semi polar). Ekstrak etanol pekat yang diperoleh ($\pm 23,76$ gram) dilarutkan dalam 250 mL etanol, kemudian diambil 100 mL dan ditempatkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:2, lalu dikocok secara perlahan hingga tercampur dan didiamkan hingga tepat memisah menjadi dua fase. Fraksinasi dengan n-heksana dilakukan berulang kali hingga fraksi n-heksan berwarna bening (mendekati semula). Fraksi n-heksana kemudian dipisahkan dan fraksi etanol difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat perbandingan 1:2, proses fraksinasi ini dilakukan hingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi etanol.

Fraksi etanol, n-heksana, dan etil asetat dilakukan uji fitokimia kembali untuk mengetahui metabolit sekunder yang terkandung pada masing-masing fraksi. Hal ini dikarenakan pelarut yang berbeda akan melarutkan senyawa yang berbeda pula sesuai dengan prinsip "*Like dissolve like*". Selanjutnya masing-masing fraksi ini diuji aktivitas antioksidannya untuk melihat fraksi mana yang aktif dalam meredam radikal bebas DPPH. Selain itu dilakukan pula penyelidikan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat fraksi dengan pemisahan terbaik yang kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom untuk memisahkan fraksi-fraksi dari fraksi aktif tersebut. Terakhir, fraksi teraktif (dengan

aktivitas antioksidan tertinggi) yang telah dipisahkan dengan kromatografi kolom diuji kembali kandungan metabolit sekundernya melalui uji fitokimia untuk mengetahui metabolit sekunder manakah yang berperan sebagai antioksidan.

3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) terhadap DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)

Pada masing-masing fraksi etanol, etil asetat, dan n-heksana dari daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) serta fraksi dari ekstrak teraktif diuji aktivitas antioksidan dengan metode Blois. Nilai IC_{50} dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi Blois.

3.3.5.1 Pembuatan Larutan DPPH

Dibuat larutan DPPH konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (100 ppm) dengan cara melarutkan 10 mg DPPH di dalam 100 mL methanol p.a.

3.3.5.2 Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah 1 mL methanol p.a dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL DPPH konsentrasi 100 ppm, lalu ditambahkan 2 mL metanol dikocok hingga homogen. Diinkubasi pada suhu 37°C (di ruang gelap) selama 30 menit.

3.3.5.3 Persiapan Larutan Uji Fraksi n-heksana, Etil Asetat, Etanol

Setiap sampel yang akan diuji, terlebih dahulu dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Pembuatan larutan induk dilakukan dengan cara sejumlah 50 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL methanol p.a kemudian dikocok hingga homogen. Larutan induk yang telah diperoleh kemudian dibuat variasi konsentrasi 2, 5, 10, 15, dan 25 ppm (lampiran 1).

3.3.5.4 Pembuatan Larutan Asam Askorbat sebagai Pembanding

Terlebih dahulu dibuat larutan induk asam askorbat dengan konsentrasi 200 ppm. Pembuatan larutan induk dilakukan dengan cara sejumlah 5 mg asam askorbat ditimbang dan dilarutkan dalam 25 mL methanol p.a kemudian dikocok hingga homogen. Larutan induk yang telah diperoleh kemudian dibuat variasi konsentrasi 1, 2, 4, 10, dan 16 ppm (lampiran 1).

3.3.5.5 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pengukuran

Larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 100 ppm ditentukan spectrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 400 nm hingga 650 nm, ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

3.3.5.6 Pengujian Aktivitas Antioksidan terhadap Fraksi dan Asam askorbat

Dari masing-masing larutan uji dipipet 1,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL DPPH 100 ppm lalu ditambahkan 2,0 mL metanol dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37°C (di ruang gelap) selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh sebelumnya..

3.3.5.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Aktif

Pengujian aktivitas antioksidan fraksi aktif (hasil pemisahan kolom) dilakukan dengan metode DPPH dengan cara yang sama seperti yang dilakukan terhadap fraksi.

3.3.5.8 Uji Fitokimia (Metabolit Sekunder) terhadap Fraksi Aktif

Uji fitokimia ini dilakukan untuk mengetahui metabolit sekunder apakah yang terkandung pada fraksi aktif daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dimana senyawa tersebut yang berperan sebagai antioksidan. Uji fitokimia dilakukan dengan metode yang sama seperti uji fitokimia daun segar dan ekstrak/fraksi.

3.3.6 Isolasi Fraksi Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Isolasi fraksi aktif daun Bayur Elang dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Sebelumnya dibuat eluen dengan membandingkan pelarut organik dengan kepolaran bertingkat berturut-turut, yaitu: n-heksana: etil asetat dan etil asetat: etanol. Pelarut-pelarut ini dicampur dengan perbandingan volume 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, dan 0:10.

Dari hasil uji fitokimia masing-masing fraksi diperoleh fraksi yang bersifat antioksidan (kemampuan meredam radikal bebas DPPH tinggi). Fraksi ini digunakan dalam penyelidikan KLT. Plat yang digunakan dalam penyelidikan ini adalah plat silika gel dengan ukuran 2x10 cm. Penotolan dilakukan pada jarak 0,25 cm dari batas bawah dengan batas atas 0,25 cm dari bagian atas plat.

Penotolan cuplikan pada KLT dilakukan dengan menggunakan pipet mikro dan diusahakan diameter totolan sekecil mungkin karena jika diameter totolan besar itu akan mengakibatkan terjadinya penyebaran noda-noda dan timbulnya noda berekor.

Plat KLT yang sudah ditotolan dikembangkan pada chamber yang jenuh secara tegak lurus, sehingga komponen kimia akan terpisah membentuk pita yang berupa garis horizontal. Bagian bawah dari plat KLT dicelupkan dalam eluen yang terdapat dalam chamber. Proses ini

dilakukan dalam chamber yang tertutup rapat. Fase gerak cair akan bergerak naik pada gel silika melalui kerja kapiler sampai batas atas plat.

Plat KLT kemudian dikeringanginkan dengan cara diangin-anginkan selama 5-10 menit kemudian plat disinari dengan ultraviolet UV 366 nm (Yuliasti, 2013).

3.3.7 Pemisahan Fraksi dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan fraksi aktif daun Bayur Elang (*Pterospermum diversifolium*) dilakukan dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom pada penelitian ini menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak yang merupakan eluen terbaik hasil pengujian KLT sebelumnya dengan perbandingan tertentu.

Setiap eluat yang keluar dari kolom kromatografi ditampung dalam botol kaca (vial) 10 mL, selanjutnya dilakukan penyelidikan kembali dengan KLT terhadap nilai Rf-nya. Eluat yang memiliki spot dan Rf yang sama atau berdekatan digabungkan, sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan. Fraksi gabungan ini kemudian diuji kembali aktivitas antioksidannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode DPPH untuk mengetahui fraksi teraktif. Setiap fraksi juga diuji fitokimia kembali untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari hasil pemisahan.

3.4 Analisis Data

Persentase inhibisi (IC_{50}) terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan:

$$y = A + Bx$$

Keterangan: x= konsentrasi (ppm) dan y= persentase inhibisi (%)

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