



TESIS - SK142502

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN TANAMAN OBAT
TRADISIONAL BALI DAN ISOLASI SENYAWA
TERPENOID DARI EKSTRAK METANOL DAUN
PARE (*Momordica charantia*)**

Luh Lian Pertiwi
NRP 1414 201 038

DOSEN PEMBIMBING
Prof. Dr. Taslim Ersam, MS
Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN KIMIA ORGANIK
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016



THESIS - SK142502

**ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF BALINESE
MEDICINAL PLANTS AND THE ISOLATION OF
TERPENOID COMPOUNDS FROM METHANOL
EXTRACT OF *Momordica charantia* LEAVES**

Luh Lian Pertiwi
NRP 1414 201 038

SUPERVISOR
Prof. Dr. Taslim Ersam, MS
Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

MAGISTER PROGRAM
ORGANIC CHEMISTRY
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2016

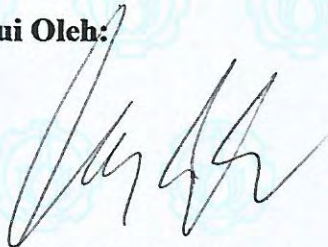
Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si.)

di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:
LUH LIAN PERTIWI
NRP. 1414 201 038

Tanggal Ujian : 1 Juli 2016
Periode Wisuda : September 2016

Disetujui Oleh:



1. Prof. Dr. Taslim Ersam
NIP. 19520816 197903 1 004

(Pembimbing)



2. Prof. Mardi Santoso, Ph.D.
NIP. 19650131 198910 1 001

(Penguji)



3. Suprpto, M.Si., Ph.D.
NIP. 19720919 199802 1 002

(Penguji)



4. Dra. Ratna Ediati, MS., Ph.D.
NIP. 19600622 198603 2 002

(Penguji)

Direktur Program Pascasarjana,




Prof. Dr. Djauhar Manfaat, M.Sc., Ph.D.
NIP. 19601202 198701 1 001

Aktivitas Antioksidan Tanaman Obat Tradisional Bali dan Isolasi Senyawa Terpenoid dari Ekstrak Metanol Daun Pare (*Momordica charantia*)

Nama Mahasiswa : Luh Lian Pertiwi
NRP : 1414 201 038
Pembimbing : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS
Sri Fatmawati, M.Sc. Ph. D

ABSTRAK

Masyarakat Bali sejak jaman dahulu memiliki tradisi pengobatan yang disebut “Usadha”. Usadha memberikan banyak informasi mengenai tanaman obat yang dapat digunakan pada berbagai macam jenis penyakit. Dari ketigabelas sampel yang diuji Pare (*Momordica charantia*) dipilih sebagai sampel pada penelitian ini berdasarkan aktivitas antioksidan dan penelusuran literatur. Antioksidan dapat menurunkan kondisi stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan sel, jaringan atau organ. Stress oksidatif dapat memicu penyakit-penyakit degeneratif seperti diabetes, kanker, jantung dan penuaan. Senyawa triterpenoid 3,7,23-trihidroksid-5,24-dien-19-al (Momordicine I) (**1**) dan 3 β ,7 β -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5,23-dien-19-al (**2**) telah diisolasi dari ekstrak metanol daun pare. Ekstrak metanol menunjukkan aktivitas antioksidan dengan $IC_{50} = 27,58 \mu\text{g/mL}$ untuk radikal kation ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid). Senyawa momordicine I menunjukkan penghambatan antioksidan yang rendah yaitu $36,76 \pm 0,07\%$ pada metode ABTS jika dibandingkan dengan asam galat ($IC_{50} 1,36 \mu\text{g/mL}$) sebagai kontrol positif.

Kata kunci: antioksidan, *Momordica charantia*, tanaman obat tradisional Bali, isolasi, ABTS

Antioxidant Activities of Balinese Medicinal Plants and The Isolation of Terpenoid Compounds from Methanol Extract of *Momordica charantia* Leaves

By : Luh Lian Pertiwi
NRP : 1414 201 038
Supervisor : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS
Sri Fatmawati, M.Sc., Ph. D.

ABSTRACT

Balinese people from long time ago have a medicinal tradition called “Usadha”. Usadha gives some information about medicinal plants that can be used for some of disease. Pare (*Momordica charantia*) was chosen from 13 traditional plants based on antioxidant activity and literature. Antioxidant can decrease oxidative stress caused damage of cells, tissue and organ. Oxidative stress thought to make significant contribution to degenerative disease. Triterpene compound 3,7,23-trihydroxy-5,24-dien-19-al (Momordicine I) (**1**) dan 3 β ,7 β -dihydroxy-25-methoxy-cucurbita-5,23-dien-19-al (**2**) was isolated from methanol extract of *M. charantia* leaves. Methanol extract shows antioxidant activity in ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) IC₅₀ 27.58 μ g/ mL. Compound 3,7,23-trihydroxy-5,24-dien-19-al (**1**) showed lower inhibition in ABTS 36,76 \pm 0,07% compared with gallic acid (IC₅₀ 1.34 μ g/mL) as positive control.

Keywords: antioxidant, *Momordica charantia*, traditional herbal plant Bali, isolation, ABTS

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan dengan baik naskah tesis yang berjudul “**Aktivitas Antioksidan Tanaman Obat Tradisional Bali dan Isolasi Senyawa Terpenoid dari Ekstrak Metanol Daun Pare (*Momordica charantia*)**”. Tulisan ini tidak akan terwujud tanpa bantuan, dukungan, doa, serta dorongan semangat dari semua pihak, untuk itu penulis sangat berterimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Taslim Ersam, MS, selaku dosen pembimbing I dan Kepala Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis atas bimbingan dan juga fasilitas penelitian sehingga pengerjaan tesis berjalan dengan lancar.
2. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D. selaku dosen pembimbing II, atas semua pengarahan, masukan, dan ilmu yang diberikan selama proses pengerjaan tesis ini.
3. Prof. Mardi Santoso, Ph.D., Suprpto, M.Si., Ph.D., dan Dra. Ratna Edianti, MS., Ph.D. selaku dosen penguji.
4. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementrian Pusat Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana penelitian yang telah diberikan.
5. Bapak Edi dari UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi atas bantuan dalam mengidentifikasi tanaman.
6. Prof. Dr Yana M. Syah dan Elvira Hermawati, M.Si. dari Jurusan Kimia ITB yang telah membantu dalam melakukan analisis menggunakan spectrometer NMR.
7. Erfan Rofianto dari Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia ITS yang telah membantu dalam melakukan analisis menggunakan spectrometer inframerah.
8. Bapak dan Ibu dosen yang telah mendidik dan menginspirasi penulis selama menempuh studi dikampus perjuangan ini.
9. Ibu, Ayah, adik beserta keluarga besar, atas dukungan, motivasi, kasih sayang serta doa yang selalu menyertai penulis dalam penyelesaian tesis ini.

10. Teman- teman mahasiswa program magister Jurusan Kimia FMIPA dan rekan seperjuangan Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis yang telah menemani penulis dalam pengerjaan tesis ini dan semangat yang telah diberikan.
11. Semua pihak yang mendukung terlaksananya penulisan naskah proposal ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa naskah tesis ini tidak lepas dari kekurangan, maka dari itu penulis terbuka terhadap saran yang membangun. Semoga naskah tesis ini memberikan manfaat bagi pembaca.

Surabaya, Juli 2016

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat	3
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
2.1 Tanaman Obat Tradisional Bali.....	5
2.1.1 <i>Centella asiatica</i> (Daun Pegagan).....	11
2.1.2 <i>Euphorbia hirta</i> (Patikan Kebo).....	11
2.1.3 <i>Pluchea indica</i> (Daun Beluntas).....	13
2.1.4 <i>Physalis angulata</i> (Daun Ciplukan)	14
2.1.5 <i>Gynura segetum</i> (Daun Dewa)	15
2.1.6 <i>Gynura procumbens</i> (Daun Sambung nyawa).....	16
2.1.7 <i>Paederia foetida</i> (Daun Ksimbukan).....	17
2.1.8 <i>Celosia argentea</i> (Daun Barococo).....	18
2.1.9 <i>Ocimum tenuiflorum</i> (Daun Tulasi).....	19
2.1.10 <i>Gigantochloa apus</i> (Daun Bambu tali).....	20
2.1.11 <i>Piper crocatum</i> (Daun Sirih merah)	20
2.1.12 <i>Cymbopogon nardus</i> (Daun Serai merah)	21
2.2 Tinjauan Antioksidan	22
2.3 Metode Pemisahan	24
2.3.1 Ekstaksi	24
2.3.2 Kromatografi.....	25
2.4 Metode Pemurnian	27
2.4.1 Kristalisasi	27
2.4.2 Uji titik leleh	28
2.5 Penentuan Struktur	28
2.5.1 Spektrofotometri Ultra Violet	28
2.5.2 Spektrofotometri Inframerah.....	28

2.5.3 Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti.....	29
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	33
3.1 Alat dan Bahan.....	33
3.1.1 Alat	33
3.1.2 Bahan	33
3.2 Prosedur Penelitian.....	34
3.2.1 Persiapan Uji Pendahuluan Skrining Antioksidan.....	34
3.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan	34
3.2.3 Ekstraksi dan Isolasi	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Skrining Antioksidan	39
4.2 Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Pare	41
4.2.1 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pare dengan Metode DPPH.....	43
4.2.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pare dengan Metode ABTS.....	44
4.3 Isolasi Senyawa Ekstrak Metanol dari Daun Pare	46
4.3.1 Ekstraksi	46
4.3.2 Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Pare	46
4.3.3 Fraksinasi Fraksi R dan Isolasi Senyawa R6.....	49
4.3.4 Fraksinasi Fraksi R5 dan Isolasi Senyawa R5d.....	53
4.4 Penentuan Struktur	56
4.4.1 Penentuan Struktur Senyawa R6b	56
4.4.2 Penentuan Struktur Senyawa R5d	59
4.5 Aktivitas Biologis Senyawa yang telah diisolasi	67
4.5.1 Aktivitas Antioksidan	67
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	71
5.1 Kesimpulan	71
5.2 Saran	71
DAFTAR PUSTAKA	73
LAMPIRAN A: SKEMA KERJA.....	81
LAMPIRAN B: SPEKTRA NMR	87

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Momordica charantia</i> (Pare)	5
Gambar 2.2 <i>Centella asiatica</i> (Daun Pegagan)	11
Gambar 2.3 <i>Euphorbia hirta</i> (Daun Patikan Kebo)	12
Gambar 2.4 <i>Pluchea indica</i> (Daun Beluntas)	13
Gambar 2.5 <i>Physalis angulata</i> (Daun Ciplukan)	14
Gambar 2.6 <i>Gynura segetum</i> (Daun Dewa)	15
Gambar 2.7 <i>Gynura procumbens</i> (Daun Sambung Nyawa)	16
Gambar 2.8 <i>Paederia foetida</i> (Daun Ksimbukan)	17
Gambar 2.9 <i>Celosia argenta</i> (Daun Barococo)	18
Gambar 2.10 <i>Ocimum tenuiflorum</i> (Daun Tulasi)	19
Gambar 2.11 <i>Gigantochloa apus</i> (Daun Bambu tali)	20
Gambar 2.12 <i>Piper crocatum</i> (Daun Sirih merah)	21
Gambar 2.13 <i>Cymbopogon nardus</i> (Daun serai merah)	22
Gambar 2.14 Reaksi antara DPPH (24) dan Antioksidan	23
Gambar 2.15 Reaksi antara ABTS (26) dengan Antioksidan	24
Gambar 4.1 Hasil Skrining Antioksidan 13 Daun Obat Tradisional Bali	39
Gambar 4.2 Kromatogram empat ekstrak daun pare	42
Gambar 4.3 Reaksi antara Radikal Kation DPPH (24) dan Asam Galat	42
Gambar 4.4 Reaksi antara Radikal Kation ABTS (26) dan Asam Galat	43
Gambar 4.5 Penghambatan radikal kation ABTS (26) oleh ekstrak daun <i>M.</i> <i>charantia</i>	44
Gambar 4.6 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS (26) Ekstrak etil asetat	45
Gambar 4.7 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS (26) Ekstrak Metanol Daun <i>M. charantia</i>	45
Gambar 4.8 Kromatogram Monitoring KLT hasil KCV ke-1 etil asetat: <i>n</i> -heksana 80%	47
Gambar 4.9 Kromatogram Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-1	48

Gambar 4.10 Kromatogram Monitoring KLT hasil KCV ke-2 dengan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana 50%	49
Gambar 4.11 Kromatogram KLT Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-2	50
Gambar 4.12 Kromatogram Hasil KCV ke-3(a) dan Kromatogram KLT fraksi Gabungan fraksi 41-53 (b).....	51
Gambar 4.13 Kromatogram KLT Tiga Eluen (a) dan Kromatogram KLT 2D (b) Senyawa R6b	52
Gambar 4.14 Kromatogram Monitoring KLT Hasil KCV ke-3 dengan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana 50%	53
Gambar 4.15 Kromatogram KLT Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-4	54
Gambar 4.16 Kromatogram KLT Hasil KKG Senyawa R5d dengan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana 60%	55
Gambar 4.17 Kromatogram KLT Tiga Eluen (a) dan Kromatogram KLT 2D (b) Senyawa R5d	55
Gambar 4. 18 Spektrum Inframerah (IR) Senyawa R6b.....	56
Gambar 4.19 Struktur 3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5,24-dien-19-al dengan nama lain Momordicine I.....	59
Gambar 4.20 Spektrum Inframerah (IR) senyawa R5d	60
Gambar 4.21 Perbandingan struktur senyawa R6b dengan senyawa R5d.....	62
Gambar 4.22 Struktur senyawa 3 β ,7 β -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien- 19-al.....	62
Gambar 4.23 Korelasi Parsial 1 Senyawa R5d	65
Gambar 4.24 Korelasi Parsial 2 Senyawa R5d	66
Gambar 4.25 Korelasi Parsial 3 Senyawa R5d	66
Gambar 4.26 Korelasi HMBC senyawa R5d (2)	67
Gambar 4. 27 Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH dari Senyawa Momordicine I (R6b), Fraksi R dan Asam galat (kontrol positif).....	68
Gambar 4. 28 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS dari Senyawa Momordicine I (R6b), Fraksi R dan Asam galat (Kontrol positif) .	69

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Pergeseran Kimia ^{13}C -NMR.....	30
Tabel 2.2 Pergeseran Kimia ^1H -NMR.....	31
Tabel 4.1 Perbandingan Aktivitas Antioksidan Dari 5 Tumbuhan.....	40
Tabel 4.2 Pengelompokan Fraksi Hasil Pemisahan KCV ke-1	48
Tabel 4.3 Penggabungan Fraksi Hasil Fraksinasi KCV ke-2	49
Tabel 4.4 Pengelompokan Fraksi Hasil KCV ke-3	51
Tabel 4.5 Penggabungan Fraksi Hasil Fraksinasi KCV ke-3	54
Tabel 4.6 Perbandingan Data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR Senyawa R6 dengan Momordicine I (3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5,24-dien-19-al)	58
Tabel 4.7 Perbandingan data senyawa R5d (2) dengan senyawa R6b (1).....	61
Tabel 4.8 Perbandingan ^{13}C -NMR Senyawa R5d dengan Senyawa 3 β ,7 β - dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al	63
Tabel 4.9 Data C-NMR, HMQC dan HMBC senyawa R5d	64

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peningkatan radikal bebas dalam tubuh dapat memicu terjadinya *stress oksidatif*. *Stress oksidatif* merupakan suatu keadaan di dalam tubuh yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas. Hal tersebut mengakibatkan senyawa antioksidan tidak dapat bekerja secara maksimal untuk mengatasi radikal bebas. Radikal bebas ini dapat menyerang membran sel melalui reaksi oksidasi asam lemak tak jenuh yang mengakibatkan penurunan fluiditas membran, sehingga merusak struktur dan fungsi membran (Tandon et al., 2004).

Banyaknya radikal bebas dalam tubuh menyebabkan penyakit degeneratif, diantaranya diabetes, jantung koroner, kanker serta penuaan. Pencegahan penyakit tersebut dapat menggunakan terapi senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya reaksi oksidasi. Terbentuknya radikal bebas dapat dicegah oleh antioksidan (Tapan, 2005). Berdasarkan sumbernya, senyawa antioksidan dikelompokkan menjadi dua jenis, yaitu senyawa antioksidan alami dan sintesis. Senyawa antioksidan sintesis mempunyai efektivitas yang tinggi, namun belum tentu aman bagi kesehatan. Antioksidan alami didapatkan dengan memanfaatkan senyawa bahan alam yang terkandung dalam tumbuhan (Newman, 2000). Beberapa sumber antioksidan alami diantaranya vitamin C (asam askorbat), vitamin E (tokoferol), vitamin A (karotenoid), beberapa polifenol meliputi flavonoid, antosianin, dan likopen.

Keanekaragaman tumbuhan di Indonesia merupakan sumber senyawa-senyawa bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Pulau Bali merupakan bagian dari pulau-pulau di Indonesia yang memiliki kearifan lokal yang sangat kuat. Bali adalah daerah tujuan wisata yang sudah dikenal dunia sejak tahun 1970. Sejak saat itu banyak wisatawan asing maupun wisatawan lokal

datang ke Bali untuk menikmati kekayaan, keindahan alam dan keunikan budayanya. Salah satu hal yang menarik adalah keindahan alamnya. Potensi hasil alam telah dimanfaatkan dalam bentuk spa dan berbagai puri (rumah) pengobatan. Masyarakat Bali dalam kesehariannya masih memanfaatkan tumbuhan sebagai sarana penyembuhan penyakit. Pemanfaatan tumbuhan sebagai media obat telah diwariskan secara turun-temurun sebagai tradisi pengobatan yang biasa disebut dengan “Usadha”. Usadha adalah ilmu pengobatan tradisional Bali, yang sumber ajarannya terdapat pada Lontar. Lontar adalah kitab yang menjadi sumber pengobatan tradisional Bali. Salah satu lontar yang terkenal adalah Lontar Rukmini Tatwa, yang mengandung sistem pengobatan, bahan obat dan cara pengobatan tradisional di Bali (Tengah, 1995).

Keanekaragaman tanaman obat di Bali merupakan sumber senyawa-senyawa bahan alam yang dapat dimanfaatkan dalam pengobatan alternatif khususnya pada penyakit- penyakit seperti kanker, diabetes, jantung koroner dan stroke. Sebuah buku yang berjudul “Rahasia Pengobatan Tradisional Bali dalam Lontar Rukmini Tatwa” telah menuliskan tentang tanaman obat di Bali serta cara pengobatannya. Rahasia pengobatan tradisional Bali dan beberapa fakta diatas menunjukkan perlunya mengungkap aktivitas antioksidan dari tanaman obat tradisional Bali.

Tiga belas tanaman obat dipilih dari hasil survei dan wawancara masyarakat di daerah Singaraja-Bali yang daunnya akan digunakan pada penelitian ini. Ketiga belas tanaman tersebut adalah daun pegagan (*Centella asiatica*), daun barokoko (*Celosia argenta*), daun sereh merah (*Cymbopogon nardus*), daun tulasi (*Ocimum tenuiflorum*), daun kesimbukan (*Paederia foetida*), daun patikan kebo (*Euphorbia hirta*), daun sirih merah (*Piper crocatum*), daun beluntas (*Plunchen indica*), daun bamboo tali (*Gigantochoa apus*), daun dewa (*Gynura segetum*), daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan daun ciplukan (*Physalis angulate*). Tanaman obat tradisional Bali diskriming aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhydrazil) dan metode ABTS (2,2’azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid).

Berdasarkan hasil skrining antioksidan dan penelusuran literatur dari 13 tanaman obat tersebut maka, daun pare (*Momordica charantia*) yang dipilih sebagai sampel pada penelitian ini. Kubola (2008) telah melaporkan aktivitas antioksidan ekstrak daun pare pada DPPH IC₅₀ sebesar 9.72 µg/mL. Uji antioksidan ABTS pada ekstrak daun pare belum pernah dilaporkan. Daun pare (*M. charantia*) selanjutnya dilakukan fraksinasi dan isolasi senyawa aktif yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan (ABTS).

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu hal yang menarik dari Bali adalah hasil alamnya. Hasil alam ini dimanfaatkan dalam bentuk spa dan puri/ griya/ rumah pengobatan. Sampai saat ini penelitian tentang tanaman obat tradisional Bali masih sedikit. Bagaimana aktivitas ekstrak metanol daun pare pada ABTS dan apakah masih ada peluang senyawa baru dan aktif sebagai antioksidan.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui data aktivitas antioksidan dari tanaman obat tradisional Bali. Hasil skrining menunjukkan daun pare memiliki potensi sebagai antioksidan. Selanjutnya dilakukan isolasi dan fraksinasi untuk memperoleh senyawa baru dan aktif sebagai antioksidan dari daun pare.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan bukti ilmiah tentang pengobatan menggunakan tanaman obat tradisional. Potensi tanaman obat Bali dapat menjadi salah satu pengobatan alternative yang diharapkan mampu menarik minat wisatawan. Penelitian ini juga diharapkan dapat dapat memajukan pariwisata Bali sehingga tidak hanya dikenal dalam bidang spa namun juga dalam pengobatan tradisionalnya. Potensi tanaman sebagai antioksidan diharapkan dapat menjadi peluang baru sebagai antioksidan alami.

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB II KAJIAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Obat Tradisional Bali

2.1.1 *Momordica charantia* (Pare)

Momordica charantia (Pare) seperti dapat dilihat pada Gambar 2.1. Pare memiliki karakteristik pahit, banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai peluruh dahak, obat cacing, obat luka, peluruh haid, pencahar, penurun panas dan mengobati diabetes melitus. Tanaman ini merupakan tanaman obat yang telah dilaporkan memiliki aktivitas hypoglikemia, sitotoksik, analgesik dan antilipid (Singh *et al*, 1998).



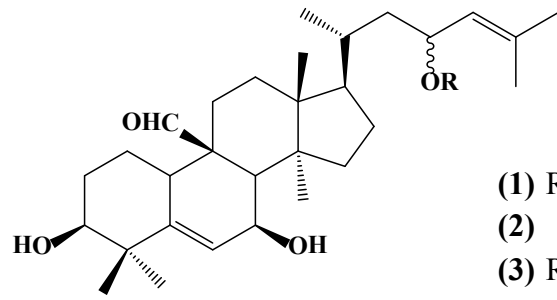
Gambar 2.1 *Momordica charantia* (Pare)

Taksonomi tumbuhan Pare

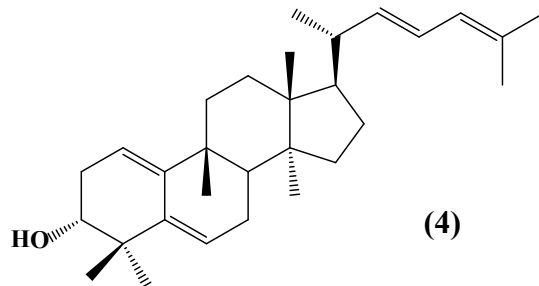
Kingdom	: <i>Plantae</i>
Devisio	: <i>Magnoliophyta</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Subclass	: <i>Dilleniidae</i>
Ordo	: <i>Violales</i>
Family	: <i>Cucurbitaceae</i>
Genus	: <i>Momordica</i>
Species	: <i>Momordica charantia</i> L

Ekstrak metanol daun *M. charantia* kaya akan kandungan phenol dan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi setelah diukur dengan metode DPPH **(23)** sebesar $9,72 \pm 0,25$ sehingga cocok digunakan sebagai antioksidan alami (Kubola *et al*, 2008). Konstituen *M. charantia* yang dapat memberikan efek antidiabet yaitu triterpen, proteid, steroid, alkaloid, lipid dan senyawa fenolat (Joseph *et al* 2013). Ekstrak daun *M. charantia* memiliki potensi sebagai antidiabet yang berpotensi sebagai obat alternative hiperglisemia dengan penghambatan penyerapan glukosa di usus (Mahomoodally *et al*, 2007). Biji *M. charantia* yang berpotensi sebagai inhibitor α -glukosidase (Matsuur *et al*, 2002). Ekstrak peroksida dari *M. charantia* juga berpotensi sebagai inhibitor α -glukosidase (He *et al*, 2014).

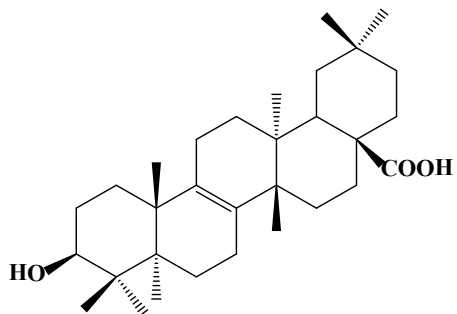
Senyawa- senyawa triterpenoid yang telah diisolasi dari tumbuhan pare yaitu momordicine I **(1)** dan momordicine II **(3)** yang diisolasi dari daun (Bing *et al*, 2008), asam 3β -hidroksimultiflora-8-en-17-oic **(4)**, cucurbita-1(10)-5,22,24-tetraen-3 α -ol **(5)** dan $5\beta,19\beta$ -epoksicucurbita-6,22,24-trien-3 α -ol **(6)** diisolasi dari batang (Liu *et al*, 2010). Senyawa- senyawa triterpenoid juga telah diisolasi dan diuji aktivitasnya sebagai antidiabetes dan antiobesitas diantaranya momordicoside Q **(7)**, momordicoside R **(8)**, momordicoside S **(9)**, momordicoside T **(10)**, momorcharaside B **(11)** dan karaviloside XI **(12)** yang diisolasi dari buah (Tan *et al*, 2008). Senyawa triterpenoid yang telah diisolasi dan diuji aktivitas antikanker yaitu (23E)- $5\beta,19$ -epoksicucurbita-6,23,25-triene-3 β -ol **(13)** dan (19R, 23E)- $5\beta,19$ -epoksi-19-ethoksicucurbita-6,23-diene-3 $\beta,25$ -diol **(14)** yang telah diisolasi dari buah (Cao *et al*, 2011). Sterol glikosida juga diisolasi dari buah pare yaitu 25β -isopropenylchole-5(6)-ene-3-O- β -D-glucopyranoside **(15)** (Peng *et al*, 2012). Jia-Qing dkk (2013) telah mengisolasi senyawa dari ekstrak etanol telah dihidrolisis yaitu cucurbita-6,22(E), 24-trien-3 β -ol-19,5 β -olide **(16)**. Li dkk (2014) telah mengisolasi senyawa golongan triterpenoid dari daun pare diantaranya yaitu momordicine IV, aglycone of momordicoside I, aglycone of momordicoside L dan karavilagenin D. Beberapa senyawa triterpenoid baru yang diisolasi dari daun dan batang oleh Zhao dkk (2014) dilaporkan diantaranya karavilagenin F **(17)**, karavilosides XII **(18)**, karavilosides XIII **(19)**, momordicines VI, VI, VII **(20,21,22)** dan kuguacin R **(23)**.



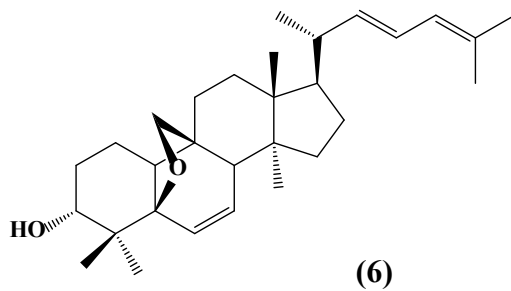
- (1) R= H
- (2)
- (3) R= Glc



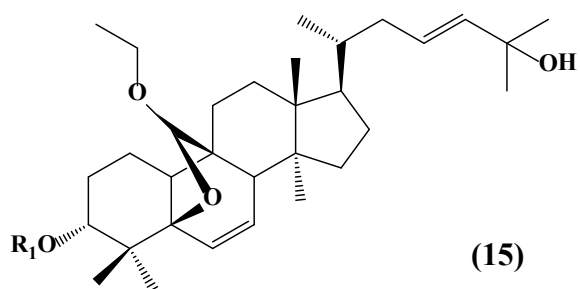
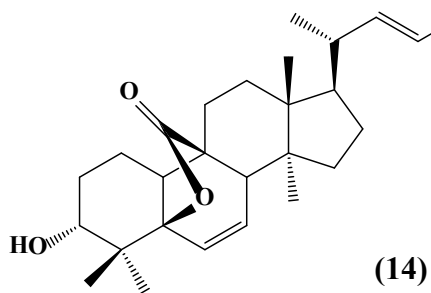
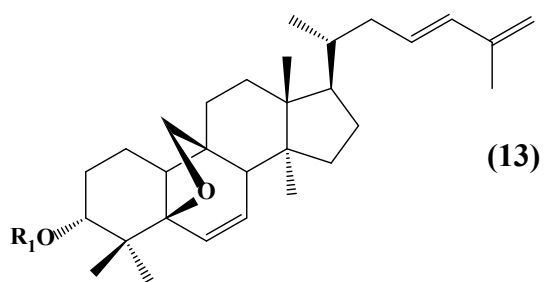
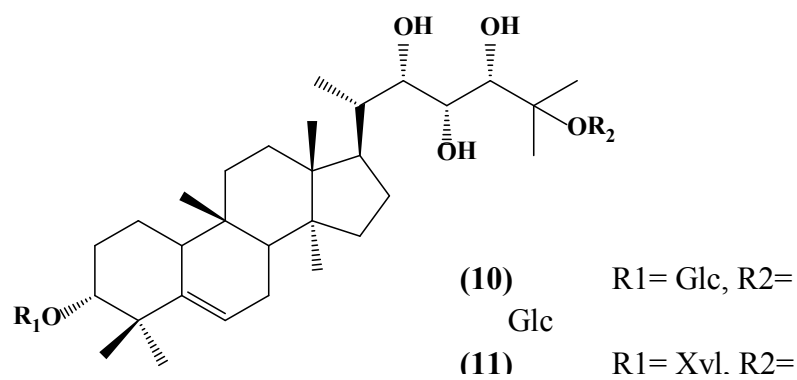
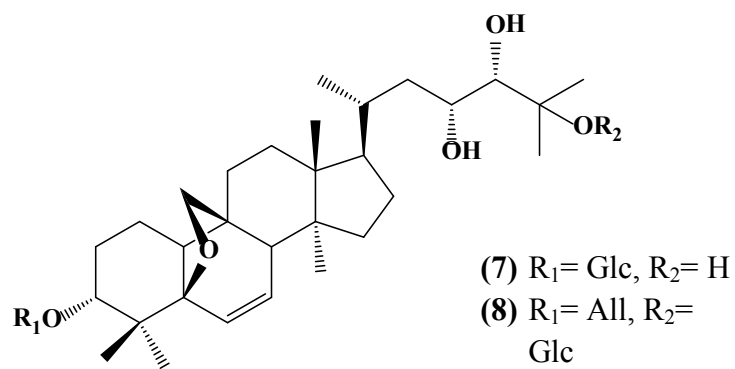
(4)

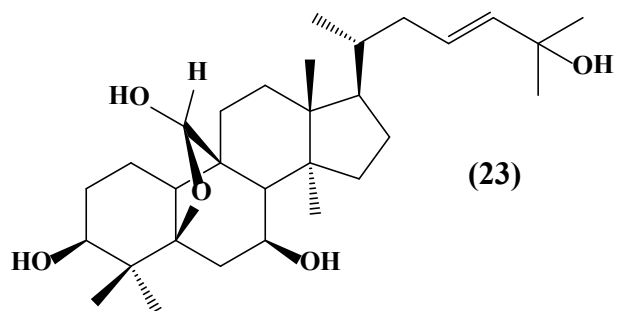
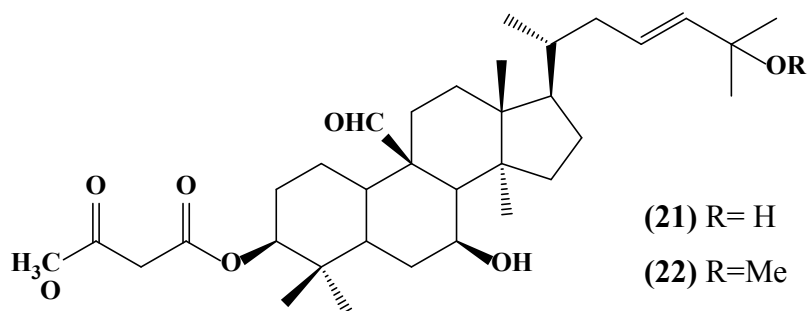
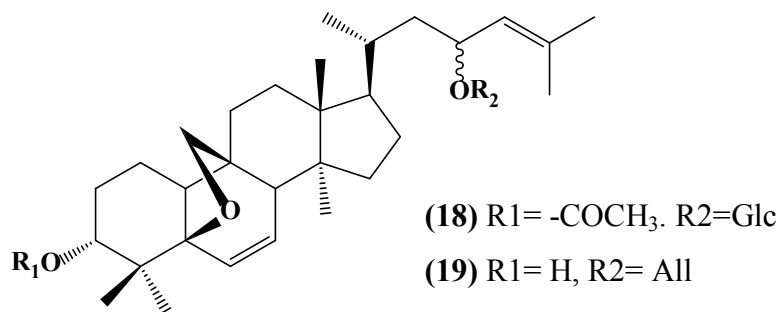
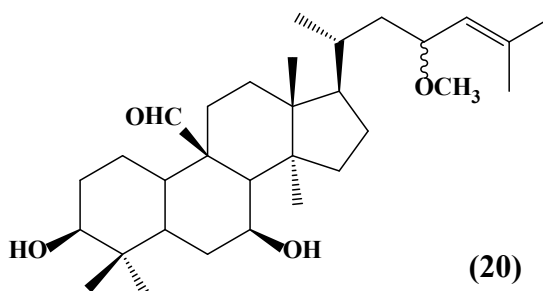
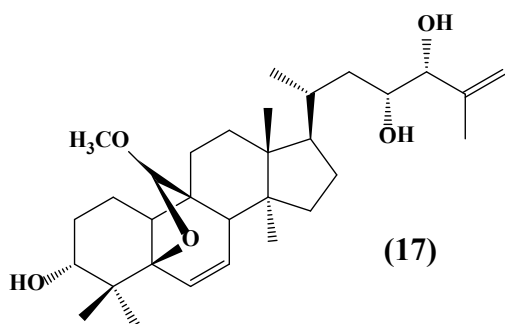
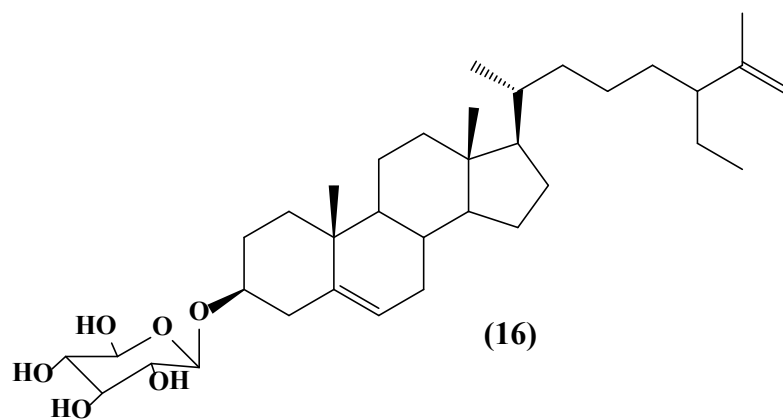


(5)



(6)





Bioaktivitas *Momordica charantia*

Aktivitas antibakteri ekstrak daun *M. charantia* telah dilakukan secara invitro pada beberapa bakteri diantaranya *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenterae*, dan *Streptomyces griseus*. Ekstrak tanaman *M. charantia* juga menunjukkan aktivitas antiprotozoal pada *Entamoeba histolytica* (Khan *et al*, 1998). Ekstrak buah juga telah dilaporkan oleh Yesilada *et al* (1999) menunjukkan aktivitas pada organisme *Helicobacter pylori* dengan kisaran antara 1,95 dan 2,50 $\mu\text{g}/\text{m}$.

Zhao *et al* (2014) melaporkan telah melakukan uji sitotoksik sel kanker pada senyawa momordicine IV, V, VI yang telah diisolasi dari ekstrak metanol batang *M. charantia*. Hasil uji menunjukkan senyawa momordicine IV dan V menunjukkan $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{mol}/\text{L}$ pada cell HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 dan SW480, sedangkan momordicine VI menunjukkan aktivitas yang lebih kecil dengan IC_{50} 16,2; 20,3; 20,5; 16,9; dan 14,3 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak buah, batang, daun *M. charantia* telah diuji dengan metode yaitu DPPH. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak daun memiliki IC_{50} yang lebih tinggi sebesar $9,72 \pm 0,25$ sedangkan batang, buah segar dan buah matang memiliki IC_{50} 17,8 \pm 0,66 ; 11,0 \pm 0,76 dan 27,6 \pm 0,23 (Kubola *et al*, 2008). Kubola (2008) juga melaporkan bahwa ekstrak daun menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi berdasarkan pada uji DPPH dan FRAP, sedangkan ekstrak buah menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi pada kapasitas total antioksidan, β -carotene-linoleate dan hidroksi radikal scavenging.

Liu *et al* (2010) telah melaporkan diisolasi dari ekstrak batang *M. charantia*. Ketiga senyawa yang berhasil diisolasi yaitu asam 3β -hidroksimultiflora-8-en-17-oic (**3**), cucurbita-1(10)-5,22,24-tetraen-3 α -ol (**4**) dan $5\beta,19\beta$ -epoksicucurbita-6,22,24-trien-3 α -ol (**5**). Ketiga senyawa tersebut menunjukkan IC_{50} 268,5 \pm 7,9 , 352 \pm 11,5 dan 458,9 \pm 13,0 μM . Penghambatan Xhantine Oxidase (XO) juga dilakukan pada ketiga senyawa tersebut dan menunjukkan IC_{50} 142,3 \pm 30,2 , 36,8 \pm 20,5 dan 124,9 \pm 8,3 μM .

2.1.2 *Centella asiatica* (Daun Pegagan)



Gambar 2.2 *Centella asiatica* (Daun Pegagan)

Centella asiatica (Gambar 2.2) yang disebut juga pegagan termasuk ke dalam famili Umbelliferae atau Apiaceae. Masyarakat Bali menyebut tanaman ini dengan nama “daun piduh” dan banyak dimanfaatkan sebagai obat disentri, penambah nafsu makan, lepra, luka, sipilis dan DM. Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak *C. asiatica* merupakan golongan triterpenoid seperti asam asiatic, asam madecassic, glikosida, asiaticosida dan medecaticosida (Zainol *et al*, 2002). Asiaticosida merupakan golongan terpenoid utama yang terdapat pada ekstrak metanol *C. asiatica* yang berpotensi menangkal radikal bebas (Padmaja *et al*, 2012).

Aktivitas antioksidan tertinggi pada *C. asiatica* terletak pada bagian daun dan akar sebanding dengan aktivitas α -tocopherol (Zainol *et al*, 2002). Aktivitas antioksidan ekstrak metanol dari *C. asiatica* yang diuji dengan menggunakan metode DPPH yaitu 0,07 μ g/mL (Anand *et al*, 2010) sedangkan pada ekstrak etanol persentase penghambatannya sebesar 61,2% (Pan *et al*, 2011). Tingginya aktivitas antioksidan dan kadar phenol pada ekstrak *C. asiatica* dapat dimanfaatkan sebagai teh herbal (Ariffin *et al*, 2011).

2.1.3 *Euphorbia hirta* (Patikan Kebo)

Euphorbia hirta yang lebih dikenal dengan “patikan kebo” yang banyak dimanfaatkan sebagai pelancar ASI, peluruh dahak, menghentikan pendarahan,

peredara kejang, radang usus besar, bronchitis, asma, gangguan penglihatan dan menstabilkan gula darah di dalam tubuh. Kandungan fitokimia pada ekstrak *E. hirta* mengandung tannin, terpenoid, alkaloid, steroid, flavonoid dan senyawa fenolat. Golongan terpenoid pada *E. hirta* ditemukan beberapa 24-hydroperoxy-cycloart-25-en-3 β -ol, 25-hydroperoxycycloart-23-en-3 β -ol, cyloartenol, lupeol, α -amyrin dan β -amyrin (Ragasa *et al*, 2013). Tanaman *E. hirta* dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 *Euphorbia hirta* (Daun Patikan Kebo)

Aktivitas antioksidan dan skrining fitokimia pada ekstrak metanol *E. hirta* memiliki kadar fenolat yang tinggi 206,17 \pm 1,95 mg GAE/g dan aktivitas antioksidan 0,803 μ g/mL yang diuji dengan menggunakan metode DPPH (23) (Bazma *et al*, 2011). Aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode DPPH (23) pada beberapa variasi pelarut maka didapatkan hasil IC₅₀ yaitu ekstrak metanol 0,58 μ g/mL, ekstrak *n*-heksana 0,38 μ g/mL dan ekstrak air 1,13 μ g/mL (Ashraf *et al*, 2014). Beberapa aktivitas *E. hirta* diantaranya sebagai antibakteri, antimikroba yang bersifat sitotoksik (Perumal *et al*, 2012).

Ekstrak etanol *E. hirta* telah diisolasi dan ditemukan 9 senyawa diantaranya scopoletin, scoparone, isoscopoletin, quercetin, isorhamnetin, pinocembrin, kaemferol, luteolin dan gallic acid (Yi *et al*, 2012).

2.1.4 *Pluchea indica* (Daun Beluntas)

Pluchea indica atau yang lebih dikenal dengan nama Beluntas cukup populer dikalangan masyarakat untuk melancarkan haid, penurun panas, bau mulut, bau badan, nyeri pada perut bagian bawah, peluruh kencing dan menurunkan gula darah (Yuniarti, 2008). Komposisi tannin pada *P. indica* pada keadaan segar yaitu 0,61% s edangkan pada keadaan kering sebesar 1,885% kandungan tannin tersebut dapat menurunkan asam glutamate pada tikus (Susetyarini, 2011). Tanaman *P. indica* dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 *Pluchea indica* (Daun Beluntas)

Aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol yang diuji dengan metode DPPH (**24**) sebesar 96 $\mu\text{mol TE/ gfw}$ dan metode ABTS (**26**) sebesar 3,75 $\mu\text{mol TE/ g fw}$ (Andarwulan *et al*, 2010). Ekstrak 50% metanol dari *P. indica* yang di isolasi dan diuji aktivitas penghambatannya terhadap α -glukosidase khususnya maltase yaitu 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (1166 μM), 4,5-di-O-caffeoylquinic acid methyl ester (208 μM), 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid methyl ester (2 μM), 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid (13 μM) dan 1,3,4,5-tetra-O-caffeoylquinic acid (11 μM) (Arsiningtyas *et al*, 2014).

Senyawa yang pertama kali diisolasi dari *P. indica* adalah glikosida (Unchiyama *et al*, 1989). Senyawa golongan flavonoid yang terdapat pada *P. indica* adalah 81% quercetin (Andarwulan *et al*, 2010). Ekstrak metanol dari *P. indica* memperlihatkan aktivitas kolagenase sebesar 78% yang diisolasi dengan menggunakan HPLC sehingga menghasilkan 3 senyawa (Ohtsuki *et al*, 2008).

2.1.5 *Physalis angulata* (Daun Ciplukan)

Physalis angulata yang biasa dikenal dengan nama “ciplukan” biasanya dimanfaatkan oleh masyarakat untuk penyembuhan patah tulang, penguat jantung, kseleo, nyeri perut, kencing nanas, kencing manis dan mengaktifkan fungsi kelenjar tubuh. Tanaman ini merupakan yang biasa tumbuh di tanah- tanah kosong seperti dipinggir selokan ataupun dilereng tepi sungai. Pada jenis *P. angulata* pada umumnya ditemukan glikosida flavonoid berupa lutoelin. Tanaman *P. angulata* dapat dilihat pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 *Physalis angulata* (Daun Ciplukan)

Ekstrak metanol daun *P. angulata* yang berupa serbuk dilarutkan dalam air berefek antidiabetes pada pemberian jangka panjang. Beberapa penelitian terdahulu juga menyebutkan bahwa *P. angulata* infusa daun dengan kadar 20% dan 40% dapat berefek menurunkan kadar glukosa darah yang dicapai pada jam ke 4. Sedangkan ekstrak daun yang dilarutkan dalam dapat menurunkan gula darah. Penemuan dari peneliti lain diketahui bahwa senyawa yang diisolasi dari daun dapat menurunkan kadar glukosa darah atas dasar stimulasi produksi insulin di pankreas sedangkan ekstrak daun dapat mempengaruhi sel beta pankreas dan dapat menyebabkan penimbunan glikogen dalam hepatosit. Ekstrak etil asetat dari *P. angulata* memiliki aktivitas antikanker dan antiinflamasi (Hseu *et al*, 2011).

Hasil isolasi dari *P. angulata* telah menghasilkan 11 senyawa namun 7 diantaranya sudah pernah dilaporkan yaitu physagulins L-O, withagulatin A, physagulin K, withaminimin, physagulin J, physagulin B, pubesenolide,

physagulin D sedangkan senyawa yang baru ditemukan yaitu physagulin L, physagulin M, physagulin N dan physagulin O (He *et al*, 2007). Sitotoksivitas dari 11 senyawa tersebut diukur dengan *human colorectal-arcinomma* (HCT-116) dan human non-cell cancer (NCI-H460) dengan menggunakan topocetan sebagai kontrol positif. Senyawa withagulatin A dan physagulin B sedangkan physagulin L dan physagulin M cukup aktif dibandingkan dengan yang lain.

2.1.6 *Gynura segetum* (Daun Dewa)



Gambar 2.6 *Gynura segetum* (Daun Dewa)

Gynura segetum (Gambar 2.6) yang biasa disebut juga “daun dewa” termasuk ke dalam family tumbuhan Asteraceae. Masyarakat biasa memanfaatkannya untuk mencegah pembekuan darah, menghentikan pendarahan, membersihkan racun dan menjaga kadar gula dalam darah. Tumbuhan ini dikenal kaya mengandung saponin, tannin, flavonoid dan minyak atsiri. Suharyani (2003) melaporkan bahwa tanaman ini dapat menyembuhkan penyakit kanker, DM dan hipertensi. Ekstrak methanol dari *G. segetum* memiliki aktivitas antioksidan yang baik terkait dengan total fenolik dan flavonoid. Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol dari *G. segetum* dengan variasi konsentrasi secara berturut- turut yaitu 100 ppm ($14,6\pm 0,4$), 200 ppm ($20,01\pm 0,4$), 300 ppm ($25,6\pm 1,0$), 400 ppm ($31,5\pm 0,15$) dan 500 ppm ($36,8\pm 0,4$) (Seow *et al*, 2011).

Beberapa senyawa yang telah diisolasi diantaranya triterpen, lignans, lumicrome, cerebroside, asam fenolat (Zhu *et al*, 2013). Pemberian perlakuan pada embrio choriollantoic dengan menggunakan ekstrak daun dan fraksinya

(100 µg/disc) memperlihatkan besarnya anti-angiogenik jika dibandingkan dengan sramin (50µg/ disc) sebagai kontrol positif (Seow *et al*, 2011). Ekstrak metanol *G. segetum* digunakan untuk penyembuhan kanker, inflamasi, diabetes, hipertensi dan penyakit kulit (Seow *et al*, 2014). Ekstrak metanol sangat menghambat pembentukan jaringan granuloma pada tikus dan berpotensi sebagai anti-inflamasi yang dimediasi melalui inhibisi pro-inflamasi cytokines dan aktivitas enzim COX-2.

2.1.7 *Gynura procumbens* (Daun Sambung nyawa)



Gambar 2.7 *Gynura procumbens* (Daun Sambung Nyawa)

Gynura procumbens dengan nama lainnya adalah “sambung nyawa” dapat dilihat pada Gambar 2.7. Masyarakat biasa memanfaatkan tanaman ini untuk menurunkan tekanan darah, ginjal, disentri, menghentikan pendarahan, mengatasi tidak datang haid dan menurunkan kadar gula dalam darah (Kaewseejan *et al*, 2015). Tumbuhan ini kaya dengan berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui antara lain alkaloida, saponin, tannin, flavonoid dan triterpenoid. Metabolit yang terdapat dalam ekstrak yang etanol 95% antara lain asam klorogenat, asam kafeat, asam vanilat, asam p-kumarat dan asam p-hidroksi benzoate. Hasil analisis kualitatif dengan metode KLT dapat dideteksi keberadaan sterol, triterpen, senyawa fenolik, polifenol dan minyak atsiri.

Aktivitas antioksidan pada *G. procumbens* sangat baik yang diakibatkan karena adanya fenol dan kandungan flavonoid Uji DPPH (24) pada ekstrak *G.*

procumbens dengan variasi pelarut hasilnya yaitu ekstrak metanol $93,5 \pm 1,22$, ekstrak etanol $57,21 \pm 1,51$ dan ekstrak air $56,84 \pm 1,37$ (Akowuah *et al*, 2002).

Efek antidiabetes oleh ekstrak air telah diberikan pada tikus yang sudah diinduksi streptozotocin. Hasilnya menunjukkan adanya penurunan glukosa darah setelah 14 hari. Ekstrak *G. procumbens* juga memberikan efek minimal pada β -cell pada pankreas. Penelitian ini membuktikan ekstrak air *G. procumbens* dapat diberikan untuk menurunkan glukosa darah. Ekstraksi daun *G. procumbens* dengan variasi etanol: air diantaranya 95%, 75%, 50%, 25% dan 0% dengan hasil variasi 25% adalah yang terbaik (Algariri *et al*, 2013). Fraksi n-butanol dari *G. procumbens* mampu menurunkan kadar gula dalam darah (Akowuah *et al*, 2002).

2.1.8 *Paederia foetida* (Daun Ksimbukan)

Paederia foetida yang biasa dikenal dengan nama “ksimbukan” atau “simbukan” biasanya secara liar di tepi hutan ataupun memang sengaja ditaman. Tanaman ini dipercaya masyarakat mampu mengobati sakit perut, perut kembung, disentri, masuk angin, nyeri lambung, herpes dan kencing manis. Skrining fitokimia pada daun *P. foetida* terdapat saponin, tannin, phenol, flavonoid, terpenoid, alkaloid, glikosida dan gula pereduksi (Upadhyaya, 2013). Pada *P. foetida* L steroid dan antraquinon tidak terdeteksi. Tanaman *P. foetida* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 *Paederia foetida* (Daun Ksimbukan)

Aktivitas antioksidan pada *P. foetida* dengan ekstrak etanol memperlihatkan penghambatan radikal bebas yang tinggi setelah diuji dengan metode DPPH (24) dan ABTS (26). Persentase inhibisi ekstrak *P. foetida* uji DPPH (24) dengan pelarut 80% e tanol yaitu 82,0%, 74,6 %, 80,3% dengan kontrol positif asam askorbat sebesar 88,2%. Pada ekstrak ABTS (26) dengan 80% pelarut yaitu 80%, 77,12%, 71,2%, 75,8% dan kontrol positive asam askorbat (Upadhyaya, 2013). Beberapa aktivitas dari ekstrak etanol *P. foetida* yaitu antilipidemik, antihiperglikemia dan antioksidan (Kumar *et al*, 2014).

Ekstrak etanol daun *P. foetida* memiliki aktivitas antimikroba pada *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Upadhyaya, 2013). Pemberian ekstrak *P. foetida* dapat meningkatkan berat badan, insulin plasma dan dapat menurunkan kolestrol dan gula darah (Kumar *et al*, 2014).

2.1.9 *Celosia argentea* (Daun Barococo)



Gambar 2.9 *Celosia argentea* (Daun Barococo)

Celosia argentea (Gambar 2.9) yang lebih dikenal dengan Barococo atau Bayem ekor kucing biasa tumbuh di piggir jalan dekat selokan atau tanah lapang yang terlantar. Tanaman ini biasa digunakan masyarakat untuk obat hipertensi, sebuah penelitian menyebutkan bahwa *C. argentea* memiliki kadar fenol yang tinggi yang telah diuji penghambatannya dengan menggunakan DPPH (24) dan ABTS (26). Sejak adanya yang melaporkan jika *C. argentea* memiliki kadar fenol

yang tinggi maka dilakukan penelitian aktivitas antioksidan pada *C. argentea* untuk mengetahui persentase penghambatannya. Skrining fitokimia dari ekstrak metanol *C. argentea* mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan senyawa fenolat (Kumar *et al*, 2014).

Aktivitas antioksidan yang diukur dengan metode DPPH (24) yang menggunakan asam askorbat sebagai standar menunjukkan adanya korelasi dengan hasil yang ditemukan sebagai efisiensi inhibisi. Aktivitas antioksidan yang diukur dengan menggunakan metode DPPH (24) sebesar 70,81% dan ABTS (26) 62,25 (Rub *et al*, 2013). Ekstrak etanol dari biji *C. argentea* telah diisolasi sehingga mendapatkan 2 senyawa diantaranya Celosin I dan Celosin II (Wu *et al*, 2013).

2.1.10 *Ocimum tenuiflorum* (Daun Tulasi)

Ocimum tenuiflorum (Gambar 2.10) yang dikenal dengan nama tulasi biasa dimanfaatkan untuk kencing manis, kencing batu dan baik untuk pencernaan. Sebuah penelitian melaporkan bahwa *O. tenuiflorum* memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Beberapa senyawa yang telah ditemukan seperti asam oleanik dan asam ursolik mengakibatkan tingginya aktivitas antioksidan terhadap peroksidasi lemak di hati. Ekstrak *O. tenuiflorum* mengandung minyak atsiri yang sangat banyak dan kaya akan senyawa fenolat dan golongan polifenol lainnya seperti flavonoid dan antosianin (Phippen dan Shimon, 2000).



Gambar 2.10 *Ocimum tenuiflorum* (Daun Tulasi)

Adanya kandungan eugenol pada ekstrak *O. tenuiflorum* berkontribusi pada aktivitas antioksidannya (Dorman *et al*, 2000). Ekstrak air daun *O. tenuiflorum* mampu menurunkan kadar gula dalam darah pada ikan yang telah diinduksi diabetes (Arenal *et al*, 2012).

2.1.11 *Gigantochloa apus* (Daun Bambu tali)

Gigantochloa apus atau masyarakat biasa menyebutnya dengan bambu tali yang dapat dilihat pada Gambar 2.11. Tanaman ini dimanfaatkan sebagai obat ginjal, membersihkan paru- paru, merangsang produksi cairan tubuh, anti toxic, kencing manis, maag dan liver. Kandungan senyawa kimia pada tumbuhan ini diantaranya saponin, asparagine, protosarsapogenin dan beta-sitosterol.



Gambar 2.11 *Gigantochloa apus* (Daun Bambu tali)

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan ekstrak metanol dari *G. apus* memperlihatkan bahwa ekstrak metanol memberikan aktivitas yang lebih baik pada *E. coli* (Mulyono *et al*, 2013). Senyawa bioaktif utama yang terdapat pada kedua ekstrak etanol dan ekstrak metanol *G. apus* adalah asam amino.

2.1.12 *Piper crocatum* (Daun Sirih merah)

Piper crocatum atau yang biasa disebut sirih merah, di Bali selain digunakan untuk persembahyangan sirih juga dimanfaatkan sebagai obat.

Beberapa penelitian menyebutkan kandungan pada *P. crocatum* adalah terpenoid, alkaloid dan flavonoid. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol *P. crocatum* diuji dengan menggunakan metode DPPH (24) dan tocopherol digunakan sebagai kontrol positif. Ekstrak etanol memperlihatkan IC_{50} sebesar 85,82 ppm dan inhibisi dari oksidasi asam lemak sebesar 80,40% (Alfarabi et al, 2010).

P. betle adalah salah satu tumbuhan yang terbukti secara ilmiah berkhasiat sebagai obat antidiabetes. Sirih merah telah diketahui memiliki potensi yang sama dengan sirih hijau (Arawbewela et al, 2006). Sebuah penelitian melaporkan *P. crocatum* mampu sebagai obat diabetes (Emrizal et al, 2014). Beberapa aktivitas *P. crocatum* yang telah ditemukan adalah sebagai antibakteri, memperbaiki pankreas yang rusak dan sebagai hepatoprotektor. Potensi *P. crocatum* sebagai aktivitas enzim glukosa oksidase (Laela et al, 2008). Dari penelitian tersebut diketahui bahwa ekstrak *P. crocatum* dengan menggunakan etanol 30% berpotensi sebagai activator enzim glukosa oksidase. Tanaman *P. crocatum* dapat dilihat pada Gambar 2.12.



Gambar 2.12 *Piper crocatum* (Daun Sirih merah)

2.1.13 *Cymbopogon nardus* (Daun Serai merah)

Cymbopogon nardus atau yang biasa disebut dengan serai merah atau serai wangi. Tanaman ini dimanfaatkan untuk mengobati penyakit kulit, bau mulut dan kanker. Beberapa penelitian melaporkan kandungan minyak atsiri pada *C. nardus*

memiliki aktivitas antimikroba, antifungi, antinociceptive dan neurobehavioral. Ekstrak metanol *C. nardus* mampu menghambat pertumbuhan dari *Aspergillus niger* (Billerbeck *et al*, 2001). Tanaman *C. nardus* dapat dilihat pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 *Cymbopogon nardus* (Daun serai merah)

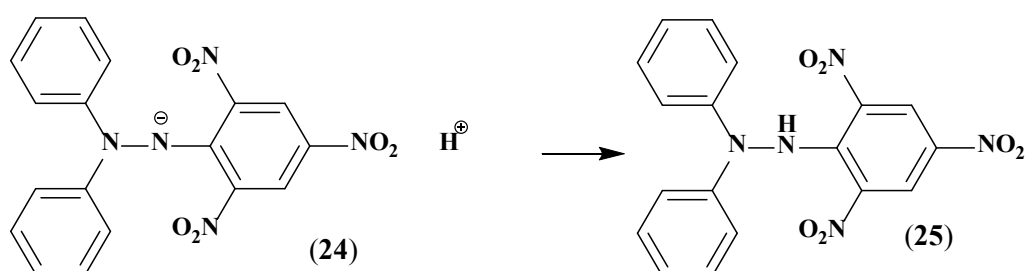
Kandungan minyak atsiri pada *C. nardus* yang dianalisis dengan GC-MS terdiri dari 16 monoterpen (79,8%), 9 seswiterpen (11,5%) dan 4 non-terpen (1,4%) (Ali *et al*, 2003). *C. nardus* juga telah dilaporkan dapat dimanfaatkan sebagai parfum, penurun panas, dan digunakan sebagai obat dalam masalah menstruasi (Abena *et al*, 2007). Komposisi kimia, sitotoksik dan antiplasmodial pada minyak atsiri dari *C. nardus* yang diteliti telah memperlihatkan antitripanosomal (Kpoviessi *et al*, 2013).

2.2 Tinjauan Antioksidan

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif sehingga dapat menyerang elektron pada molekul lain. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif. Senyawa antioksidan alami pada tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik yang berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang

memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin dan kalkan.

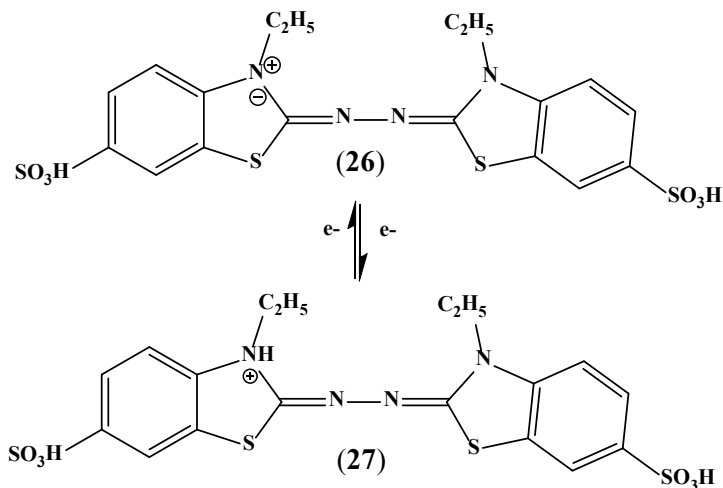
Terdapat dua metode uji antioksidan yang dapat dilakukan yaitu metode uji DPPH (**24**) (1,1-diphenil-2-picrylhydrazil) dan uji metode ABTS (**25**) (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). DPPH (**24**) dan ABTS (**26**) merupakan senyawa radikal yang relatif stabil serta keduanya telah lazim digunakan untuk analisis antioksidan pada bahan alam. Pada metode DPPH (**24**) senyawa ini akan bereaksi dengan antioksidan yang akan mendonorkan satu elektronnya sehingga membentuk senyawa lebih stabil. DPPH (**24**) radikal merupakan senyawa yang berwarna ungu yang memiliki kestabilan tinggi pada suhu ruang biasanya digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Tingginya kestabilan radikal pada DPPH (**24**) disebabkan karena adanya elektron bebas yang terdelokalisasi di seluruh bagian molekul dan tidak mudah mengalami dimerisasi (Molyneux P., 2004).



Gambar 2.14 Reaksi antara DPPH (**24**) dan Antioksidan

Gambar 2.14 menunjukkan reaksi penangkapan radikal DPPH (**24**) oleh antioksidan yang berupa donasi proton kepada radikal. Senyawa yang memungkinkan mendonasikan protonnya memiliki aktivitas penangkapan radikal cukup kuat. Senyawa tersebut adalah senyawa fenol, flavonoid, tannin, senyawa yang memiliki banyak gugus sulfida, dan alkaloid. Donasi proton menyebabkan radikal bebas DPPH (**24**) (berwarna ungu) menjadi senyawa non radikal (berwarna kuning). Dengan demikian aktivitas penangkapan radikal dapat dihitung dari peluruhan radikal DPPH (**24**). Kadar radikal DPPH (**24**) yang tersisa diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 515 nm (Munim *et al*,

2003). Kelebihan metode DPPH (24) yaitu memiliki teknis yang sederhana dan pengerjaannya relative lebih cepat sedangkan kelemahannya DPPH (24) hanya larut dalam pelarut organik terutama alkohol sehingga tidak dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan hidrofilik (Prior *et al*, 2005).



Gambar 2.15 Reaksi antara ABTS (26) dengan Antioksidan

ABTS (26) memiliki sifat sebagai radikal kation dengan pusat nitrogen yang memiliki karakteristik warna biru. Apabila ABTS (26) tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk nonradikal dan tidak berwarna. ABTS (26) merupakan metode spektrometri yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan. Prinsip dari ABTS (26) adalah dekolerasi radikal kation yang diukur pada panjang gelombang 734 nm (Zurowska *et al*, 2012). Reaksi ABTS (26) dengan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.15. Kontrol positif (trolox) memiliki IC_{50} pada DPPH (24) sebesar $3,09 \pm 0,88 \mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} pada ABTS (26) sebesar $4,11 \pm 1,36 \mu\text{g/mL}$ (Cos *et al.*, 2003).

2.3 Metode Pemisahan

2.3.1 Ekstaksi

Ekstraksi adalah suatu teknik pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tertentu (Harbone J.B., 1987). Ekstraksi dibagi menjadi dua macam, yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair (Pavia dan

Kniz, 1990). Ekstraksi cair- cair atau partisi merupakan jenis ekstraksi yang berdasarkan pada perbedaan distribusi suatu senyawa diantara dua pelarut yang tidak saling larut (Svehla G., 1990). Ekstraksi padat-cair terbagi menjadi tiga metode, yaitu maserasi, perkolasi, dan sokletasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi padat-cair dengan cara perendaman sampel dengan pelarut pada suhu kamar. Perkolasi adalah metode ekstraksi padat-cair dengan cara mengalirkan pelarut secara perlahan-lahan ke dalam suatu kolom yang berisi sampel. Sokletasi adalah teknik ekstraksi padat-cair dengan menggunakan alat soklet pada suhu titik didih pelarut yang digunakan (Pavia dan Kniz, 1990). Hasil ekstraksi berupa filtrate (zat terlarut dalam pelarut). Setelah pelarutnya diuapkan dengan menggunakan penguap vacuum putar (rotatory vacuum evaporator) akan menghasilkan ekstrak yang berbentuk padatan atau cairan (Harbone J.B., 1987).

2.3.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang sangat penting sehingga ilmuwan mampu memisahkan komponen- komponen campuran yang kompleks yang susah dilakukan dengan metode lainnya. Dalam metode pemisahan secara kromatografi sample diangkut dalam fasa gerak berupa gas, cairan atau fluida. Fasa gerak ini didorong melewati fasa diam yang tidak larut dalam fasa gerak yang ditempatkan dalam suatu kolom atau pada permukaan padatan. Kedua fasa dipilih sedemikian rupa sehingga komponen- komponen sample dapat tersebar dalam fasa diam dan fasa gerak. Komponen- komponen yang ditahan dengan kuat oleh fasa diam akan bergerak lambat dalam aliran fasa gerak, sedangkan komponen- komponen yang tertahan dengan lemah akan bergerak lebih cepat. Akibat dari perbedaan mobilitas ini, komponen- komponen sampel akan terpisah menjadi pita- pita diskrit atau zone yang dapat dianalisis baik secara kualitatif atau kuantitatif . Berikut jenis- jenis kromatografi.

a. Kromatografi kolom

Kromatografi Kolom merupakan teknik pemisahan berdasarkan pada distribusi kelarutan suatu senyawa pada fase gerak (eluen) dan daya absorpsi senyawa terhadap fase diam (adsorben) dalam suatu kolom. Senyawa-

senyawa yang belum murni akan memperlihatkan adanya pita-pita senyawa pada kolom ketika dielusi dengan suatu pelarut tertentu. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kepolaran dari masing-masing senyawa (Gritter *et al*, 1991). Kromatografi kolom adalah salah satu teknik yang digunakan untuk pemisahan dan pemurnian senyawa yang terkandung di dalam tumbuhan. Kromatografi kolom banyak digunakan karena cara kerjanya sederhana dan pemisahan yang dihasilkan cukup baik. Selain itu, pengerjaannya dapat diulang untuk mendapatkan hasil yang lebih murni.

b. Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu jenis kromatografi cair, dimana medium pemisahannya berupa lapisan silika padat setebal 0,1- 0,3 mm pada lempeng kaca, plastik atau aluminium. Zat padat yang lazim digunakan adalah alumina, gel silika, dan selulosa. KLT digunakan sebagai monitoring dari hasil pemisahan dan kemurnian suatu senyawa isolat dengan melihat noda-noda yang terdapat pada plat KLT setelah proses elusi. Dari Noda-noda tersebut dapat dihitung nilai perbandingan jarak perpindahan zat terlarut dan jarak pergerakan pelarut pada waktu yang sama. Nilai perbandingan ini disebut dengan nilai R_f (Underwood *et al*, 1986).

Kromatografi lapis tipis selain digunakan pada proses pemurnian, sering juga digunakan untuk memilih pelarut atau kombinasi pelarut dalam kromatografi kolom yang dilakukan dengan membandingkan hasil kromatografi lapis tipis beberapa eluen. Eluen memberikan hasil pemisahan terbaik digunakan sebagai eluen dalam kromatografi kolom.

c. Kromatografi Gas

Kromatografi gas merupakan salah satu kromatografi yang sampelnya diuapkan dan diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi. Sebelum memasuki kolom sampel cair terlebih dahulu diubah menjadi fase gas dengan pemanasan. Elusi terjadi karena aliran fasa gerak berupa gas inert. Berbeda dengan kromatografi lainnya, fasa gerak tidak berinteraksi dengan molekul-molekul analit, fasa gerak hanya mengangkut analit melewati kolom (Skoog *et al*, 1998).

d. Kromatografi Cair Kinerja tinggi

Kromatografi cair menggunakan fase gerak cair. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) banyak digunakan dalam teknik pemisahan analitik, karena metode ini sangat sensitive sehingga sangat baik untuk tujuan analisis kuantitatif, baik untuk untuk senyawa- senyawa tidak mudah menguap (nonvolatile) dan senyawa yang sensitive terhadap panas. Senyawa yang biasa dipisahkan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi meliputi asam- asam amino, protein, asam- asam nukleat, hidrokarbon, karbohidrat, obat-obatan, terpenoid, pestisida, antibiotika, steroid, organologam, dan berbagai senyawa anorganik (Skoog *et al*, 1998).

Dua keuntungan menggunakan KCKT adalah penggunaan pompa untuk mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi dan volume yang terkontrol yang melewati sebuah kolom. Penggunaan kromatografi ini dapat memperpendek waktu pemisahan dibandingkan dengan cara pemisahan dan pemurnian yang lain. Dengan menggunakan tekanan tinggi, adsorben yang digunakan jauh lebih sedikit dengan volume kolom yang lebih kecil. Kedua kelebihan ini akan memberikan resolusi yang lebih baik untuk senyawa- senyawa yang melewati kolom karena adanya peningkatan kontak antara senyawa dengan adsorben (Gritter *et al*, 1991).

2.4 Metode Pemurnian

2.4.1 Kristalisasi

Kristalisasi adalah metode pemurnian zat padat berdasarkan pada perbedaan kelarutan dari masing-masing komponen yang tercampur dalam pelarut. Pelarut yang digunakan bersifat tidak beraksi dengan sampel, dapat melarutkan sampel dengan sempurna pada suhu panas dan tidak dapat melarutkan sampel pada suhu kamar, titik didih pelarut harus lebih rendah dibandingkan dengan titik leleh sampel. Kristal yang terbentuk akan dipisahkan dari filtrate dengan penyaringan. Kemudian Kristal akan dicuci dengan pelarut yang dapat melarutkan pengotor (Gritter *et al*, 1991).

2.4.2 Uji titik leleh

Titik leleh kristal padat adalah suhu dimana padatan kristal tersebut mulai berubah menjadi cair di bawah tekanan 1 atmosfer. Adanya pengotor dalam sampel dapat memperlebar trayek titik lebur yang menyebabkan penurunan atau peningkatan titik leleh daripada titik leleh sebenarnya. Kristal murni memiliki titik leleh yang bernilai tetap walaupun temperatur naik secara perlahan-lahan selama penentuan, hal ini menunjukkan bahwa semua sampel meleleh dalam selang temperatur yang rendah. Dengan kata lain, suhu zat murni pada saat meleleh akan konstan, sedangkan suhu campuran pada waktu meleleh akan berubah secara bertahap (Singh *et al*, 1990).

2.5 Penentuan Struktur

2.5.1 Spektrofotometri Ultra Violet

Spektrofotometri Ultra violet merupakan suatu metode analisis senyawa yang didasarkan atas serapan molekul dengan menggunakan radiasi ultraviolet dan sinar tampak, dengan panjang gelombang antara 160 – 780 nm. Metode ini banyak digunakan dalam pengukuran kuantitatif berbagai senyawa anorganik dan organik. Sinar ultraviolet memiliki panjang gelombang antara 160 - 400nm dan sinar tampak yang biasa kita lihat memiliki rentang panjang gelombang antara 400 – 800 nm. Energi radiasi ultraviolet dan tampak dengan panjang gelombang antara 160 – 780 nm berhubungan dengan transisi elektron yang terlibat dalam ikatan pada suatu molekul. Untuk molekul organik umumnya absorpsi energi radiasi pada daerah ultraviolet-tampak menyebabkan transisi elektron yang terlibat dalam ikatan pi (π) terutama elektron pi yang terlibat dalam system konjugasi (Skoog *et al*, 1998). Transisi elektron pada senyawa organik didasarkan pada transisi $n - \pi^*$ atau $\pi - \pi^*$. Transisi ini terjadi pada daerah panjang gelombang 200 nm hingga 700 nm (Underwood *et al*, 1986).

2.5.2 Spektrofotometri Inframerah

Spektrofotometer inframerah merupakan alat yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu gugus fungsioanal serta jenis ikatan dalam suatu molekul

(Underwood *et al*, 1986). Sinar inframerah yang diserap oleh suatu molekul akan diubah menjadi energi getar molekul yang mengakibatkan terjadinya perubahan tingkat energi vibrasi molekul tersebut. Setiap ikatan yang berbeda pada suatu molekul memiliki frekuensi yang berbeda pula. Dengan demikian setiap ikatan dalam suatu molekul akan memiliki pita-pita serapan yang spesifik dalam spektrum inframerah. Letak pita pada spektra inframerah ditunjukkan dengan nilai bilangan gelombang dengan satuan per sentimeter (cm^{-1}) (Silverstein *et al*, 1998). Pita serapan dari gugus-gugus fungsional muncul daerah $1400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Puncak serapan gugus karbonil muncul di daerah antara $1700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ N-H pada $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$. dan O-H pada daerah $3000\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ (Fesenden dan Fesenden., 1986)

2.5.3 Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti

Spektroskopi resonansi magnet inti (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) merupakan metode analisis yang didasarkan atas pengukuran serapan radiasi elektromagnetik pada daerah frekwensi radio antara 4 sampai 900 MHz. Berbeda dengan serapan ultraviolet, tampak, dan inframerah, inti atom terlibat dalam proses absorpsi pada daerah frekwensi radio. Agar inti dapat menyerap energi radiasi elektromagnetik tersebut, analit harus ditempatkan dalam medan magnet (Skoog *et al*, 1998). Penyerapan gelombang radio oleh inti atom menyebabkan terjadinya resonansi. Inti yang digunakan pada spektroskopi resonansi magnetik inti adalah inti yang memiliki spin, yaitu spin $+1/2$ dan $-1/2$. Absorpsi radiasi elektromagnetik dapat terjadi apabila kedua spin memiliki energi yang berbeda. Inti yang umum digunakan untuk identifikasi senyawa organik adalah ^1H (proton) dan ^{13}C (karbon). $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi mengenai jumlah dan lingkungan setiap proton yang terdapat pada molekul, sedangkan $^{13}\text{C-NMR}$ memberikan informasi mengenai jumlah dan lingkungan karbon yang terdapat pada molekul (Silverstein *et al*, 1998).

Proton dan karbon dengan jenis dan lingkungan yang berbeda akan memberikan sinyal pada medan magnet yang berbeda. Ketergantungan posisi resonansi inti yang dihasilkan dari lingkungan molekul disebut pergeseran kimia (ppm). Pergeseran kimia suatu senyawa diukur dengan menggunakan senyawa

standar, menggunakan tetrametilsilen $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ atau sering dikenal dengan TMS. TMS dipilih sebagai standar karena bersifat inert, simetri, bersifat volatil, mudah larut dalam pelarut organik, dan protonnya sangat terlindungi jika dibandingkan dengan sebagian besar senyawa organik lainnya. Sinyal dari suatu sampel organik akan muncul pada daerah yang lebih rendah dari pada standar TMS. Inti atom yang lebih terlindungi akan menyerap radiasi pada daerah medan magnet tinggi atau berada pada keadaan *upfield*, sedangkan inti atom yang kurang terlindungi akan menyerap radiasi pada daerah medan magnet rendah atau berada pada keadaan *downfield*. Proton dan karbon dalam lingkungan yang berbeda akan memiliki efek *shielding* dan pergeseran kimia yang berbeda, penurunan elektronegativitas akan meningkatkan efek *shielding*. Hibridisasi karbon juga mempengaruhi efek *shielding* dari karbon. Nilai pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ biasanya lebih kecil dibandingkan dengan $^{13}\text{C-NMR}$ (Silverstein *et al*, 1998). Nilai pergeseran kimia dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Pergeseran Kimia $^{13}\text{C-NMR}$

Tipe Proton	Struktur	Pergeseran Kimia (ppm)
Alkil primer	$\text{R}\underline{\text{C}}\text{H}_3$	8 – 35
Alkil sekunder	$\text{R}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$	15 – 55
Alkil tersier	$\text{R}_3\underline{\text{C}}\text{H}$	20 – 60
Alkil kuartener	$\text{R}_4\underline{\text{C}}$	30 – 40
Alkuna	$\text{R}\underline{\text{C}}\equiv\underline{\text{C}}\text{H}$	2,5 – 2,7
Alkena	$\text{R}_2\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}\text{R}_2$	100 – 150
Alkil iodida	$\text{R}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{I}$	2,0 – 4,0
Alkil bromida	$\text{R}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Br}$	2,5 – 4,0
Alkil klorida	$\text{R}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$	3,0 – 4,0
Nitril	$\text{R}\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$	110 – 125
Eter	$\underline{\text{C}}-\text{O}$	40 – 80
Karbonil	$\underline{\text{C}}=\text{O}$	170 – 210

Sumber : McMurry, 1992

Tabel 2.2 Pergeseran Kimia $^1\text{H-NMR}$

Tipe Proton	Struktur	Pergeseran Kimia (ppm)
Alkil primer	RCH_3	0,7 – 1,3
Alkil sekunder	R_2CH_2	1,2 – 1,4
Alkil tersier	R_3CH	1,4 – 1,7
Alilik primer	$\text{R}_2\text{C}=\text{CRCH}_3$	1,6 – 1,9
Metil keton	RCOCH_3	2,1 – 2,4
Aromatik metil	ArCH_3	2,5 – 2,7
Alkuna	$\text{RC}\equiv\text{CH}$	2,5 – 2,7
Alkil iodida	RCH_2I	2,0 – 4,0
Alkil bromida	RCH_2Br	2,5 – 4,0
Alkil klorida	RCH_2Cl	3,0 – 4,0
Eter	ROCH_2R	3,3 – 4,0
Amina	RNH_2	1,0 – 5,0
Alkohol	R_3COH	2,5 – 5,0
Vinil	$\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$	5,0 – 6,5
Aromatik	ArH	6,5 – 8,0
Aldehida	RCHO	9,7 – 10,0
Asam karboksilat	RCOOH	11,0 – 12,0

Sumber : McMurry, 1992

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain peralatan gelas, neraca analitik CP 224S Sartorius, *hotplate stirrer* Cimarec, pengaduk magnetik, pengaduk, erlenmeyer, kaca arloji, pipet tetes, pipa kapiler, gelas ukur, botol vial, pinset, chamber, kertas saring, tabung steril, pipet mikro CAPP Autoclavable (10,0- 100,0 μ L), pipet mikro CAPP Autoclavable (100-1000 μ L), seperangkat alat destilasi, termometer, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck, 1.05554), lampu ultraviolet dengan λ 254 dan 366 nm, corong pisah, statif, *rotary evaporator* Buchi R-11, desikator, alat uji titik leleh Fischer John, satu set alat kromatografi cair vacuum (KCV), satu set alat kromatografi kolom grafitasi (KKG), spektrometer FT-IR Shimadzu 8400S, spectrometer NMR Agilent 500 MHz.

3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun Pare (*Momordica charantia* L). Pelarut organik yang digunakan yaitu *n*-heksana, diklorometana, etil asetat, metanol, larutan penampak noda 1,5 % serium sulfat dalam H₂SO₄, H₂SO₄ akuades, serta pelarut pro analitik antara lain metanol dan kloroform (CHCl₃). Bahan untuk KCV silika gel 60, plat KLT silika gel GF₂₅₄, kertas saring Whatman 42. Pelarut yang digunakan untuk uji NMR yaitu kloroform (CDCl₃) dan metanol (CD₃OD). Bahan untuk uji bioaktivitas antioksidan yaitu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2-azino-bis(asam 3-etilbenzotiazolin-6sulfonat) ABTS potassium persulfat (K₂S₂O₈), dimetilsulfoksida (DMSO), etanol 99,5% dan asam galat.

3.2 Prosedur Penelitian

3.2.1 Persiapan Uji Pendahuluan Skrining Antioksidan

Tigabelas macam tanaman obat tradisional Bali dipotong menjadi kecil dan angina-anginkan. Masing-masing sampel disiapkan 25 gram untuk diekstraksi. Uji pendahuluan digunakan untuk pemilihan tanaman yang akan dilanjutkan ketahap isolasi. Setiap sampel diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol selama 1 x 24 jam. Masing-masing ekstrak diuapkan dengan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang didapatkan dari ketigabelas tanaman tersebut kemudian di uji antioksidanya dengan metode DPPH (24) dan ABTS (26).

3.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan

3.2.2.1 Metode DPPH

Larutan sampel dibuat dengan cara melarutkan 10 mg ampel uji dilarutkan ke dalam 1 mL MeOH. Larutan sampel sebanyak 33 μ L ditambah dengan 1 mL larutan DPPH (319 ppm). Campuran divortex *mixer* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Aktivitas antioksidan bisa diamati dengan adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning dan dapat diukur absorbansinya pada λ 515 nm. Larutan blanko dibuat dengan melarutkan 1 mL DPPH ke dalam 33 μ L MeOH. Perhitungan persen penghambatan dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{Ab-As}{Ab} \times 100\%$$

Ab = Absorbansi blanko

As = Absorbansi sampel

3.2.2.2 Metode ABTS

Larutan sampel dibuat dengan cara melarutkan 10 mg sampel uji dilarutkan ke dalam 1 mL DMSO. Larutan sampel sebanyak 10 μ L ditambah dengan 1 mL larutan ABTS (99 ppm). Campuran divortex *mixer* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 menit. Aktivitas antioksidan diamati dengan cara

mengukur adanya perubahan warna larutan dari hijau menjadi kuning dan absorbansi larutan diukur pada λ 734 nm. Larutan Blanko dibuat dengan melarutkan 1 mL ABTS ke dalam 10 μ L DMSO. Perhitungan persen penghambatan dihitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{Ab-As}{Ab} \times 100\%$$

Ab = Absorbansi blanko

As = Absorbansi sampel

3.2.3 Ekstraksi dan Isolasi

3.2.3.1 Ekstraksi Daun Pare

Serbuk kering dari daun pare sebanyak 900 g dimaserasi dengan menggunakan 10 L metanol selama 3x24 jam. Hasil maserasi dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 97,494 g. Ekstrak pekat metanol tersebut dimonitoring KLT untuk pemilihan eluen pada proses fraksinasi.

3.2.3.2 Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Pare

Ekstrak metanol sebanyak 50 g difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan tinggi 10 cm dan lebar 11 cm. Eluen yang digunakan adalah diklorometana 100%, etil asetat 100% dan metanol 100%. Sistem eluen ini menggunakan prinsip increasing polarity atau kepolaran meningkat. Fraksi- fraksi yang dihasilkan dimonitoring dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 80%. Fraksi- fraksi dengan nilai R_f yang relatif sama digabungkan menjadi satu fraksi. Penggabungan fraksi ini menghasilkan fraksi gabungan sebanyak 5 fraksi yaitu fraksi P sampai fraksi T.

3.2.3.3 Fraksinasi Fraksi R dan Isolasi Senyawa R6

Fraksi R (9,386 g) difraksinasi lebih lanjut dengan menggunakan metode KCV dengan tinggi 3,5 cm dan diameter kolom 8,7 cm. Eluen yang digunakan etil asetat: *n*-heksana (5:95 \rightarrow 40:60), etil asetat 100% dan metanol 100%. Proses

fraksinasi ini menghasilkan 58 fraksi. Fraksi- fraksi hasil fraksinasi dimonitoring KLT dengan menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%. Fraksi- fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama digabungkan sehingga didapatkan 6 fraksi gabungan diantaranya yaitu fraksi R1-R6.

Subfraksi R6 (4,754 g) difraksinasi lebih lanjut dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan tinggi silika 6,3 cm dan lebar kolom 4 cm. Eluen yang digunakan etil asetat: *n*-heksana (0:100 → 30:70), etil asetat 100% dan metanol 100%. Proses fraksinasi ini menghasilkan 58 fraksi. Fraksi- fraksi hasil proses fraksinasi dimonitoring KLT dengan menggunakan etil asetat: diklorometana 60%. Fraksi yang memiliki nilai R_f yang hampir sama digabung sehingga diperoleh 3 fraksi gabungan diantaranya fraksi R6a-R6b.

Fraksi R6b dicuci dengan menggunakan pelarut *n*-heksana dan dihasilkan serbuk putih. Serbuk putih yang didapatkan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 60%. Rekrystalisasi dilakukan dengan menggunakan pelarut diklorometana panas kemudian ditambahkan dengan *n*-heksana dingin. Uji kemurnian senyawa menggunakan KLT sistem tiga eluen dengan kepolaran yang berbeda dan KLT 2D. Serbuk putih ini selanjutnya disebut dengan Senyawa R6b, dielusidasi struktur dengan menggunakan IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

3.2.3.4 Fraksinasi Fraksi R5 dan Isolasi Senyawa R5d

Fraksi R5 (0,825 g) difraksinasi lebih lanjut dengan menggunakan metode kromatografi cair vacuum (KCV) dengan tinggi 3,5 cm dan diameter kolom 4 cm. Eluen yang digunakan terdiri dari etil asetat: *n*-heksana (0:100 → 100:0), dan metanol 100%. Proses fraksinasi ini menghasilkan 48 fraksi. Fraksi- fraksi yang dihasilkan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%. Fraksi dengan nilai R_f yang hampir sama digabung sehingga didapatkan 6 fraksi gabungan yaitu R5a-R5e.

Subfraksi R5d di murnikan lebih lanjut dengan menggunakan metode kolom kromatografi grafitasi (KKG) dengan tinggi 10 cm dan lebar 0,7 cm. Eluen yang digunakan diantaranya etil asetat: *n*-heksana (0:100 → 60:40), etil asetat 100% dan metanol 100%. Proses fraksinasi ini menghasilkan 60 fraksi. Fraksi-

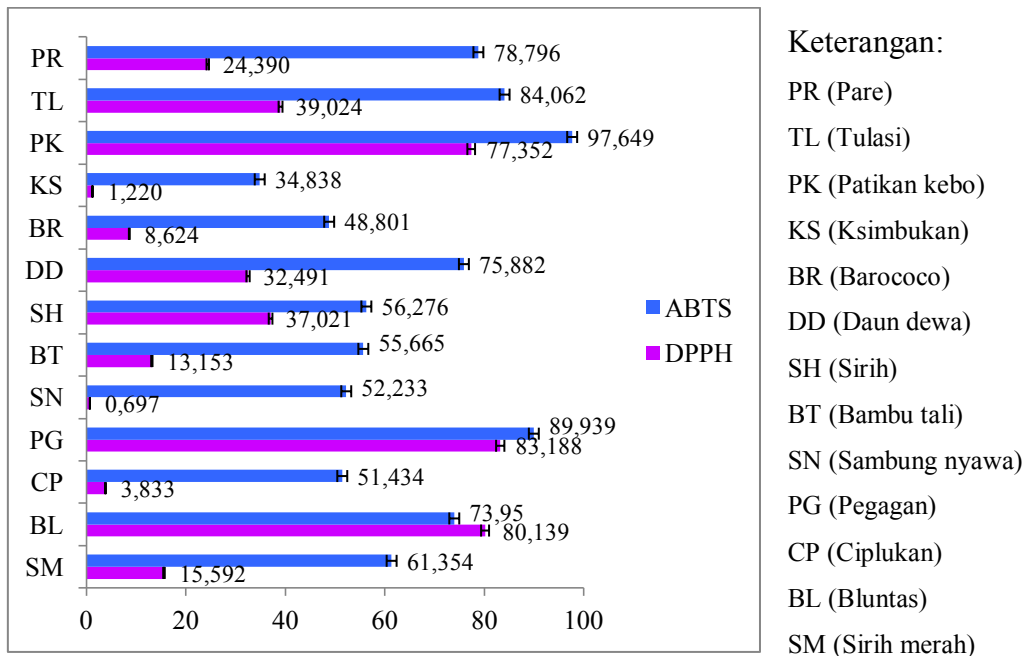
fraksi yang dihasilkan dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 60%. Fraksi dengan nilai R_f yang hampir sama digabung. Fraksi dari vial 36-56 digabung dan diuapkan sehingga mendapatkan serbuk putih kehijauan. Serbuk putih tersebut direkristalisasi dengan menggunakan diklorometana panas dan *n*-heksana dingin disimpan dalam suhu ruang. Kristal yang terbentuk berwarna putih sebanyak 40 mg. Uji kemurnian senyawa menggunakan KLT tiga eluen dan KLT 2D. Kristal putih kehijauan ini kemudian disebut dengan senyawa R5d. Struktur senyawa R5d dielusidasi dengan menggunakan IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Skrining Antioksidan

Skrining antioksidan bertujuan untuk mengetahui jenis tanaman obat tradisional Bali yang memiliki aktivitas antioksidan. Tanaman yang memiliki persen inhibisi yang tinggi akan menjadi target sampel pada penelitian ini. Skrining ini dilakukan terhadap tiga belas tanaman obat. Sebanyak 20 g dari masing- masing sampel dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol selama 1 x 24 jam. Pelarut metanol diharapkan mampu mengekstrak semua senyawa polar, semi polar dan nonpolar. Tiga belas ekstrak cair dipekatkan dengan menggunakan alat *rotatory evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan dua metode yaitu DPPH (24) dan ABTS (26). Persen inhibisi dari 13 ekstrak tanaman dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil Skrining Antioksidan 13 Daun Obat Tradisional Bali

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (26) menunjukkan bahwa terdapat 11 ekstrak tanaman yang memiliki persen inhibisi diatas 50% diantaranya ekstrak patikan kebo (97,6%), ekstrak tulasi (84,0%), ekstrak pegagan (89,9%), ekstrak pare (78,7%), e kstrak daun dewa (75,8%), e kstrak bluntas (73,9%), ekstrak sereh merah (61,3%), ekstrak sirih merah (56,2%), ekstrak bambu tali (55,6%), ekstrak sambung nyawa (52,2%) dan ekstrak ciplukan (51,4%). Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (24) menunjukkan bahwa hanya terdapat 3 ekstrak tanaman yang memiliki persen inhibisi di atas 50%, diantaranya ekstrak pegagan (83,1%), ekstrak bluntas (80,1%) dan ekstrak patikan kebo (77,3%). Hasil perbandingan kedua metode ini menjadi dasar dalam penyeleksian sampel yang akan digunakan selanjutnya. Terdapat lima dari tigabelas tumbuhan yang terpilih dan dilakukan penelusuran literatur selanjutnya. Penelusuran literatur dari kelima tumbuhan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Perbandingan Aktivitas Antioksidan Dari 5 Tumbuhan

Tumbuhan	Bagian Tumbuhan/ ekstrak	Uji Antioksidan		Refferensi
		ABTS (26)	DPPH (24)	
Patikan Kebo	Daun/ Metanol	*	72,96±0,78%	(Basma et al., 2011)
	Bunga/ Metanol	*	52,45±0,66%	
	Akar/ Metanol	*	48,59±0,97%	
	Batang/ Metanol	*	44,42±0,94%	
Pegagan	Daun/ Metanol	*	IC ₅₀ 0,07 µg/mL	(Anand et al, 2010)
	Daun/ Metanol	1,18±0,89 µg/mL	*	(Andarwulan et al, 2010)
Tulasi	Daun/ Etanol:Air	*	73%	(Deo et al., 2013)
Pare	Buah/ Air	*	IC ₅₀ 11,0	(Kubola et al, 2008)
	Batang/ Air	*	IC ₅₀ 17,8	
	Daun/ Air	*	IC ₅₀ 9,72	
Beluntas	Daun/ Etanol:Air	3,75±0,16 µmol/ g fw	96,4±15,2 µmol/ g fw	(Andarwulan et al, 2010)

*) belum dilakukan

Penelusuran literatur dari kelima tanaman tersebut (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa kelima tanaman tersebut sudah dilakukan uji antioksidan dengan metode DPPH (24). Sedangkan untuk metode ABTS (26) hanya terdapat dua tanaman yang belum dilakukan uji yaitu pegagan dan beluntas. Ketiga tanaman yaitu pare,

patikan kebo dan tulasi belum dilakukan. Ketiga tanaman tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi untuk metode DPPH (24). Tanaman pare menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kedua tanaman lainnya. Hal ini memberikan peluang untuk melakukan uji aktivitas dengan metode ABTS (26) dan mengisolasi senyawa- senyawa yang aktif sebagai antioksidan. Hasil skrining aktivitas antioksidan dan penelusuran literatur menunjukkan bahwa daun pare dapat dijadikan target dalam penelitian ini.

4.2 Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Pare

Aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak diuji sebagai dasar pemilihan pelarut untuk proses ekstraksi. Aktivitas antioksidan keempat ekstrak diuji dengan dua metode yaitu metode DPPH (24) dan ABTS (26). Metode DPPH (24) dan ABTS (26) ini merupakan metode yang paling efektif digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan pada sampel tanaman (Krishnaiah *et al*, 2011). Mekanisme penghambatan radikal dari kedua metode tersebut sangat mirip dengan antioksidan alami yang diproduksi oleh tubuh manusia. Radikal DPPH (24) dan ABTS (26) bereaksi dengan senyawa antioksidan dengan cara melepaskan hidrogen radikal. Reaksi antara radikal kation DPPH (24) dan ABTS (26) dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4. Kontrol positif pada uji antioksidan adalah asam galat (asam 3,4,5-trihidroksi benzoat).

Uji aktivitas antioksidan daun pare dilakukan terhadap empat ekstrak. Daun Pare diekstrak dengan 4 pelarut dengan kepolaran berbeda diantaranya *n*-heksana, diklorometana, etil asetat dan metanol. Proses ekstraksi ini menghasilkan empat jenis ekstrak. Keempat ekstrak tersebut dimonitoring dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen kloroform 100%. Hasil monitoring KLT (Gambar 4.2) menunjukkan perbedaan distribusi senyawa yang terbanyak terdapat pada pelarut metanol. Pelarut metanol mampu mengekstrak lebih banyak senyawa dibandingkan dengan pelarut lain.



Keterangan

Me : metanol

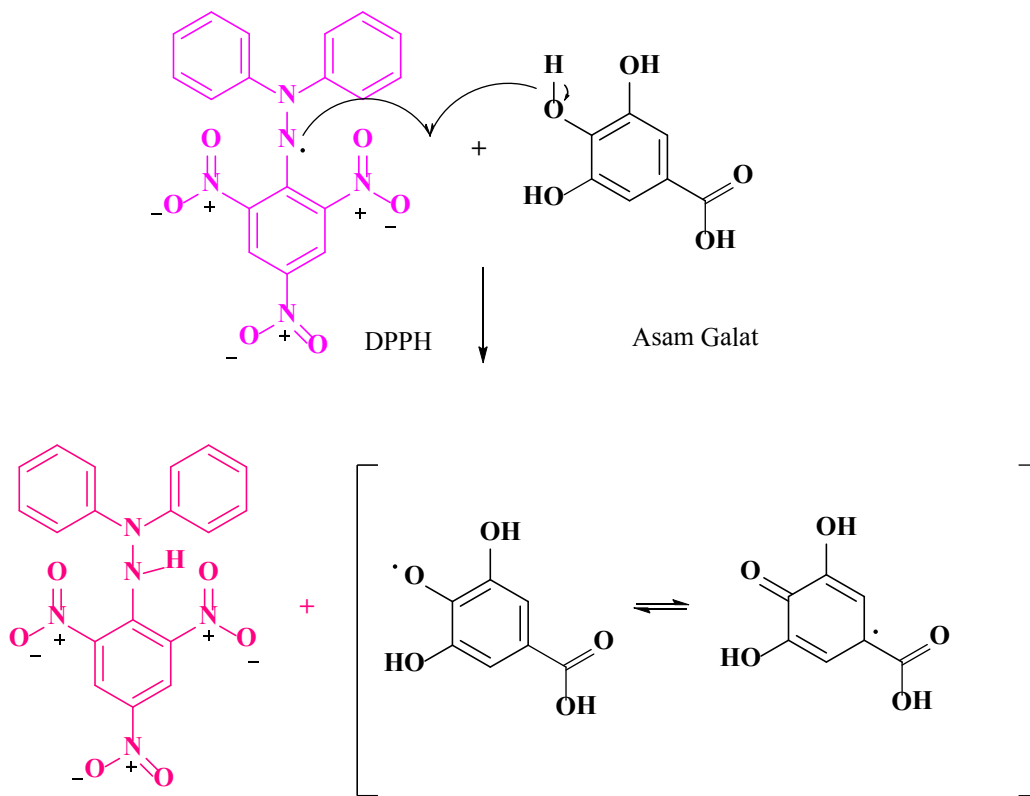
Ea : etil asetat

Mc : metilen klorida

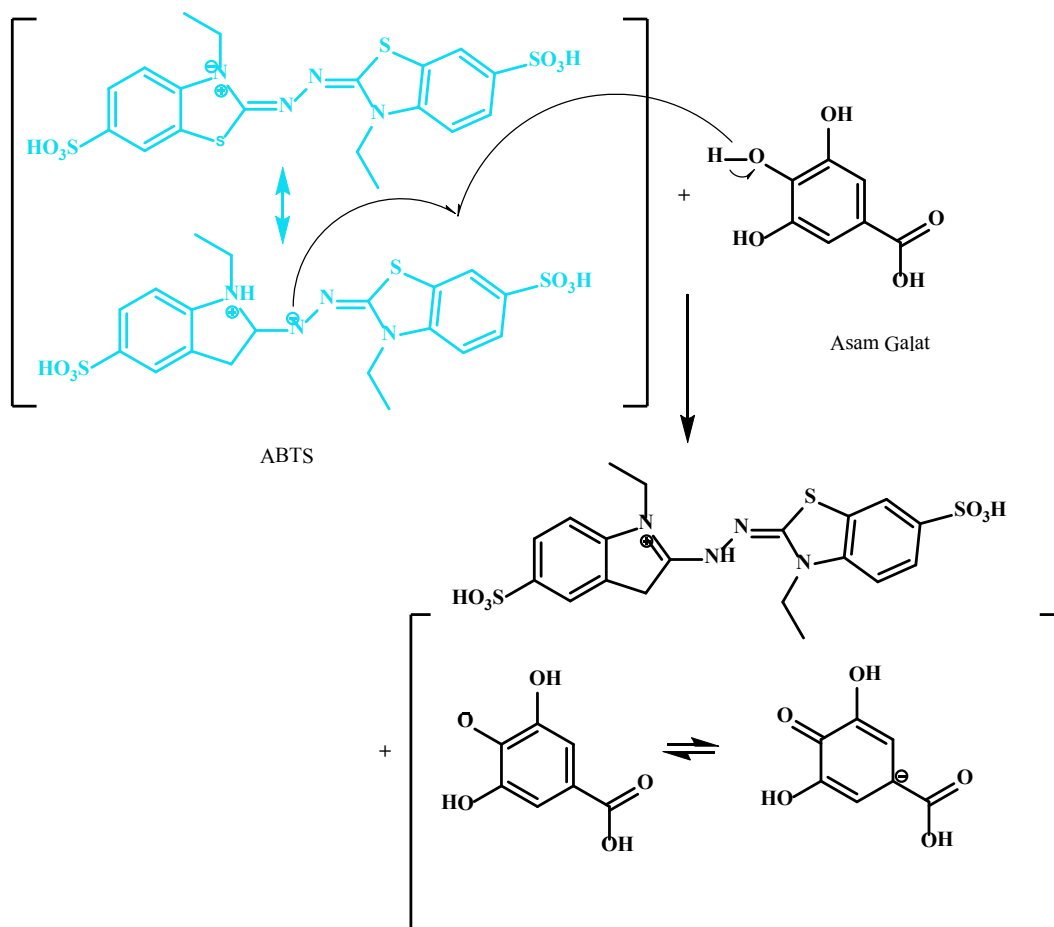
Hx : *n*-heksana

Eluen: kloroform 100%

Gambar 4.2 Kromatogram empat ekstrak daun pare



Gambar 4.3 Reaksi antara Radikal Kation DPPH (24) dan Asam Galat



Gambar 4.4 Reaksi antara Radikal Kation ABTS (**26**) dan Asam Galat

4.2.1 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pare dengan Metode DPPH

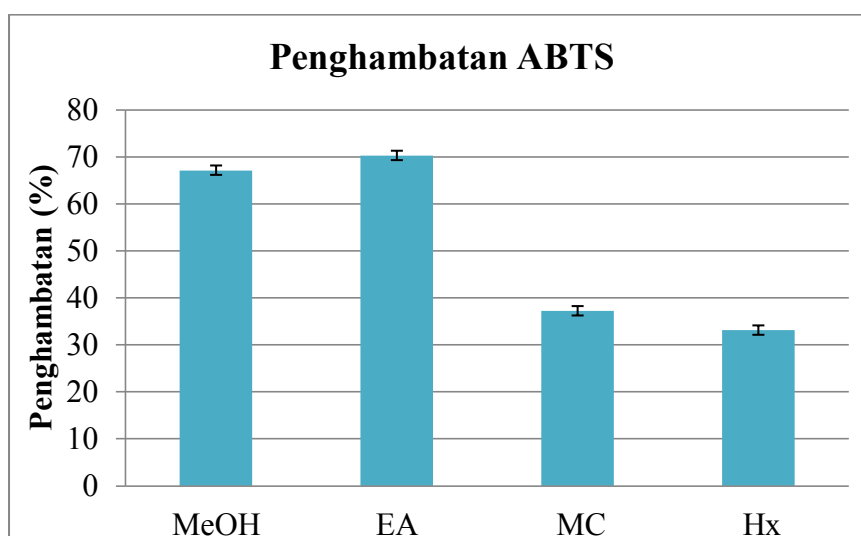
Uji aktivitas antioksidan metode DPPH (**24**) dilakukan dengan penambahan 1 mL larutan DPPH ke dalam sampel ekstrak. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Adanya reaksi antara DPPH (**24**) dan senyawa antioksidan diindikasikan dengan perubahan warna larutan ungu menjadi kuning. Perubahan warna terjadi karena adanya donor radikal hidrogen dari senyawa antioksidan terhadap radikal DPPH (**24**). Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm dengan menggunakan alat UV-Vis.

Ekstrak etil asetat menunjukkan persen inhibisi tertinggi, yaitu 65,65±0,02% pada konsentrasi 319 µg/mL dibandingkan dengan ketiga ekstrak yang lain, diantaranya ekstrak metanol 40,57±0,06%, metilen klorida

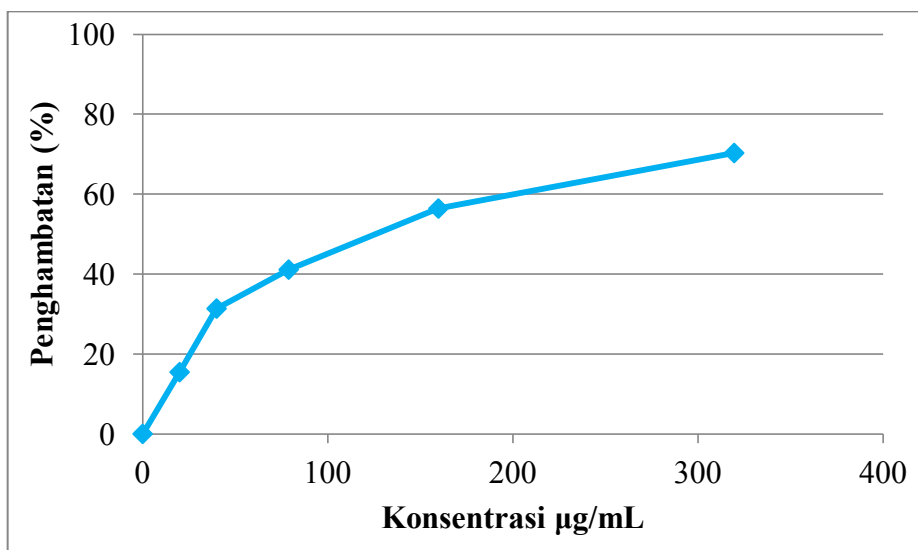
39,48±0,05% dan *n*-heksana 25,07±0,1% (Lampiran 7). Penentuan IC₅₀ dilakukan terhadap ekstrak yang memiliki nilai penghambatan diatas 50% yaitu ekstrak etil asetat. Nilai IC₅₀ adalah konsentrasi minimum sampel yang dapat menghambat radikal DPPH (24) sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ dilakukan dengan cara mengukur penghambatan diatas 50% hingga nilai penghambatan dibawah 50% dengan variasi konsentrasi. Selanjutnya, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan persentase penghambatan. Berdasarkan kurva interpolasi (Lampiran 8) antara konsentrasi dengan persentase penghambatan, maka diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat sebesar 211 µg/mL.

4.2.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pare dengan Metode ABTS

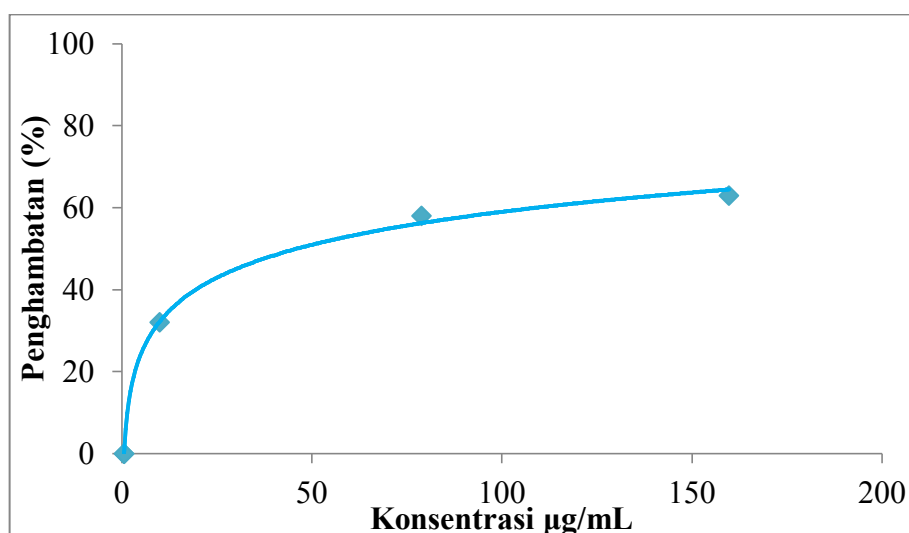
ABTS (26) merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan berdasarkan pada peredaman radikal kation ABTS (26). Radikal kation ABTS (26) dibuat dengan mereaksikan garam ABTS dengan K₂S₂O₈. Larutan berwarna biru tersebut disimpan pada ruang gelap selama 12-16 jam. Larutan ABTS diencerkan dengan menggunakan etanol hingga mencapai absorbansi 0,7±0,02 pada panjang gelombang 734 nm. Delokalisasi elektron yang terjadi akibat adanya donor elektron dari senyawa antioksidan terhadap radikal kation ABTS (26) menyebabkan terjadinya perubahan warna dari biru menjadi tidak berwarna selama reaksi berlangsung.



Gambar 4.5 Penghambatan radikal kation ABTS (26) oleh ekstrak daun *M. charantia*



Gambar 4.6 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS (26) Ekstrak etil asetat



Gambar 4.7 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS (26) Ekstrak Metanol Daun *M. charantia*

Ekstrak etil asetat (Tabel 4.5) menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi pada konsentrasi 319 µg/ml dengan nilai penghambatan 70,30±0,02% dibandingkan dengan ketiga ekstrak yang lain diantaranya metanol 67,15±0,03%, metilen klorida 37,22±0,03% dan *n*-heksana 33,11±0,03%. Selanjutnya dilakukan penentuan nilai IC₅₀ dari ekstrak yang memiliki nilai penghambatan lebih dari

50% yaitu ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol. Berdasarkan kurva interpolasi antara konsentrasi dengan persentase penghambatan diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol 27,58 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 4.6) dan ekstrak etil asetat 115,54 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 4.7). Ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} yang jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak etil asetat.

Uji aktivitas antioksidan DPPH (24) dan ABTS (26) pada keempat ekstrak daun pare menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang paling tinggi dibandingkan ekstrak lainnya termasuk ekstrak metanol, namun pada perhitungan nilai IC_{50} , ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} yang jauh lebih tinggi dari ekstrak etil asetat. Tingginya aktivitas antioksidan ekstrak metanol dapat dihubungkan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang aktif sebagai antioksidan. Berdasarkan hasil uji pendahuluan dan aktivitas antioksidan dari keempat ekstrak tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pelarut metanol dapat mengekstrak senyawa- senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, sehingga pelarut metanol dipilih sebagai pelarut dalam proses ekstraksi.

4.3 Isolasi Senyawa Ekstrak Metanol dari Daun Pare

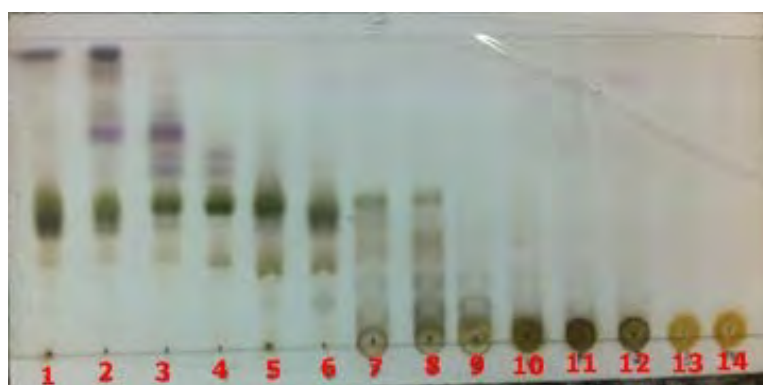
4.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu teknik pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tertentu. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi padat-cair pada suhu kamar yang disebut dengan maserasi. Metode maserasi dipilih karena sampel yang digunakan dalam jumlah yang banyak dan tidak menyebabkan dekomposisi pada senyawa isolate. Sampel kering daun *M. charantia* (900 g) dihaluskan kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol selama 3 x 24 jam. Pengambilan ekstrak dilakukan setiap 1x 24 jam selama tiga hari. Ekstrak cair dipekatkan dengan rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat sebanyak 97,494 g dengan rendemen 10,8 %.

4.3.2 Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Pare

Fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi cair vacum (KCV). Metode ini dipilih karena proses pemisahannya relatif lebih cepat dengan jumlah

sampel yang lebih banyak dan menghasilkan fraksi- fraksi dengan kandungan senyawa yang lebih sederhana. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dalam kondisi vakum dengan tinggi 5 cm dan diameter 8,7 cm. Proses fraksinasi pada penelitian ini menggunakan sistem eluen “increasing polarity”, dimana senyawa yang lebih non polar akan terelusi terlebih dahulu menggunakan pelarut non polar, selanjutnya diikuti senyawa semi polar dan terakhir senyawa polar. Eluen yang digunakan terdiri dari diklorometana 100%, etil asetat 100% dan metnaol 100%. Proses elusi dilakukan sebanyak dua kali pada sampel A (25 gram) dan B (25 gram). Pembagian sampel ini bertujuan untuk memperbanyak massa fraksi dan mengurangi massa silika kolom yang digunakan, sehingga pekerjaan lebih efisien. Hasil fraksinasi ditampung dalam botol vial 300 m L. Fraksinasi ini menghasilkan 14 fraksi yang dimonitoring dengan plat KLT (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Kromatogram Monitoring KLT hasil KCV ke-1 etil asetat:*n*-heksana 80%

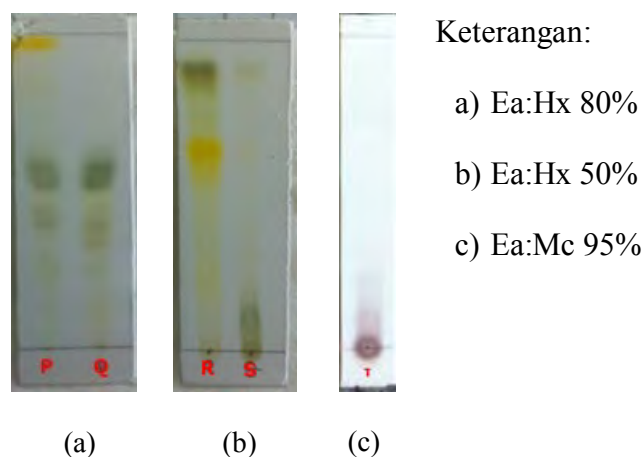
Proses monitoring bertujuan untuk menggabungkan fraksi- fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama. Fraksi yang memiliki kemiripan R_f dapat disimpulkan bahwa fraksi- fraksi tersebut memiliki kandungan senyawa yang sama pula. Hasil monitoring menunjukkan adanya beberapa noda beragam pada plat KLT. Fraksi 1-14 dimonitoring dengan menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 80%.

Penggabungan (Gambar 4.9) menghasilkan 5 fraksi gabungan yaitu fraksi P hingga fraksi Q. Fraksi gabungan ini dipekatkan dengan menggunakan *rotary*

evaporator, sehingga didapatkan besar rendemen (Tabel 4.2). Fraksi gabungan P (3,169 g) merupakan hasil penggabungan fraksi 1-3 dengan nilai Rf 0,90 c m. Fraksi gabungan Q (1,774 g) merupakan hasil penggabungan fraksi 4-6 dengan nilai Rf 0,85. Fraksi gabungan R (9,386) merupakan hasil penggabungan fraksi 7-9 dengan nilai Rf 0,66 c m. Fraksi gabungan S (1,925 g) merupakan hasil penggabungan fraksi 10-12 dengan nilai Rf 0,59. Fraksi gabungan T (17,937) merupakan hasil penggabungan fraksi 13-14 dengan nilai Rf 0,11 cm.

Tabel 4.2 Pengelompokan Fraksi Hasil Pemisahan KCV ke-1

Fraksi Gabungan	No Vial	Massa (gram)
P	1-3	3,169
Q	4-6	1,774
R	7-9	9,386
S	10-12	1,925
T	13-14	17,937
Jumlah		34,191

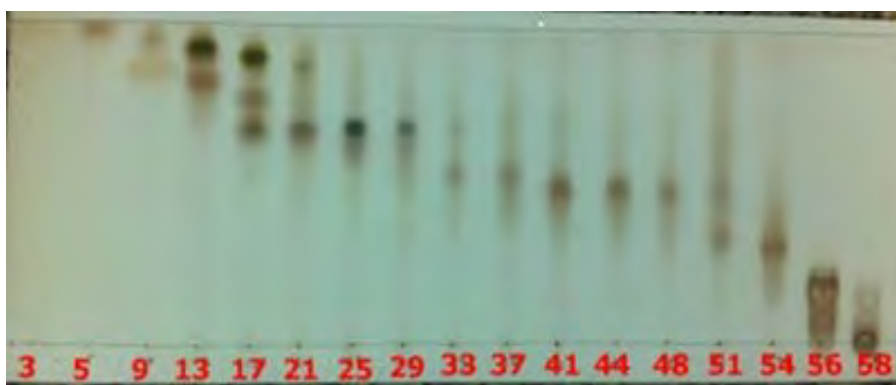


Gambar 4.9 Kromatogram Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-1

Kromatogram fraksi gabungan R menunjukkan profil noda yang beragam dan berwarna ungu, sehingga dapat diperkirakan terdapat senyawa terpenoid yang cukup banyak pada fraksi tersebut. Jumlah fraksi R yang cukup banyak 9,386 g juga memungkinkan dilakukan fraksinasi lebih lanjut.

4.3.3 Fraksinasi Fraksi R dan Isolasi Senyawa R6

Fraksi R (9,386 g) difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan menggunakan beberapa eluen. Eluen yang digunakan adalah campuran pelarut etil asetat dan *n*-heksana dengan perbandingan (5:95 → 40:60), etil asetat 100% dan metanol 100%. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dalam keadaan vakum dengan tinggi 3,5 cm dan diameter 8,7 cm. Hasil fraksinasi ditampung dalam botol vial 100 mL. Fraksinasi ini menghasilkan 58 fraksi dan dimonitoring KLT menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%. Kromatogram KLT hasil KCV ke-2 ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Kromatogram Monitoring KLT hasil KCV ke-2 dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%

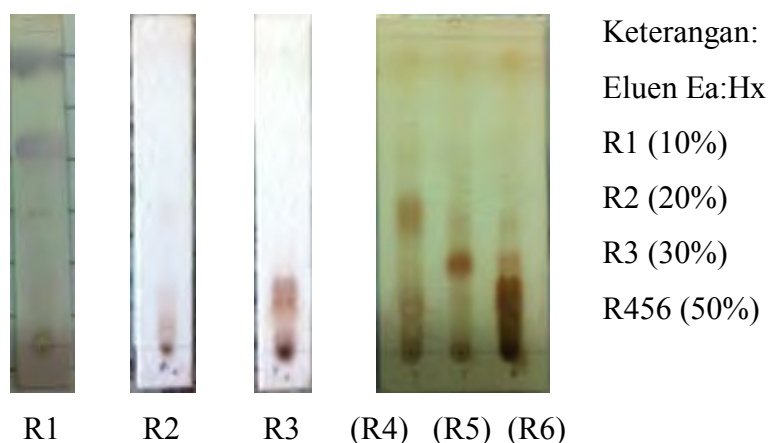
Tabel 4.3 Penggabungan Fraksi Hasil Fraksinasi KCV ke-2

Fraksi Gabungan	No Vial	Massa (gram)
R1	1-12	0,485
R2	13-24	1,779
R3	25-32	0,339
R4	33-50	0,623
R5	51-55	0,825
R6	56-58	4,754
Jumlah		8,805

Proses monitoring ini bertujuan untuk menggabungkan fraksi- fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama. Fraksi- fraksi dengan nilai R_f yang hampir sama dapat disimpulkan mengandung senyawa sama, sehingga fraksi tersebut dapat

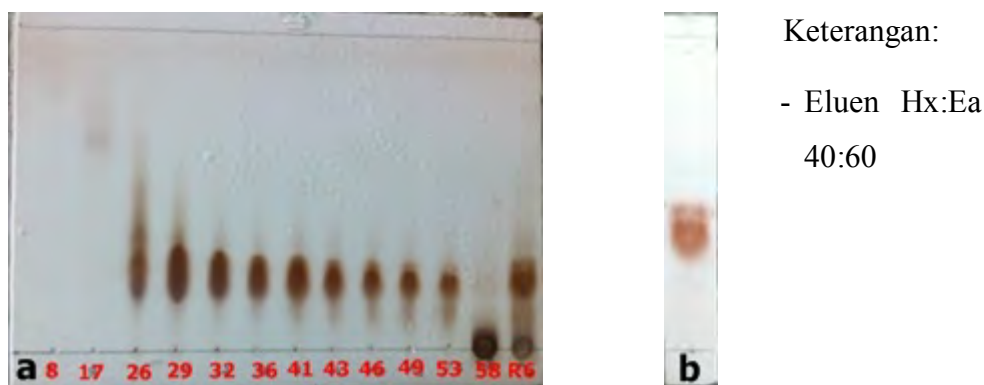
digabung. Penggabungan menghasilkan 6 fraksi gabungan yaitu fraksi R1-R6. Fraksi gabungan dipekatkan dengan menggunakan *rotatory evaporator*. Sehingga didapatkan fraksi pekat (Tabel 4.3).

Fraksi gabungan R1 (0,485 g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 1-12 dengan nilai Rf 0,90 c m. Fraksi gabungan R2 (1,779) m erupakan hasil penggabungan dari fraksi 13-24 dengan nilai Rf 0,85 c m. Fraksi gabungan R3 (0,339 g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 25-32 dengan nilai Rf 0,71 cm. Fraksi R4 (0,623 g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 33-50 dengan nilai Rf 0,59 cm. Fraksi R5 (0,825 g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 51-55 dengan nilai Rf 0,47 c m. Fraksi R6 (4,754 g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 56-58 dengan nilai Rf 0,23 cm. Kromatogram dari enam fraksi gabungan tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Kromatogram KLT Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-2

Fraksi R6 (4,754 g) adalah fraksi dengan jumlah terbanyak. Profil KLT menunjukkan terdapat noda yang memungkinkan untuk dipisahkan lebih lanjut. Fraksi R6 difraksinasi lebih lanjut dengan metode KCV. Metode KCV dipilih pada pemisahan fraksi R6 karena selain jumlah yang banyak kemungkinan masih terdapat banyak senyawa yang terdistribusi pada fraksi tersebut.



Gambar 4.12 Kromatogram Hasil KCV ke-3(a) dan Kromatogram KLT fraksi Gabungan fraksi 41-53 (b)

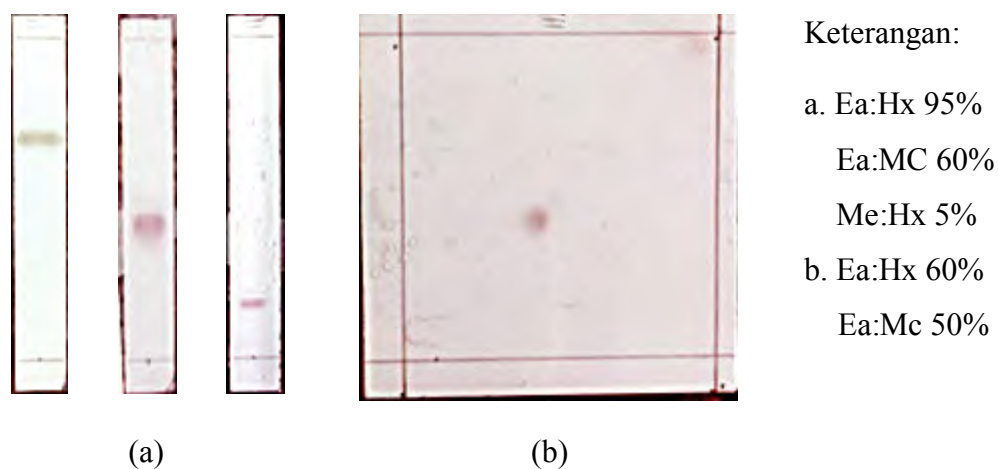
Fraksi R6 (4,754 gram) difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan sistem eluen “increasing polarity”. Eluen yang digunakan terdiri dari etil asetat: *n*-heksana (0:100 → 30:70), etil asetat 100% dan metanol 100%. Fase diam yang digunakan adalah silika gel dengan tinggi kolom 4 cm dan diameter 6,3 cm. Fraksinasi ini menghasilkan 58 fraksi, dan dimonitoring KLT menggunakan eluen etil asetat:metilen klorida 60%. Kromatogram KLT hasil KCV ke-3 ditunjukkan pada Gambar 4.12.

Tabel 4.4 Pengelompokan Fraksi Hasil KCV ke-3

Subfraksi Gabungan	No Vial	Massa (mg)
R6a	1-28	185
R6b	29-49	638
R6c	50-58	56
Jumlah		879

Subfraksi gabungan (Tabel 4.4) R6a (185 m g) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 1-28 dengan nilai R_f 0,83 cm. Subfraksi gabungan R6b (638 mg) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 29-49 dengan nilai R_f 0,32 cm. Subfraksi R6c (56 m g) merupakan hasil penggabungan antara fraksi 50-58 dengan nilai R_f 0,25 cm.

Subfraksi R6b (638 mg) berwarna putih kekuningan dengan berat 638 mg. Subfraksi ini dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 40% (Gambar 4.12). Endapan kemudian dicuci dengan *n*-heksana yang bertujuan memisahkan endapan dari pengotor yang mungkin masih tersisa. Pencucian ini menghasilkan serbuk putih yang larut pada diklorometana panas. Rekrystalisasi dilakukan dengan menggunakan diklorometana panas dan *n*-heksana. Serbuk putih dilarutkan kedalam diklorometana panas dan menambahkan *n*-heksana dingin, larutan tersebut disimpan di dalam lemari es selama 1 x 24 jam. Endapan putih yang terbentuk disaring menggunakan saring vakum. Endapan senyawa dicuci menggunakan *n*-heksana dingin. Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan KLT tiga eluen dengan kepolaran yang berbeda, yaitu etil asetat: *n*-heksana 95%, etil asetat: metilen klorida 60% dan metanol: *n*-heksana 5%. Hasil elusi ketiga eluen ini menghasilkan R_f yang berbeda yaitu 0,74, 0,52 dan 0,30. Hasil monitoring KLT (Gambar 4.13a) menunjukkan adanya noda tunggal disetiap eluen. Hasil KLT 2D juga memperlihatkan adanya noda tunggal (Gambar 4.13b).



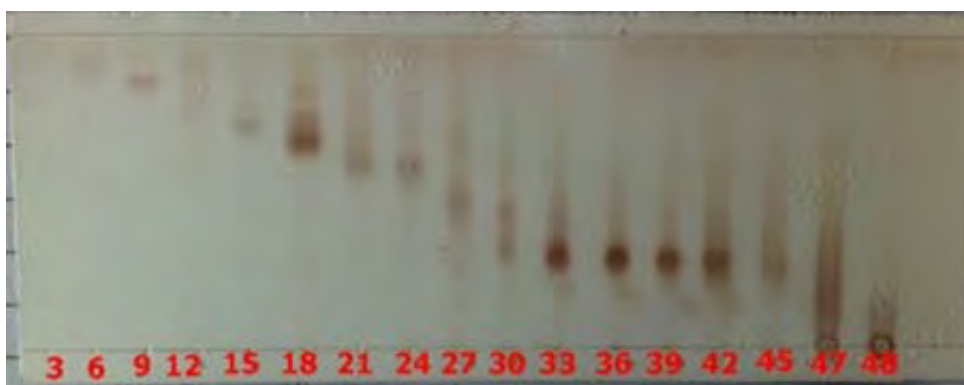
Gambar 4.13 Kromatogram KLT Tiga Eluen (a) dan Kromatogram KLT 2D (b) Senyawa R6b

Berdasarkan hasil monitoring KLT dapat disimpulkan bahwa serbuk putih tersebut merupakan senyawa tunggal dan selanjutnya disebut dengan senyawa R6b. Struktur senyawa ini dielusidasi dengan menggunakan IR, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

4.3.4 Fraksinasi Fraksi R5 dan Isolasi Senyawa R5d

Fraksi R5 (0,825 g) difraksinasi lanjut dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan menggunakan sistem peningkat kepolaran eluen. Eluen yang digunakan terdiri dari etil asetat: *n*-heksana (100:0 sampai 0:100) dan metanol 100%. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dalam keadaan vakum dengan tinggi 4 cm dan diameter 4 cm. Fraksinasi ini menghasilkan 48 fraksi dan dimonitoring dengan KLT dengan menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%.

Kromatogram KLT hasil KCV ke-3 dapat dilihat pada Gambar 4.14. Proses monitoring bertujuan untuk menggabungkan fraksi-fraksi yang memiliki nilai R_f yang sama. Hasil monitoring KLT terlihat adanya beberapa noda pada plat KLT dengan R_f yang beragam. Hasil fraksi gabungan menghasilkan 5 fraksi gabungan yaitu fraksi R5a-R5b. Fraksi gabungan R5a-R5e dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Rendemen yang didapat ditimbang. Penggabungan hasil fraksinasi KCV ini dapat dilihat pada Tabel 4.5.



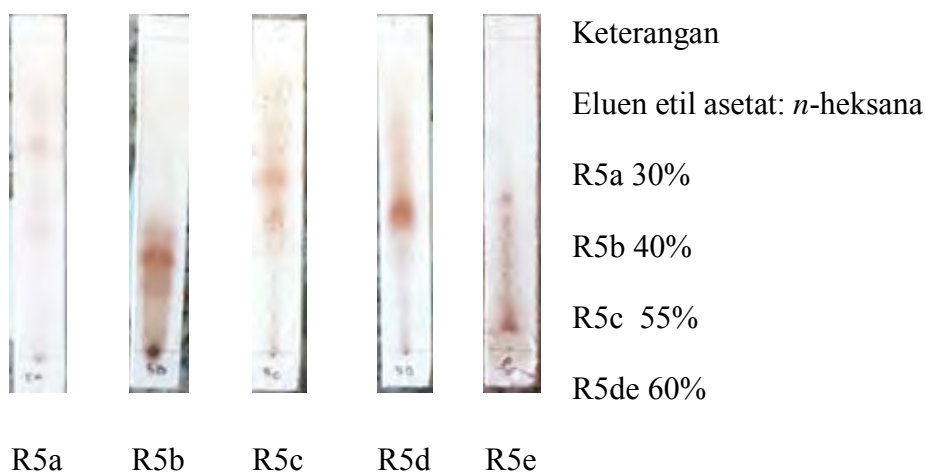
Gambar 4.14 Kromatogram Monitoring KLT Hasil KCV ke-3 dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 50%

Fraksi gabungan R5a (208,6 mg) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 1-17 dengan nilai R_f 0,90 cm. Fraksi gabungan R5b (151,2 mg) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 18-26 dengan nilai R_f 0,76 cm. Fraksi gabungan R5c (109) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 27-32 dengan nilai R_f 0,59 cm. Fraksi gabungan R5d (450,2 mg) merupakan hasil penggabungan dari fraksi 33-44 dengan nilai R_f 0,40 cm. Fraksi gabungan R5e merupakan hasil

penggabungan dari fraksi antara 45-48 dengan nilai Rf 0,28 c m. Kromatogram dari enam fraksi gabungan ini ditunjukkan pada Gambar 4.15.

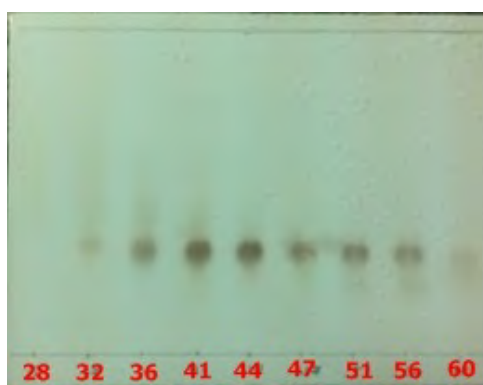
Tabel 4.5 Penggabungan Fraksi Hasil Fraksinasi KCV ke-3

Fraksi Gabungan	No Vial	Massa (mg)
R5a	1-17	208,6
R5b	18-26	151,2
R5c	27-32	109
R5d	33-44	450,2
R5e	45-48	201,3
Jumlah		1120,3



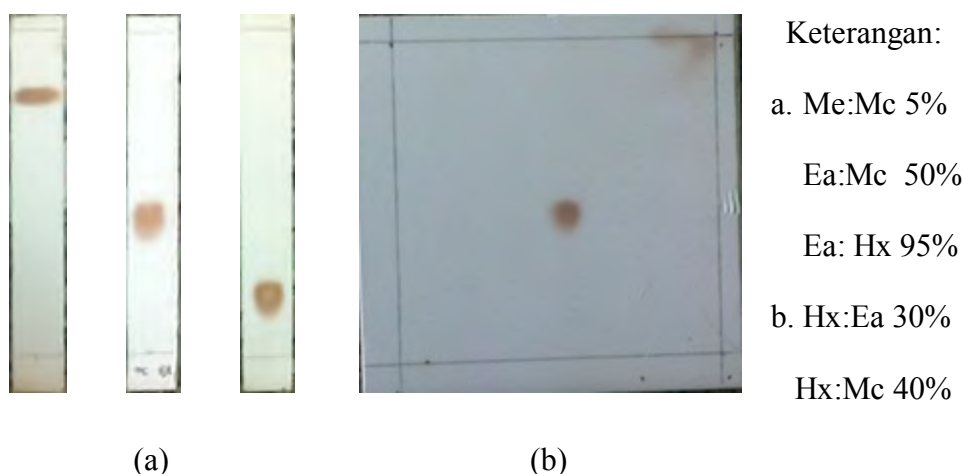
Gambar 4.15 Kromatogram KLT Fraksi Gabungan Hasil KCV ke-4

Subfraksi R5d berupa kristal hijau pekat dengan massa 450,2 mg. Subfraksi R5d di fraksinasi lebih lanjut dengan kolom kromatografi gravitasi (KKG). Metode KKG dipilih untuk jumlah sampel yang lebih sedikit dan nilai Rf yang sangat dekat. Eluen yang digunakan terdiri dari *n*-heksana: etil asetat (100:0 → 60:40), etil asetat 100% dan metanol 100%. Fase diam yang digunakan adalah silika gel. Kolom dibuat dalam keadaan basah dengan tinggi 10 cm dan diameter 2 cm. Fraksinasi ini menghasilkan 68 fraksi dan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana 60%. Kromatogram KLT hasil KKG ditunjukkan pada Gambar 4.16.



Gambar 4.16 Kromatogram KLT Hasil KKG Senyawa R5d dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 60%

Fraksi 36-56 digabung menjadi satu fraksi dengan nilai R_f 0,35 c m, diuapkan dan dimonitoring menggunakan KLT dengan eluen etil asetat: *n*-heksana 60%. Serbuk kuning kekuningan dicuci dengan menggunakan *n*-heksana yang bertujuan untuk memisahkan pengotor. Pencucian ini tersebut menghasilkan serbuk putih dan larutan berwarna kuning. Rekristalisasi dilakukan dengan cara melarutkan serbuk putih pada diklorometana panas dan menambahkan *n*-heksana pada suhu ruang. Kristal jarum yang terbentuk dan disaring sehingga didapatkan kristal 40 mg.



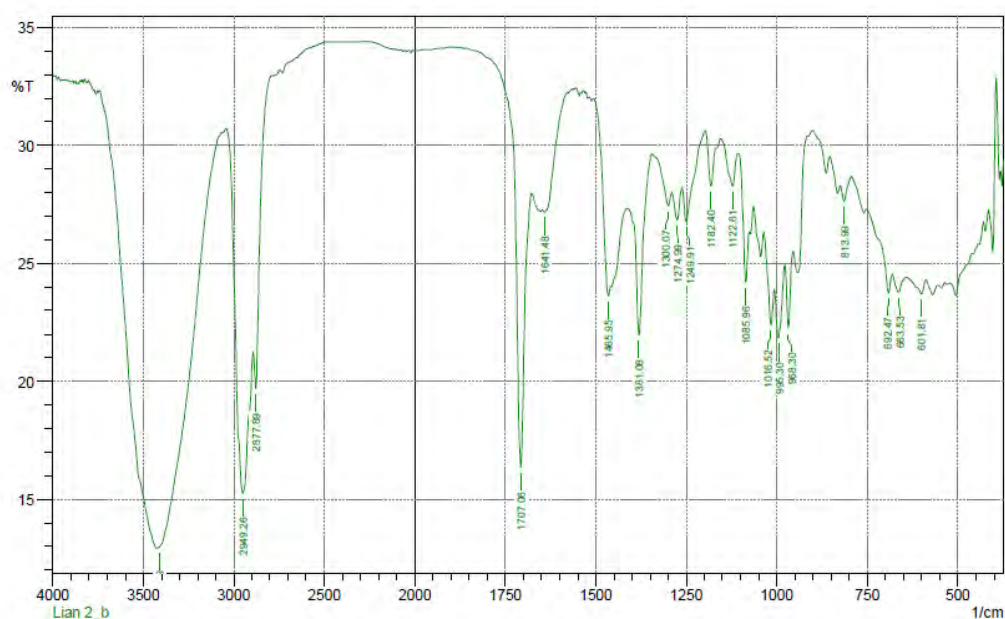
Gambar 4.17 Kromatogram KLT Tiga Eluen (a) dan Kromatogram KLT 2D (b) Senyawa R5d

Uji kemurnian dilakukan dengan menggunakan sistem uji 3 eluen dengan kepolaran yang berbeda dan KLT 2D. Tiga eluen yang digunakan yaitu

metanol:diklorometana(5%), etil asetat:diklorometana (50%) dan etil asetat: *n*-heksana (40%). Ketiga eluen (Gambar 4.17a) menunjukkan nilai R_f yang berbeda yaitu 0,80, 0,54 dan 0,3. Hasil monitoring KLT menunjukkan adanya noda tunggal pada ketiga eluen tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa kristal putih tersebut terdiri dari satu senyawa atau senyawa tersebut sudah murni, didukung juga dengan hasil KLT 2D yang memperlihatkan adanya noda tunggal seperti pada Gambar 4.17b. Berdasarkan hasil uji monitoring KLT dapat disimpulkan bahwa kristal tersebut merupakan senyawa tunggal, selanjutnya disebut dengan senyawa R5d. Elusidasi struktur senyawa R5d uji dengan menggunakan IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

4.4 Penentuan Struktur

4.4.1 Penentuan Struktur Senyawa R6b



Gambar 4. 18 Spektrum Inframerah (IR) Senyawa R6b

Senyawa R6b berupa padatan putih dengan berat 489 mg dengan titik leleh sebesar 128-129°C. Senyawa ini diperoleh dari subfraksi R6b. Analisis spektra IR dengan plat KBr pada serapan bilangan 500- 4000 cm^{-1} . Spektrum IR senyawa R6b (Gambar 4.18) menunjukkan beberapa serapan pada ν_{maks} 3412,1; 2949,2; 2877,8; 1707,0; 1641,4; 1465,9; 1381,0; 1300,0; 1274,9; 1249,9; 1182,4; 1122,6; 1085,9;

1016,5; 995,3; 968,3; 813,9; 692,4; 663,5 dan 601,8. Data spektrum IR memberikan serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi. Spektrum IR memperlihatkan serapan melebar yang khas untuk gugus fungsi OH pada panjang gelombang 3412 cm^{-1} . Hal tersebut diperkuat dengan serapan pada bilangan gelombang 1381 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan C-O. Gugus C=O bebas ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang 1707 cm^{-1} . Serapan pada bilangan gelombang 2877 cm^{-1} dan 2949 cm^{-1} merupakan serapan dari gugus C-H alifatik (sp^3) yang diperkuat dengan adanya serapan pada 1465 cm^{-1} . Adanya serapan pada bilangan gelombang 1641 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan karbon rangkap dua ($\text{C}=\text{C}\text{ sp}^2$). Analisa spektrum IR memberikan informasi bahwa senyawa R6b memiliki gugus hidroksi, ikatan rangkap ($\text{C}=\text{C}$), gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$) dan gugus alifatik ($\text{C}-\text{H}\text{ sp}^3$), ikatan ($\text{C}=\text{C}\text{ sp}^2$) bukan gugus aromatic karena tidak ada serapan yang khas pada 3100 cm^{-1} . Penentuan struktur dilanjutkan dengan menggunakan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

Pengukuran NMR menggunakan frekuensi 500 MHz dengan pelarut metanol (CD_3OD). Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ yang berupa informasi tentang lingkungan, jumlah dan jenis proton maupun karbon. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa R6b menunjukkan adanya 50 signal proton. Signal yang paling khas terlihat pada pergeseran (δ_{H}) 9,88 (1H, s) adalah signal khas dari gugus aldehid (CHO). Tiga signal khas lainnya yaitu pada pergeseran (δ_{H}) 3,55 (1H, brs), 4,00 (1H, d) dan 4,42 (1H, dt) yang menunjukkan pergeseran dari alkohol. Proton alifatik muncul pada pergeseran kimia (δ_{H}) 5,91 (1H, d, $J=5\text{ Hz}$) dan 5,16 (1H, d, $J=10\text{ Hz}$).

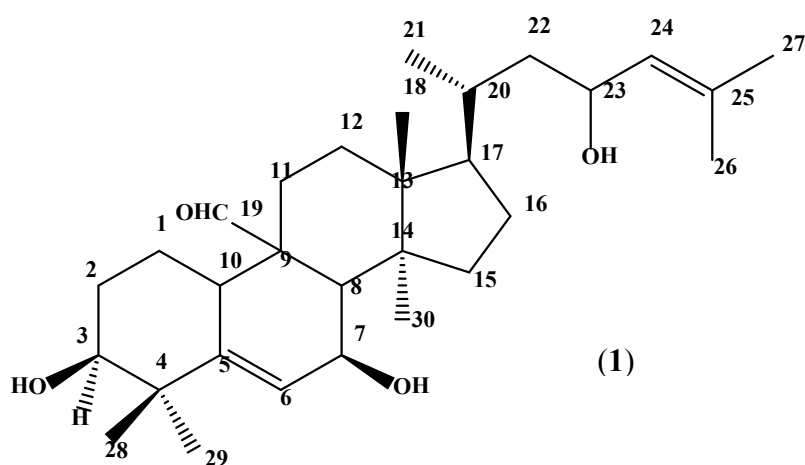
Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan adanya 30 signal atom karbon pada pergeseran kimia δ_{C} (ppm) 15,31 ; 18,13 ; 18,78 ; 19,26 ; 22,20 ; 23,30 ; 25,93 ; 26,01 ; 27,79 ; 28,66 ; 29,84 ; 30,28 ; 33,73 ; 35,60 ; 37,63 ; 42,27 ; 45,58 ; 46,74 ; 49,00 ; 50,83 ; 51,28 ; 52,05 ; 66,53 ; 66,89 ; 77,05 ; 123,95 ; 130,40 ; 133,41 ; 147,32 ; 209,72. Karbon pada pergeseran (δ_{C}) 209,72 ppm menunjukkan adanya gugus aldehid (CHO), pergeseran 147,32 ; 133,4 ; 130,4 ; 123,95 menunjukkan hibridisasi sp^2 sedangkan pada pergeseran 66,53 ; 66,89 ; 77,05 menunjukkan adanya gugus hidroksi (OH).

Berdasarkan hasil IR dan NMR dapat diketahui bahwa kemungkinan senyawa R6b yang memiliki jumlah karbon 30 memiliki gugus aldehid dan gugus hidroksi yang telah ditunjukkan pada C-NMR dan spektrum IR. Penelusuran literatur diketahui bahwa tanaman pare (*M. charantia*) telah banyak dilaporkan mengandung senyawa- senyawa triterpenoid. Senyawa R6b juga memiliki ikatan rangkap namun bukan merupakan gugus aromatik karena pada IR tidak menunjukkan serapan yang khas pada gugus aromatik.

Tabel 4.6 Perbandingan Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa R6 (C DCl_3) dengan Momordicine I (3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5,24-dien-19-al)

Posisi	Senyawa R6		Momordicine I	
	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1.		22,2		22,2
2.		30,2		30,3
3.	3,55 (1H, brs)	77,0	3,55 (1H, brs)	77,1
4.		42,2		42,3
5.		147,3		147,3
6.	5,91 (1H, d, J= 5Hz)	123,9	5,91(1H, d, J=4 Hz)	124,0
7.	4,00 (1H, d, J= 5Hz)	66,8	4,00 (1H, d, J= 5,2 Hz)	66,9
8.	2,40 (1H, m)	50,8	2,40 (1H, m)	50,8
9.		52,0		52,1
10.	2,58 (1H, d, J= 10 Hz)	37,7	2,58 (1H, m)	37,7
11.		23,3		23,3
12.		29,8		29,8
13.		46,7		46,8
14.		49,0		49,0
15.		35,6		35,6
16.		28,6		28,6
17.		51,2		51,3
18.		15,3		15,3
19.	9,88 (1H, s)	209,7	9,88 (1H, s)	209,7
20.	1,96 (1H, m)	33,7	1,98 (1H, m)	33,7
21.	1,00 (3H, d, J= 5 Hz)	19,2	1,00 (3H, d, J= 6,4 Hz)	19,3
22.		45,5		45,6
23.	4,42 (1H, dt, J= 10 Hz)	66,5	4,41 (1H, dt, J=8,8 Hz)	66,6
24.	5,16 (1H, d, J= 10 Hz)	133,4	5,16 (1H, d, J=8,8 Hz)	133,4
25.		130,4		130,5
26.	1,70 (s)	18,7	1,70 (3H, s)	18,8
27.	1,67 (s)	26,0	1,68 (3H, s)	26,0
28.		25,9		25,9
29.		27,7		27,8
30.		18,1		18,1

Hasil analisis senyawa R6b memiliki kesamaan dengan senyawa 3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5,24-dien-19-al (Momordicine I). Hal ini dapat ditunjukkan dengan perbandingan pergeseran $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa R6b dengan senyawa momordicine I seperti terlihat pada Tabel 4.6. Kemiripan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa R6b dengan senyawa Momordicine I sehingga dapat disarankan senyawa R6b hasil isolasi dari ekstrak daun *M. charantia* adalah senyawa Momordicine I. Struktur senyawa Momordicine I dapat dilihat pada Gambar 4.19.



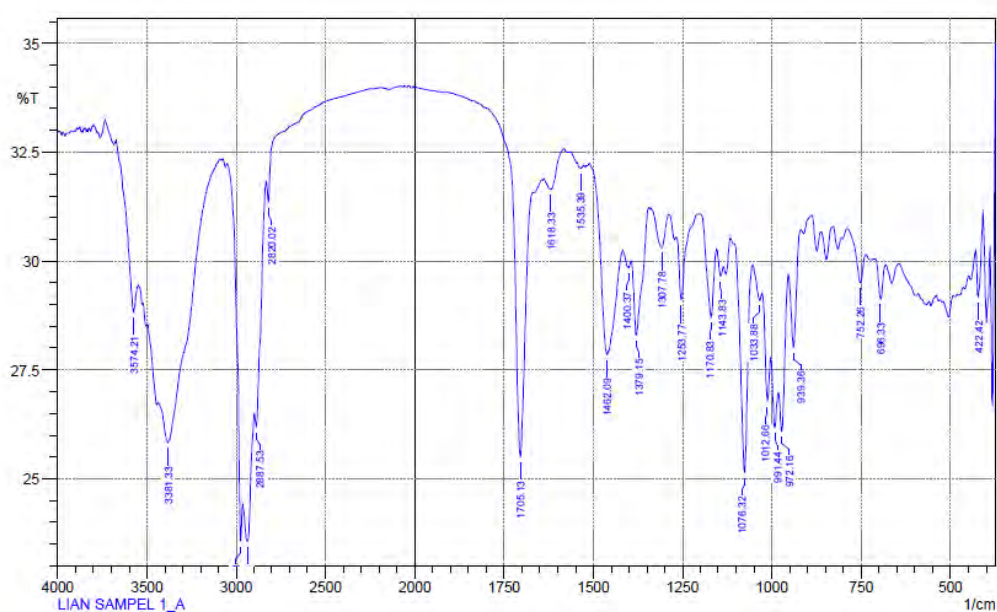
Gambar 4.19 Struktur 3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5,24-dien-19-al dengan nama lain Momordicine I

4.4.2 Penentuan Struktur Senyawa R5d

Senyawa R5d berupa kristal jarum putih dengan berat 40 mg senyawa ini diperoleh dari fraksi R5d. Titik leleh senyawa R5d adalah sebesar 160-161°C. Analisis spektra inframerah (IR) dengan menggunakan plat KBr pada serapan 500-4000 cm^{-1} . Spektrum IR senyawa R6b pada Gambar 4.17 menunjukkan beberapa serapan pada ν_{maks} 3574,2; 3381,3; 2974,3; 2937,6; 2820,02; 1705,13; 1618,3; 1535,3; 1462,0; 1307,7; 1170,8; 1076,3; 1033,8; 1012,6; 991,4; 939,3; 752,2; 696,3; dan 422,4.

Spektrum IR (Gambar 4.20) memperlihatkan serapan yang khas dari beberapa gugus fungsi diantaranya serapan pada bilangan gelombang 1705 cm^{-1}

menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O). Nilai serapan karbonil ini mengalami pergeseran pada bilangan gelombang yang lebih kecil, dibandingkan dengan serapan karbonil bebas. Serapan gugus hidroksi (OH) ditunjukkan pada bilangan gelombang 3381 cm^{-1} . Adanya gugus C-H sp^3 ditunjukkan pada bilangan gelombang 2887 cm^{-1} dan 2937 cm^{-1} . Data spektrum IR ini memberikan informasi bahwa senyawa R5d memiliki gugus hidroksi, karbonil dan gugus alkil. Penentuan struktur dilanjutkan dengan menggunakan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.



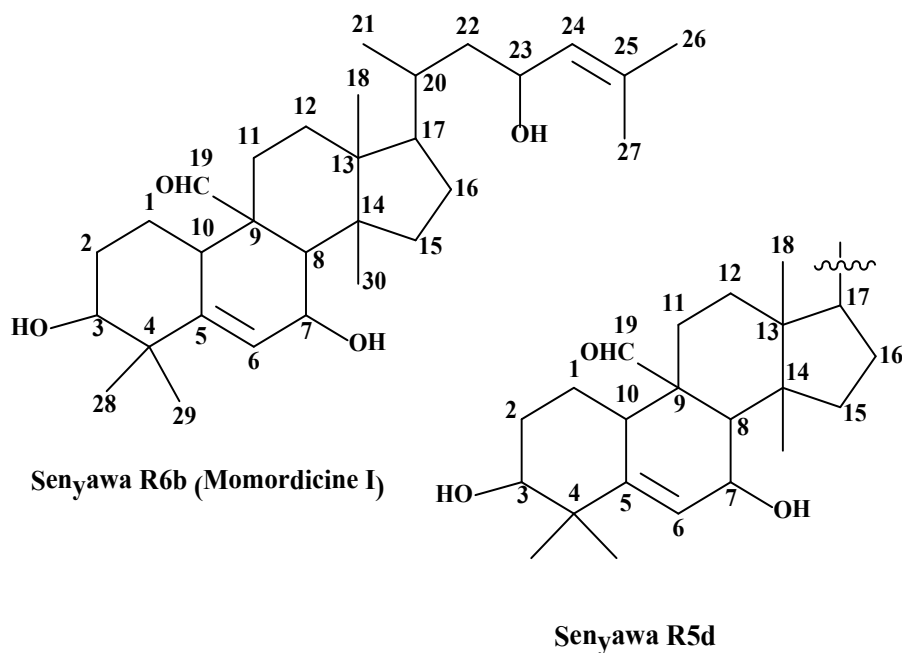
Gambar 4.20 Spektrum Inframerah (IR) senyawa R5d

Hasil $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan pergeseran kimia sebanyak 50 proton. Proton hidroksi muncul sebagai singlet pada pergeseran kimia (δ_{H}) 3,55 (s) dan 2,51 (bs). Pergeseran khas metoksi muncul pada (δ_{H}) 3,13 (2H, s). Proton khas dari gugus aldehyd (CHO) muncul pada pergeseran kimia (δ_{H}) 9,74 (1H, s). proton alifatik juga muncul pada (δ_{H}) 5,89 (1H, d), 5,49 (1H, d) dan 5,38 (1H, d). Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan adanya 30 sinyal atom karbon pada pergeseran kimia δ_{C} (ppm) 15,02 ; 18,04 ; 18,90 ; 21,33 ; 23,57 ; 25,53 ; 25,93 ; 26,24 ; 27,19 ; 27,57 ; 28,58 ; 29,12 ; 34,81 ; 36,22 ; 36,72 ; 39,49 ; 41,51 ; 45,44 ; 47,66 ; 47,94 ; 50,03 ; 50,39 ; 66,28 ; 75,01 ; 76,29 ; 123,98 ; 128,46 ; 136,98 ; 145,58 ; 208,08. Karbon

pada pergeseran (δ_C) 208,08 ppm menunjukkan adanya gugus aldehid (CHO). Karbon pada pergeseran 145,58; 136,98; 128,46; 123,98 menunjukkan adanya signal karbon dengan hibridisasi (C=C) sp^2 . Pergeseran 66,28; 76,29 menunjukkan adanya gugus alkohol (OH). Pada pergeseran 50,0 m menunjukkan adanya gugus metoksi (OCH₃) yang diperkuat oleh data ¹H-NMR dengan pergeseran sebesar δ_C 3,13. Dua puluh dua signal karbon yang lain yang terletak diantara 15,02- 50,39 menunjukkan signal karbon dengan hibridisasi sp^3 . Spektrum ¹³C-NMR senyawa R5d memiliki kemiripan dengan senyawa R6b yang dapat dilihat pada Tabel 4.7. Hasil uji C-NMR dari kedua senyawa yang telah diisolasi (R6b dan R5d) menunjukkan adanya kemiripan pada pergeseran gugus aldehid, hidroksi dan ikatan rangkap. Berikut adalah hasil perbandingan data C-NMR dari senyawa R5d dan R6b (Tabel 4.7).

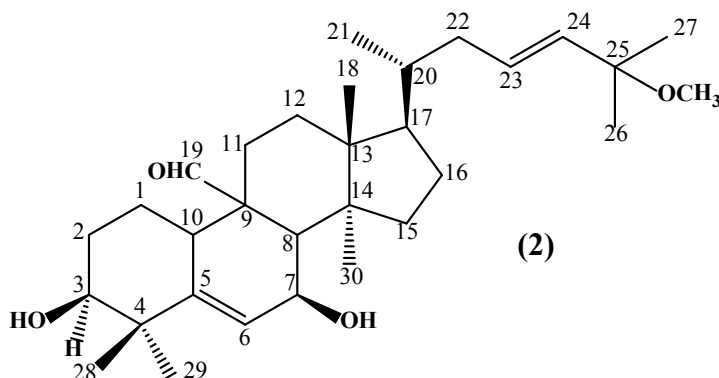
Tabel 4.7 Perbandingan data senyawa R5d (2) dengan senyawa R6b (1)

¹³ C-NMR		
No	Senyawa R6b (1)	Senyawa R5d (2)
1.	22,2	21,3
2.	30,2	28,5
3.	77,0	76,2
4.	40,2	41,5
5.	147,3	145,5
6.	124,0	123,9
7.	66,8	66,2
8.	50,8	50,0
9.	52,0	50,3
10.	37,7	36,7
11.	23,3	23,4
12.	29,8	29,1
13.	46,7	45,4
14.	49,0	47,6
15.	35,5	34,8
16.	28,6	27,2
17.	51,2	47,9
18.	15,3	15,0
19.	209,7	208,0



Gambar 4.21 Perbandingan struktur senyawa R6b dengan senyawa R5d

Kemiripan data $^{13}\text{C-NMR}$ (Tabel 4.8) menunjukkan bahwa senyawa R5d kemungkinan memiliki struktur dasar yang sama dengan senyawa R6b berupa senyawa triterpenoid pada Gambar 4.22. Penelusuran literatur menunjukkan jumlah dan jenis karbon senyawa R5d memiliki kemiripan dengan senyawa $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al (Tabel 4.8). Berdasarkan data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ jumlah karbon dan proton pada senyawa R5d memiliki kemiripan data dengan senyawa $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al (2) (Fatope et al, 1990).



Gambar 4.22 Struktur senyawa $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al

Tabel 4.8 Perbandingan ^{13}C -NMR Senyawa R5d dengan Senyawa $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al

^{13}C -NMR		
Posisi C	Senyawa R5d	Senyawa $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al
1.	21,3	21,7
2.	28,5	29,9
3.	76,2	75,6
4.	41,5	41,7
5.	145,5	145,7
6.	123,9	124,2
7.	66,2	65,7
8.	50,0	50,5
9.	50,3	50,6
10.	36,7	36,8
11.	23,4	22,7
12.	29,1	29,4
13.	45,4	45,7
14.	47,6	48,2
15.	34,8	34,9
16.	27,2	27,7
17.	47,9	50,1
18.	15,0	15,0
19.	208,0	207,7
20.	36,2	36,3
21.	18,9	18,9
22.	39,4	39,7
23.	136,9	137,6
24.	128,4	128,4
25.	75	74,8
26.	26,2	26,4
27.	25,5	26,0
28.	25,9	26,2
29.	27,1	27,3
30.	18,0	18,1
OCH ₃	50,0	50,2

Kemiripan data struktur juga didukung oleh hasil NMR 2D yaitu *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC) dan *Homonuclear Multiple Quantum Correlation* (HMQC). Korelasi HMBC dapat memberikan informasi korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon tetangga, sehingga dapat memberikan keputusan posisi atom hidrogen dan karbon yang lebih presisi

(Silverstain *et al*, 2005). Pengukuran HMQC digunakan untuk mengetahui korelasi karbon dengan proton yang dapat terikat langsung oleh karbon tersebut. Korelasi antara data HMQC dan HMBC senyawa R5d dapat dilihat pada Tabel 4.9.

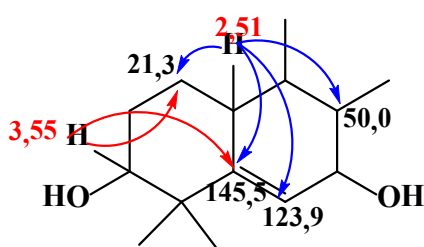
Tabel 4.9 Data C-NMR, HMQC dan HMBC senyawa R5d

Posisi C	C-NMR	HMQC	HMBC
3	76,2	3,55	21,3 (C-1) , 145,5 (C-5)
7	66,2	2,51	50,0 (C-8),21,33 (C-1), 123,9 (C-6), 145,5 (C-5)
25	75,0	-	
6	123,9	5,89	36,7 (C-10), 41,5 (C-4), 47,6 (C-17), 66,2 (C-7)
23	128,4	5,47	136,9 (C-24), 39,49 (C- 22), 75,0 (C-25)
24	136,9	5,39 ; 5,36	128,4 (C-23), 25,5 (C- 26), 39,4 (C-22), 75,0 (C-25)
5	145,5	-	
8	50,0	1,47	45,4 (C-13) ,18,04(C- 30) 27,5 (C-16)
9	50,3	-	
10	36,7	2,51	50,0 (C-8), 21,3(C-1), 123,9 (C-6), 145,5(C-5)
14	47,9	2,06	34,8(C-20), 45,4(C-13), 47,6(C-17)
17	47,6	-	
13	45,4	-	
4	41,5	-	
22	39,4	2,16 ; 1,76	36,2 (C-15) ,18,9(C-21) ,136,9(C-24)
15	36,2	1,55	
20	34,8	1,47 ; 1,50	45,5 (C-13) , 47,6 (C- 17) 27,5(C-16)
12	29,1	1,67 ; 1,66	15,0(C-18), 23,5(C-11)
2	28,5	1,60 ; 1,63	
16	27,5	1,36 ; 1,34	45,4(C-13), 47,6 (C- 17), 50,0 (C-8)
29	27,1	1,04	41,5(C-4), 145,5(C-5), 76,2(C-3)
27	26,2	1,23	-
28	25,9	1,23	41,5(C-13)
26	25,5	1,22	26,2(C-27)

Lanjutan Tabel 4.9 Data ^{13}C -NMR, HMQC dan HMBC senyawa R5d

Posisi C	C-NMR	HMQC	HMBC
11	23,5	1,55 ; 2,25	29,1(C-12)
21	18,9	0,89	36,2(C-15), 39,4(C-22)
30	18,0	0,72	45,4 (C-13) 47,6 (C-17) 34,8(C-20)
18	15,0	0,87	47,6(C-17), 45,4(C-13), 50,0(C-8)
19	208,0	9,74	
OCH ₃	50,0	3,13	75,0 (C-25)

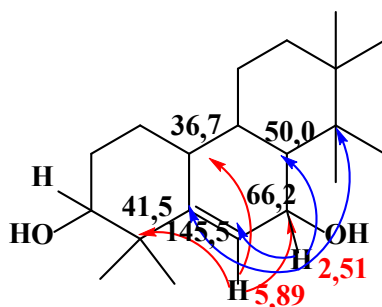
Berdasarkan hasil uji HMQC dapat diketahui bahwa karbon pada pergeseran 50,0 memiliki 2 proton pada pergeseran 1,47 dan 3,13 hal tersebut juga telah dikonfirmasi melalui korelasi pada uji HMBC. Data korelasi HMBC proton pada δ_{H} (ppm) 3,55 menunjukkan adanya korelasi pada pergeseran δ_{C} (ppm) 21,3 dan 145,5 sedangkan proton pada pergeseran δ_{H} (ppm) 2,51 juga menunjukkan adanya korelasi pada pergeseran δ_{C} (ppm) 21,3; 145,5; 50,0; 123,9. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa karbon pada pergeseran 145,5 dan 123,9 bertetangga dengan 36,7 dan 76,2. Berdasarkan HMQC menunjukkan bahwa pada pergeseran δ_{H} (ppm) 3,55 menunjukkan korelasi dengan karbon δ_{C} (ppm) 76,2 yang tersubstitusi gugus hidroksi sedangkan pada δ_{H} (ppm) 2,51 menunjukkan korelasi dengan karbon metin δ_{C} (ppm) 50,3. Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 1 untuk senyawa R5d ditunjukkan pada Gambar 4.23.



Gambar 4.23 Korelasi Parsial 1 Senyawa R5d

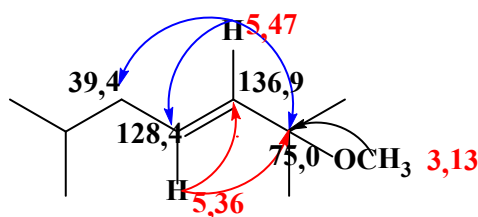
Proton δ_{H} (ppm) 5,89 berdasarkan hasil HMQC menunjukkan korelasi dengan karbon metin δ_{C} (ppm) 123,9 yang merupakan karbon C=C. Hasil HMBC proton δ_{H} (ppm) 5,89 memiliki korelasi dengan 41,5; 36,7; 66,2. Proton δ_{H} (ppm) 2,51 berdasarkan HMQC menunjukkan korelasi dengan karbon yang tersubstitusi

gugus hidroksi dengan $\delta_C(\text{ppm})$ 66,2. Korelasi parsial 2 dapat dilihat pada Gambar 4.24.



Gambar 4.24 Korelasi Parsial 2 Senyawa R5d

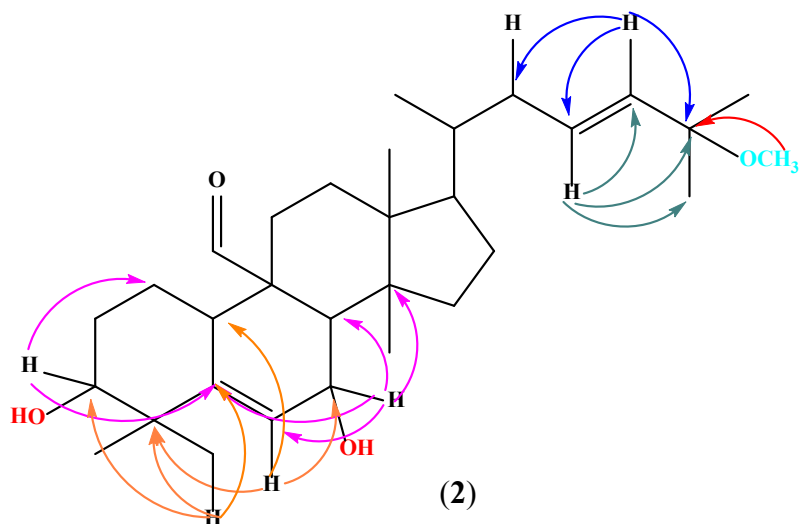
Hasil HMBC proton $\delta_H(\text{ppm})$ 2,51 memiliki korelasi dengan 145,5; 123,9; 50,0; 47,6. Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 2 untuk senyawa R5d ditunjukkan pada Gambar 4.24. Proton pada $\delta_H(\text{ppm})$ 5,39 dan 5,47 adalah proton khas untuk ikatan C=C dibuktikan dengan hasil korelasi HMQC pada $\delta_C(\text{ppm})$ 128,4 dan 136,9. Proton $\delta_H(\text{ppm})$ 5,39 dan 5,47 menunjukkan adanya saling korelasi seperti pada Gambar, sehingga dapat membuktikan bahwa karbon tersebut memang bertetangga. Berdasarkan HMBC $\delta_H(\text{ppm})$ 5,39 dan 5,47 juga menunjukkan adanya korelasi dengan karbon yang tersubstitusi gugus metoksi. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan hasil HMQC menunjukkan $\delta_C(\text{ppm})$ 75,0 berkorelasi dengan $\delta_H(\text{ppm})$ 3,13. Proton $\delta_H(\text{ppm})$ 3,13 adalah proton khas untuk gugus metoksi. Berdasarkan analisa korelasi tersebut, maka korelasi parsial 3 untuk senyawa R5d ditunjukkan pada Gambar 4.25.



Gambar 4.25 Korelasi Parsial 3 Senyawa R5d

Berdasarkan data hasil korelasi HMQC dan HMBC yang diperoleh maka senyawa R5d diberi nama 3 β ,7 β -dihidroksi-25-metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-al dengan struktur pada Gambar 4.26. Senyawa 3 β ,7 β -dihidroksi-25-metoksi-

kukurbita-5-23-dien-19-al ($C_{31}H_{50}O_4$) adalah senyawa telah diisolasi dari daun *M. charantia* (Fatope *et al*, 1990). Mulholland *et al* (1997) juga telah mengisolasi senyawa yang sama dari daun *M. foetida*.



Gambar 4.26 Korelasi HMBC senyawa R5d (2)

Perbedaan kedua senyawa ini terletak pada posisi ikatan rangkap pada C-22 dan C-25. Senyawa R6b (1) memiliki ikatan rangkap pada C-24 dan C-25, sedangkan pada senyawa R5d (2) terletak pada C-23 dan C-24. Senyawa R6b (1) mengandung tiga gugus hidroksi sedangkan senyawa R5d (2) mengandung dua gugus hidroksi dan satu gugus metoksi pada C-25. Kedua senyawa tersebut merupakan turunan triterpenoid dan merupakan senyawa khas dari tanaman *M. charantia*. Kedua senyawa ini memiliki kepolaran yang sedikit berbeda hal tersebut dikarenakan oleh perbedaan gugus fungsi yaitu antara gugus alkohol dan metoksi. Senyawa hasil isolasi tersebut selanjutnya akan diuji aktivitas antioksidan.

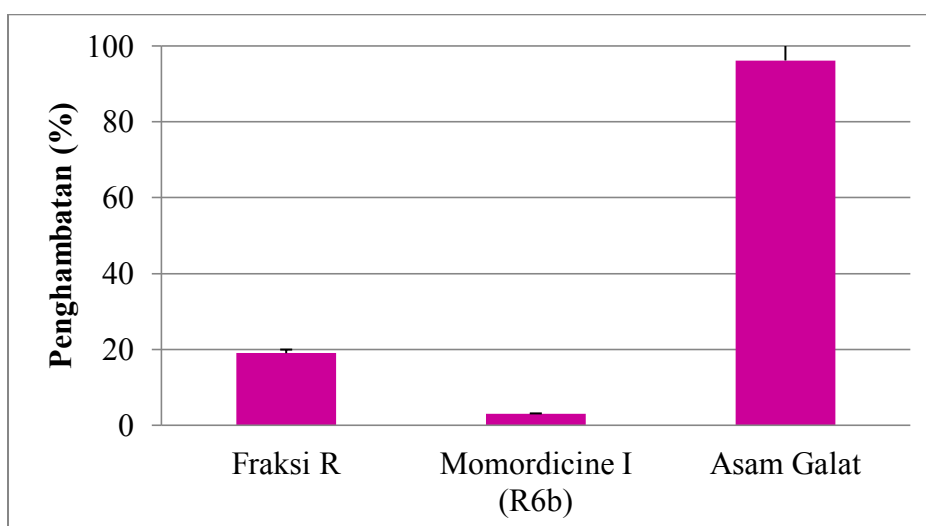
4.5 Aktivitas Biologis Senyawa yang telah diisolasi

4.5.1 Aktivitas Antioksidan

Metode ABTS (26) dan DPPH (24) digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan terhadap senyawa yang telah diisolasi. Kedua metode ini memiliki reaksi penghambatan radikal dengan adanya donor H^+ atau elektron dari senyawa

antioksidan. Kemampuan senyawa untuk mereduksi radikal DPPH (24) dapat dilihat melalui perubahan warna larutan DPPH (24) yang berwarna ungu menjadi kuning. Sedangkan metode ABTS (26) memiliki sensitivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan DPPH (24). Perbedaan kedua metode tersebut yaitu uji DPPH (24) berdasarkan kemampuan antioksidan mendonorkan hidrogen namun pada uji ABTS (26) berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan radikal proton (Chu *et al.*, 2000).

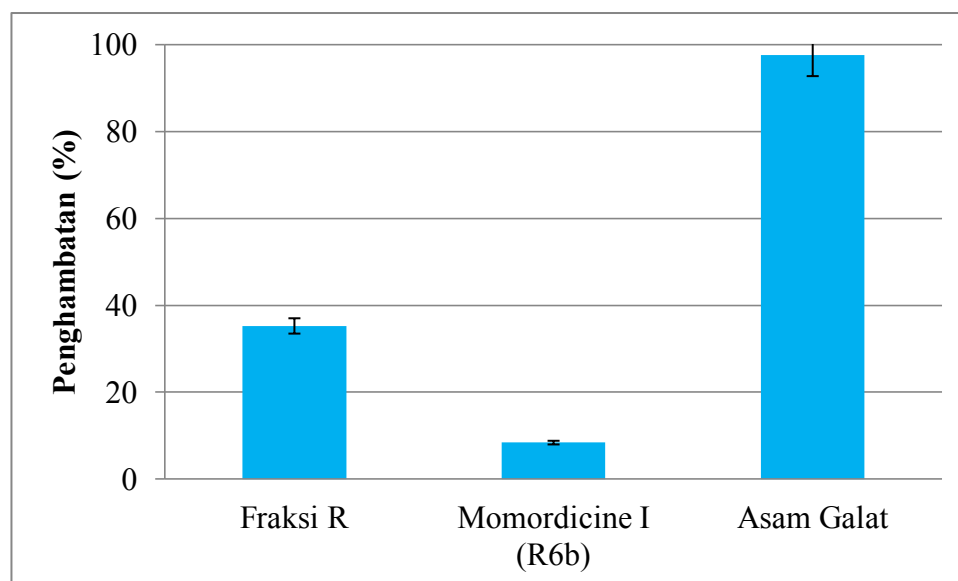
Persentase penghambatan radikal DPPH dari fraksi dan senyawa momordicine I (1) dapat dilihat pada Gambar 4.27. Fraksi R menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi sebesar $21,12 \pm 0,02\%$ dibandingkan dengan senyawa momordicine I (1) menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar $5,51 \pm 0,02\%$ pada konsentrasi $319 \mu\text{g/mL}$.



Gambar 4. 27 Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH dari Senyawa Momordicine I (R6b), Fraksi R dan Asam galat (kontrol positif).

Persentase penghambatan radikal kation ABTS dari fraksi dan senyawa momordicine I (1) dapat dilihat pada Gambar 4.28. Fraksi R menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih tinggi sebesar $40,28 \pm 0,04\%$ dibandingkan dengan senyawa momordicine I (1) menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar $36,76 \pm 0,03\%$ pada konsentrasi $319 \mu\text{g/mL}$ (Gambar 4.28).

Senyawa R5d (**2**) tidak dapat diuji antioksidan karena jumlahnya yang sangat terbatas, namun apabila dilihat dari hasil uji pada fraksi dapat disimpulkan bahwa senyawa R5d juga tidak aktif sebagai antioksidan. Fraksi dan kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah jika dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan yaitu asam galat dengan nilai IC_{50} DPPH (**24**) 2,24 $\mu\text{g/mL}$ dan ABTS (**26**) 1,36 $\mu\text{g/mL}$.

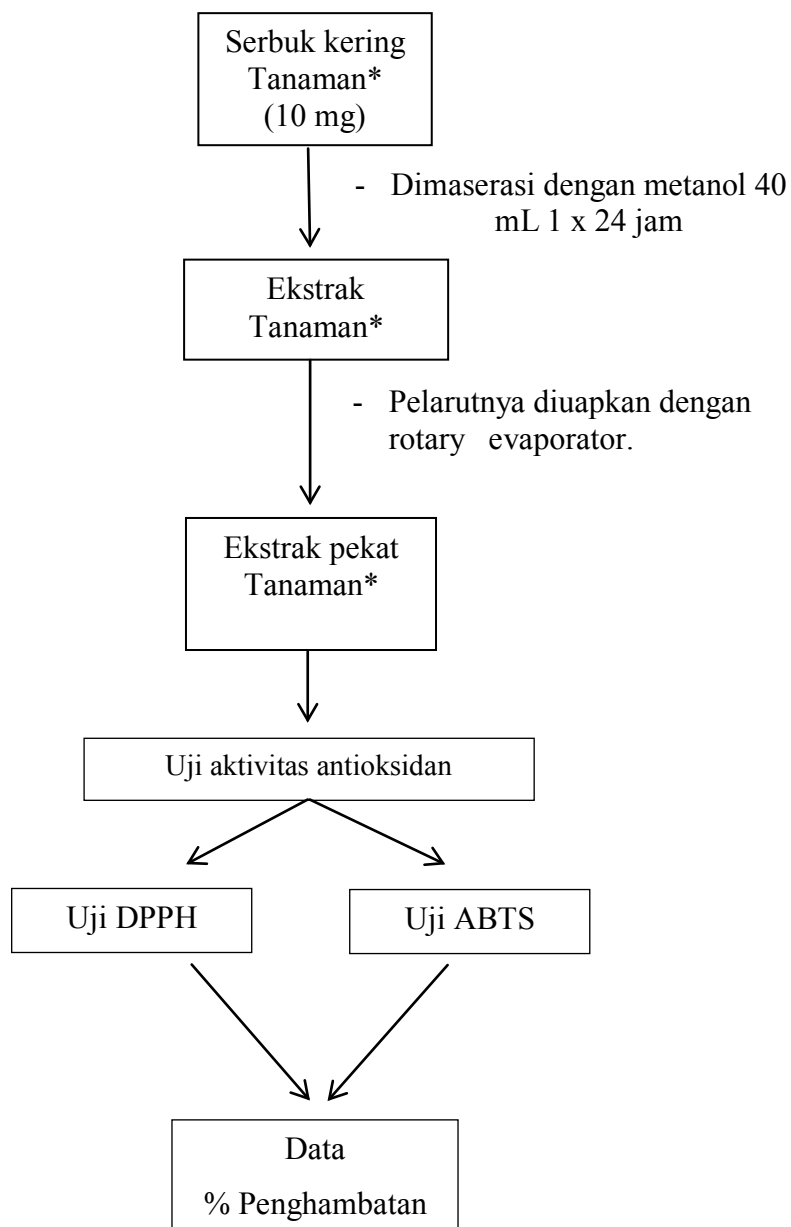


Gambar 4.28 Aktivitas Penghambatan Radikal Kation ABTS dari Senyawa Momordicine I (R6b), Fraksi R dan Asam galat (Kontrol positif)

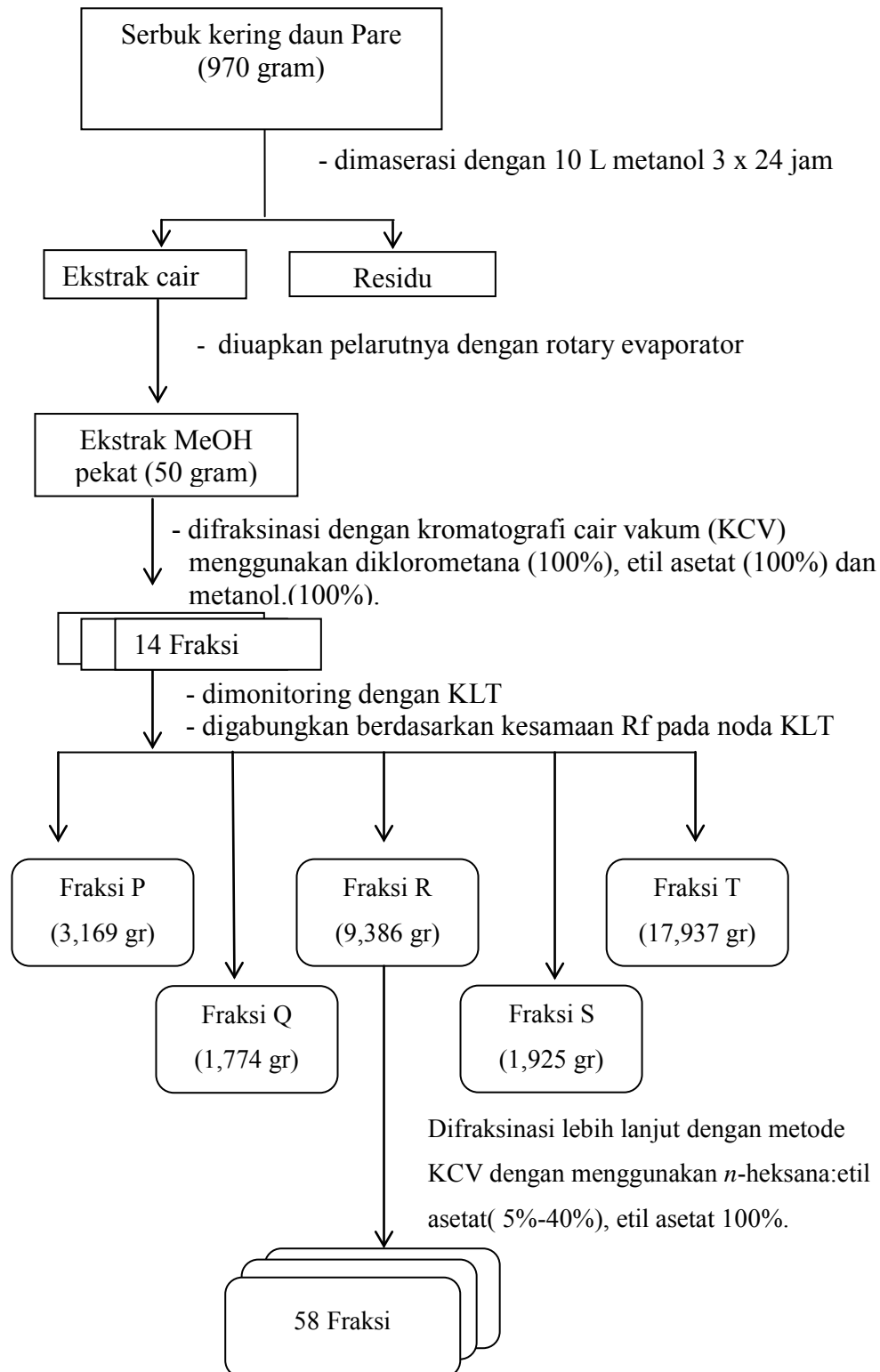
“halaman ini sengaja dikosongkan”

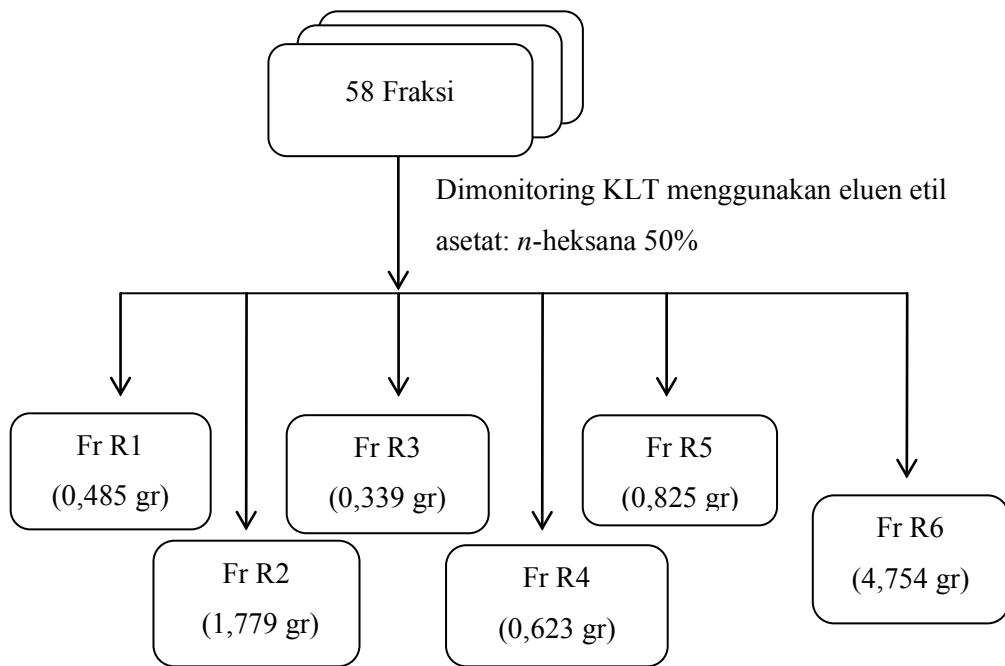
LAMPIRAN A: SKEMA KERJA

A. Skrining

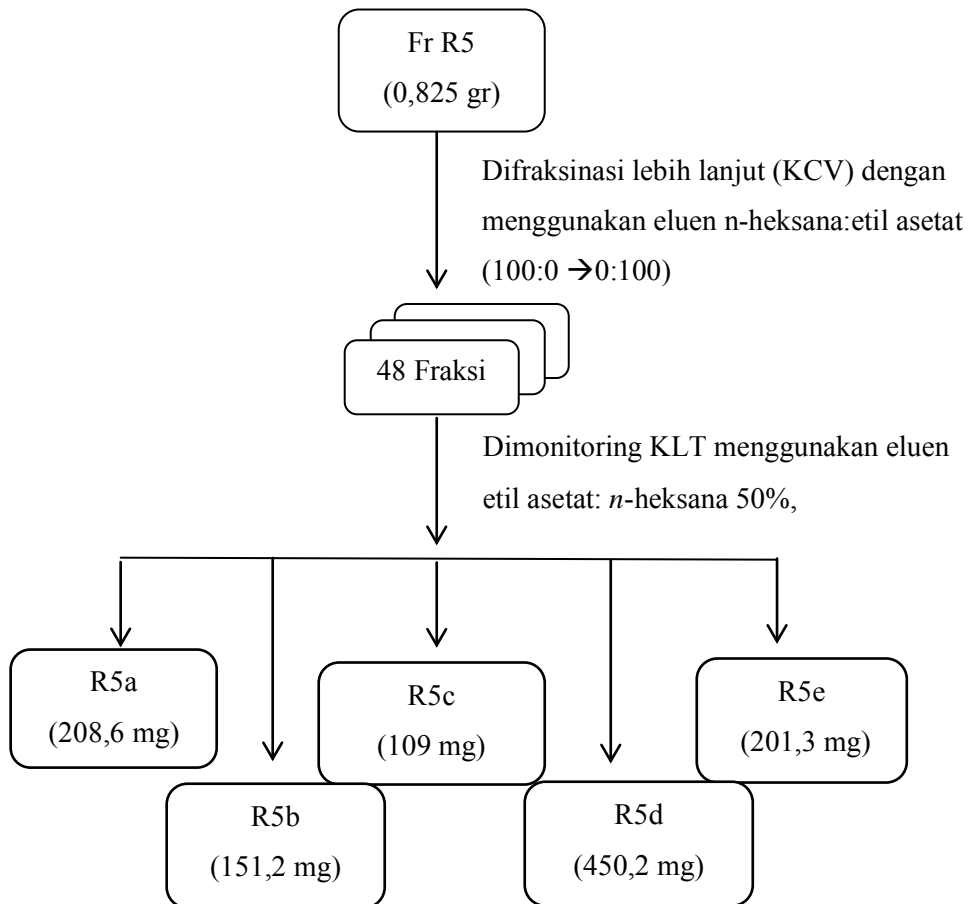


B. Isolasi dan penentuan Struktur





C. Fraksinasi fraksi R5 dan Isolasi Senyawa R5d



R5d
(450,2 mg)

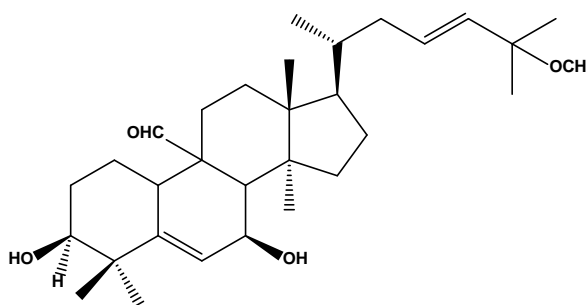
Dimurnikan dengan KKG (tinggi dan diameter kolom, 10 cm, 0,7 cm) menggunakan eluen etil asetat: n-heksana (0:100 → 60:40), etil asetat 100%.

Kristal putih
kehijauan

Direkristalisasi dengan menggunakan diklorometanan dan *n*-heksana.

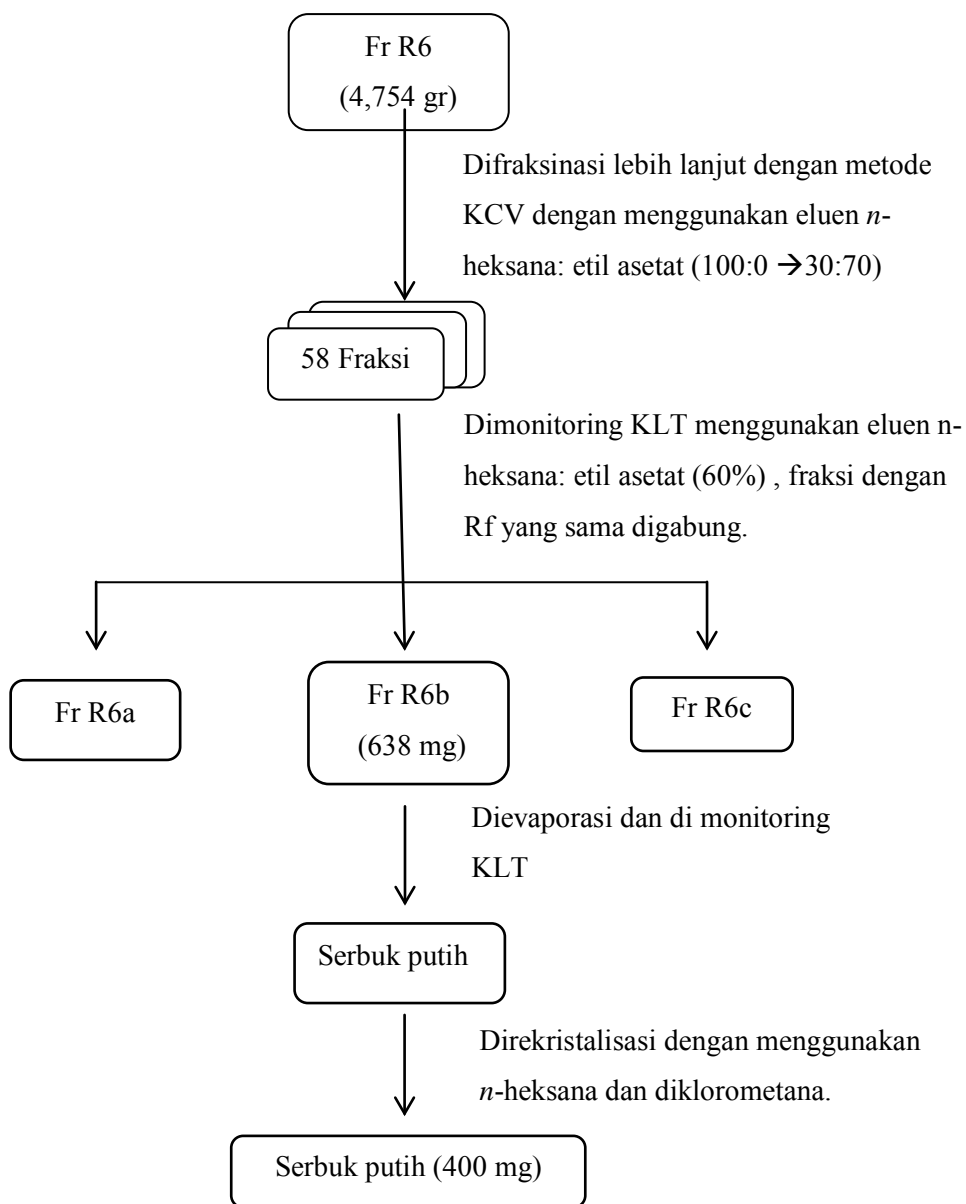
Kristal putih
kehijauan (40 mg)

Diuji kemurnian dengan KLT
3 eluen dan 2D
Dilakukan penentuan struktur
dengan IR, H-NMR, C-NMR,

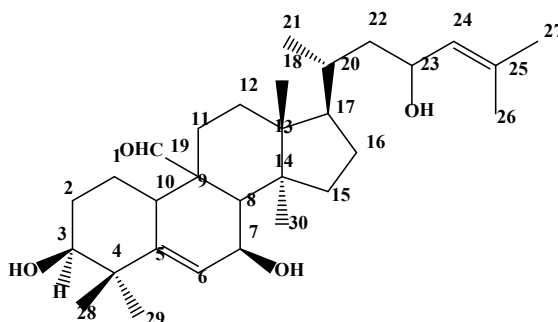


(3β,7β-dihidroksi-25metoksi-kukurbita-5-23-dien-19-yl)

D. Fraksinasi fraksi R6 dan Isolasi Senyawa R6b



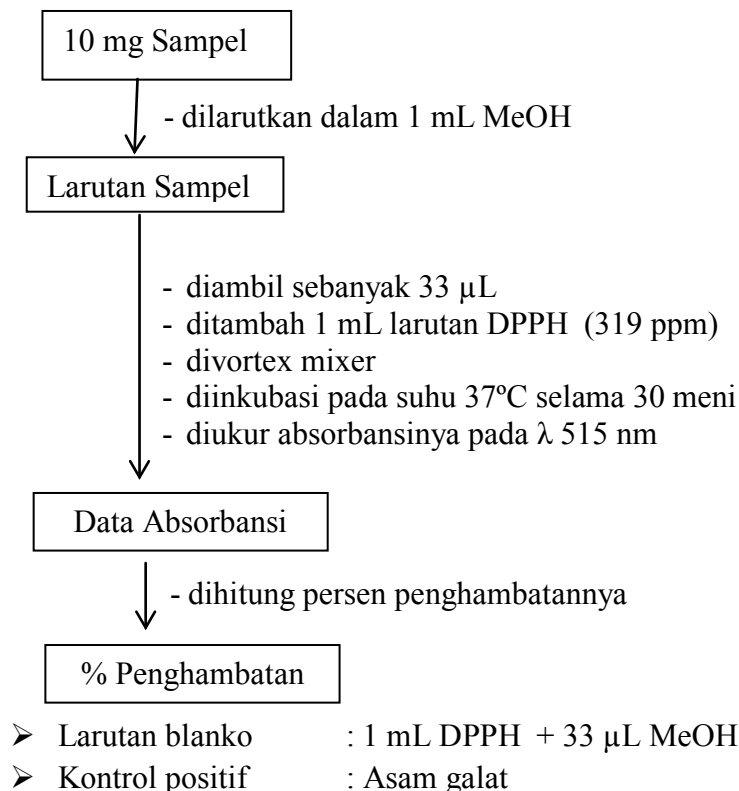
- Diuji kemurnian dengan KLT 3 eluen dan 2D
- Dilakukan penentuan struktur dengan IR, H-NMR, C-NMR, Uji antioksidan



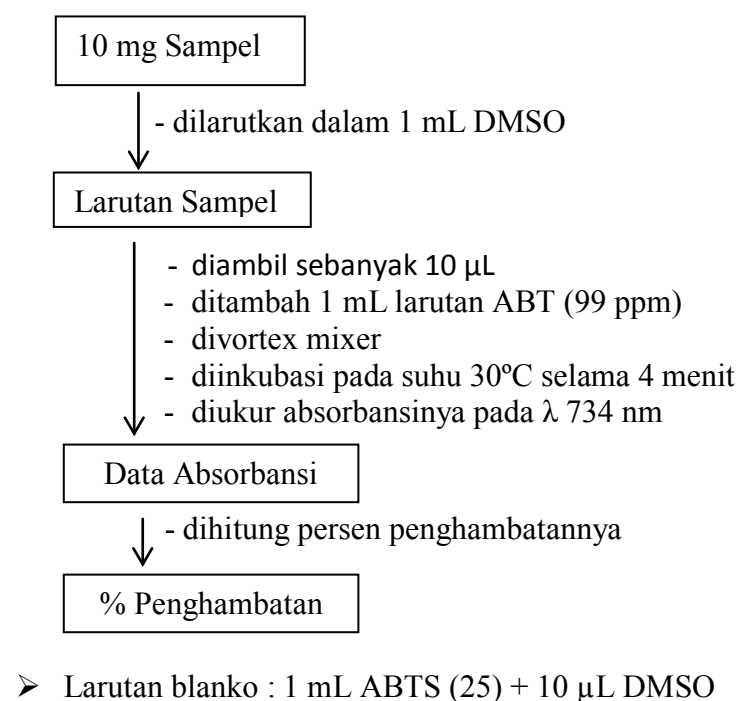
3,7,23-trihidroksi-kukurbita-5-24-dien-19-al (Momordicine I)

Persen Penghambatan: DPPH (5,51±0,02%) dan ABTS (36,76±0,03%)

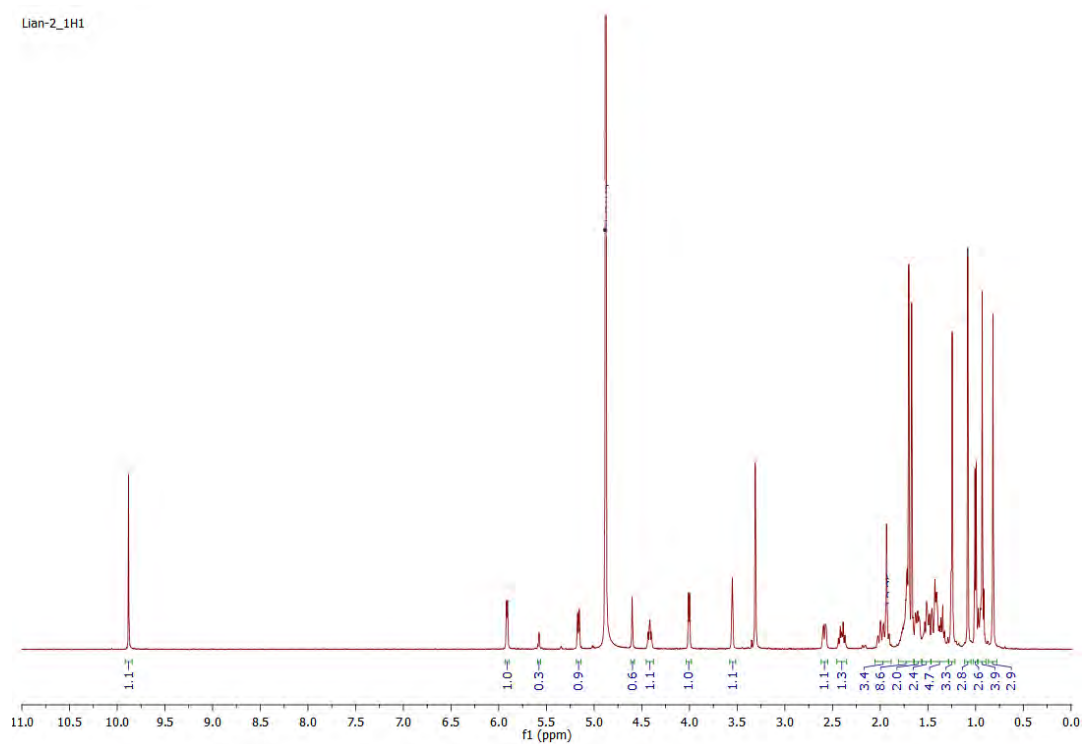
E. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH



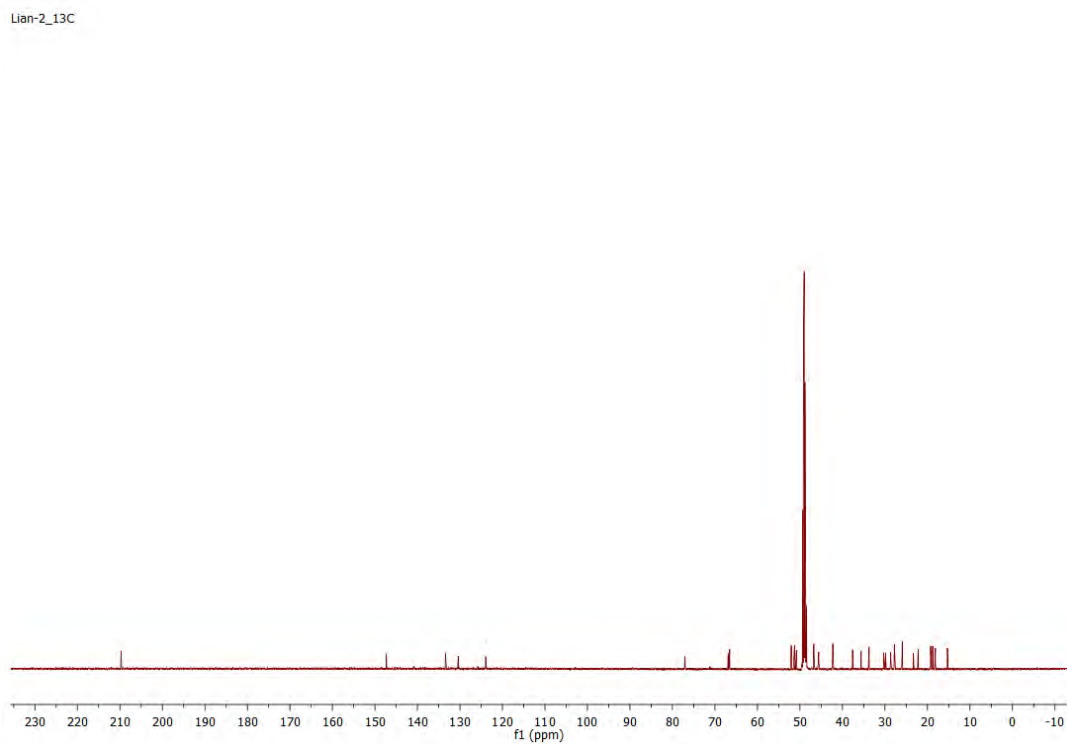
F. Uji Aktivitas Antioksidan Metode ABTS



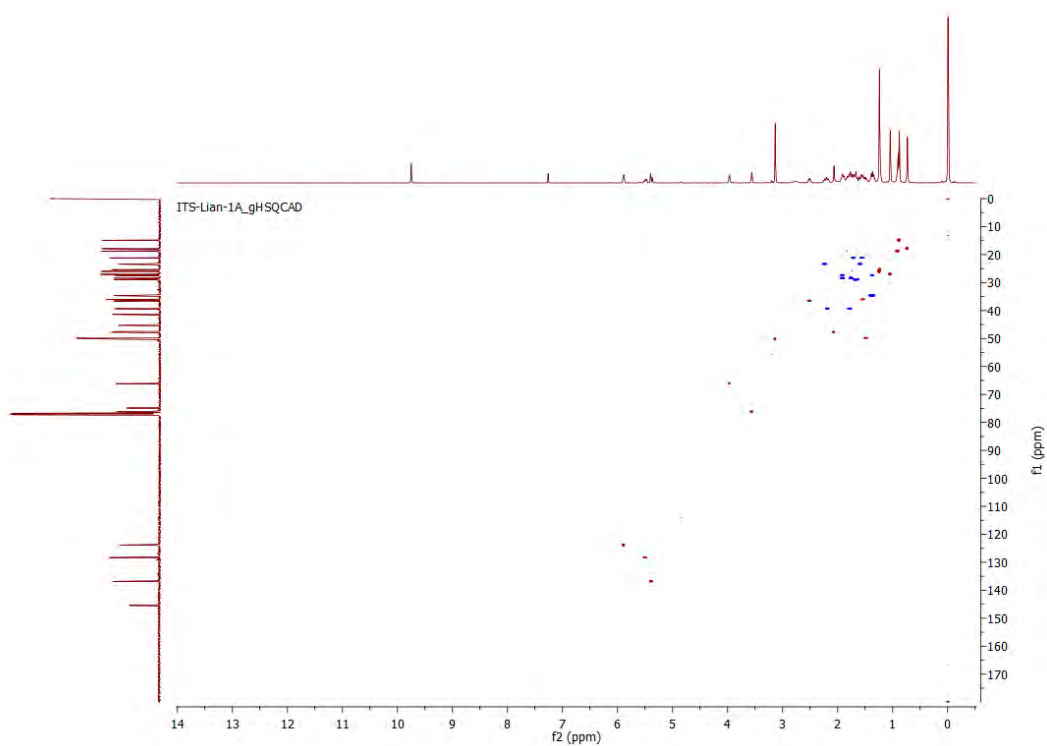
3. Spektra H-NMR Senyawa Momordicine I (1)



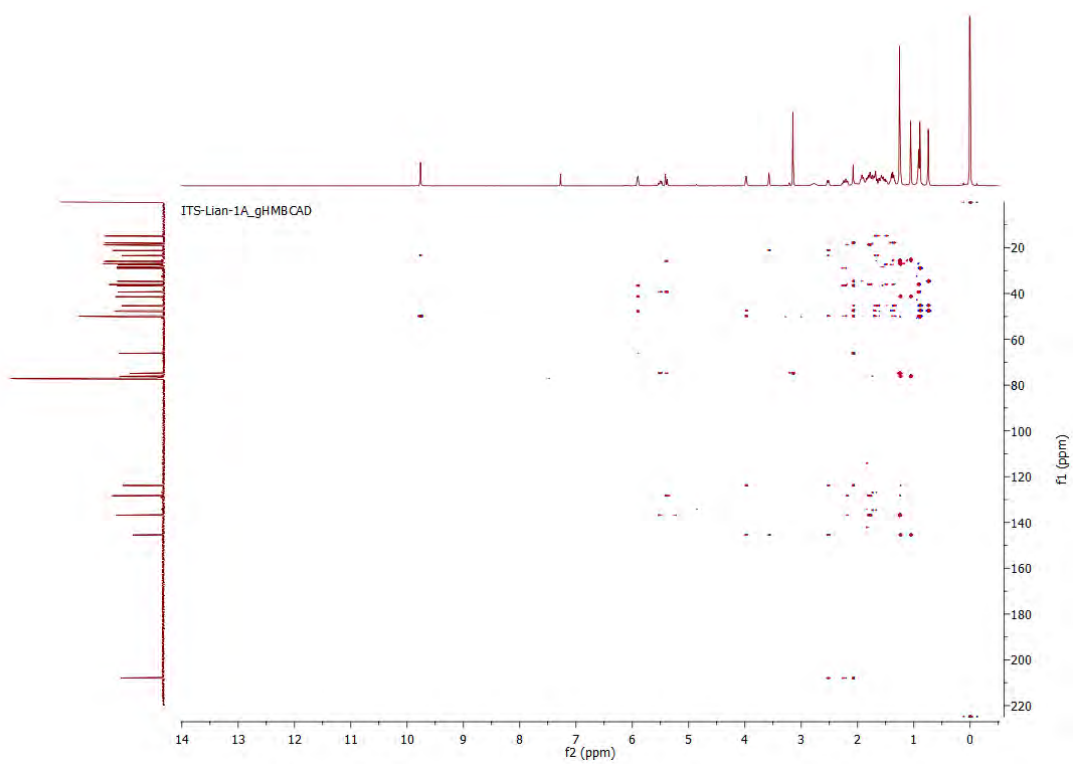
4. Spektra C-NMR Senyawa Momordicine I (1)



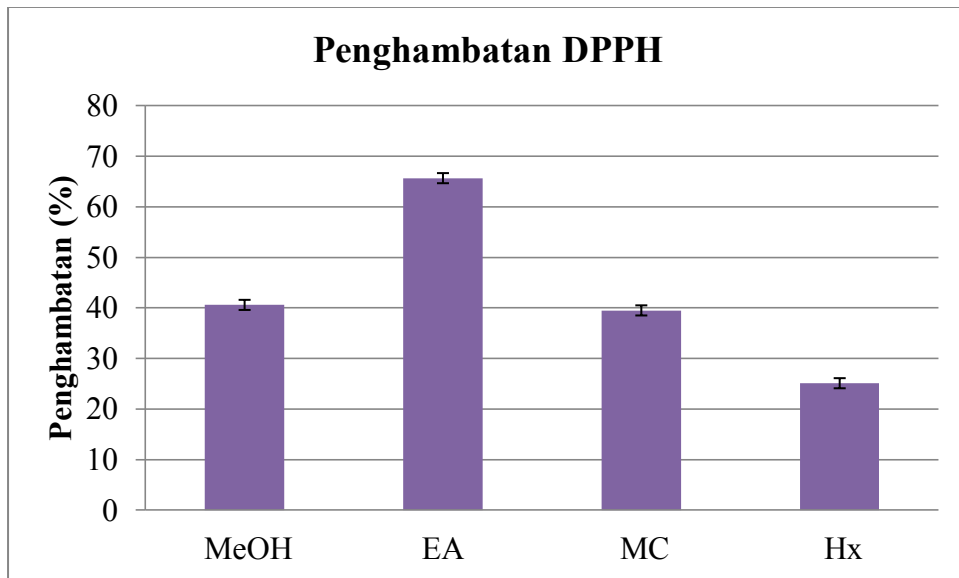
5. Data HMQC Senyawa (2)



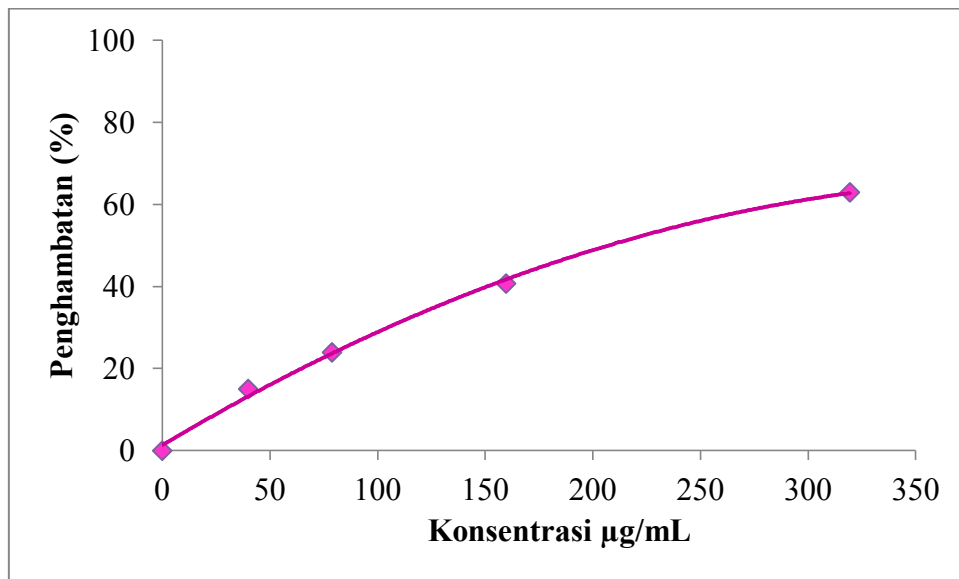
6. Data HMBC Senyawa (2)



7. Data Penghambatan DPPH dari Ekstrak Daun *M. charantia*



8. Aktivitas Penghambatan Radikal DPPH dari Ekstrak Etil asetat



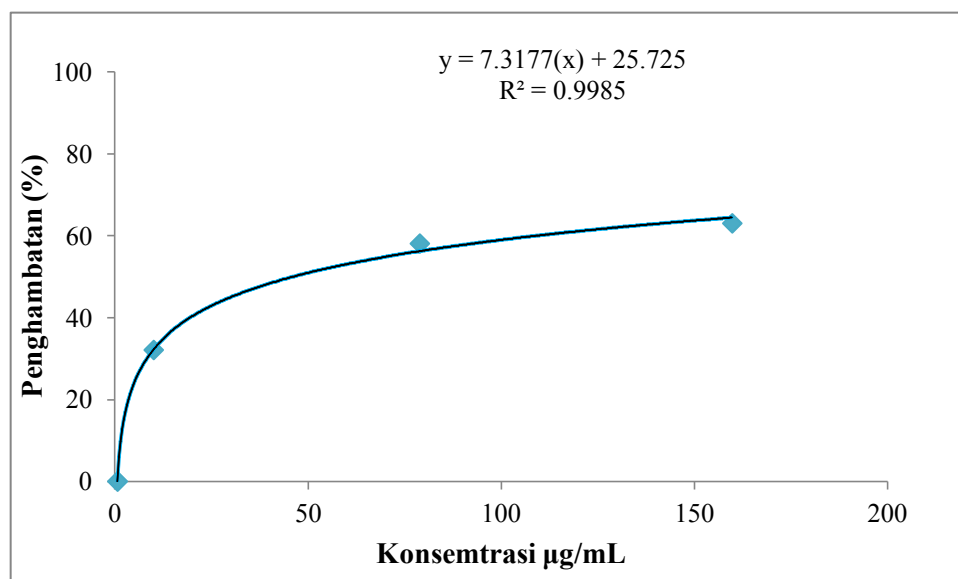
9. Data Antioksidan

A. Uji ABTS 4 ekstrak daun pare

EKSTRAK DAUN PARE					
	Blangko	MeOH	EA	MC	Hx
Abs 1	0.721	0.238	0.216	0.456	0.485
Abs 2	0.726	0.239	0.212	0.452	0.481
Abs 3	0.718	0.234	0.215	0.451	0.482
Rata2	0.722	0.237	0.214	0.453	0.483
Inhibisi (%)		67.159	70.300	37.229	33.118
SD	0.004	0.003	0.002	0.003	0.002

- Perhitungan IC₅₀ ekstrak metanol daun pare

EKSTRAK METANOL DAUN PARE						
Blangko	Konsentrasi					
	319.46	159.73	78.86	39.93	19.97	9.98
0.721	0.238	0.265	0.305	0.331	0.383	0.418
0.726	0.239	0.262	0.301	0.333	0.382	0.419
0.718	0.234	0.275	0.303	0.329	0.378	0.421
0.722	0.237	0.267	0.303	0.331	0.381	0.419
Inhibisi (%)	67.159	62.956	58.014	54.134	47.206	41.894
SD	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.001



Perhitungan IC₅₀ Ekstrak metanol daun pare:

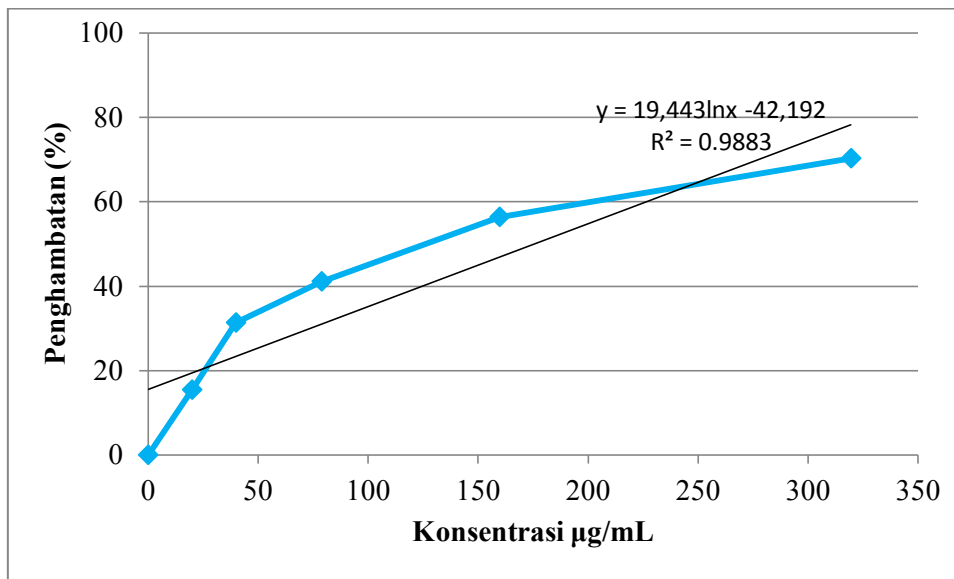
$$y = 7,3177 \ln(x) + 25,725$$

$$50 = 7,3177 \ln(x) + 25,725$$

$$x = 27,58 \text{ (IC}_{50}\text{)}$$

- Perhitungan IC₅₀ ekstrak etil asetat daun pare

LIAN EA				
Blangko	Konsentrasi			
	319.46	159.73	78.86	39.93
0.721	0.216	0.318	0.425	0.496
0.726	0.212	0.307	0.428	0.492
0.718	0.215	0.319	0.421	0.498
0.722	0.214	0.315	0.425	0.495
Inhibisi (%)	70.300	56.397	41.155	31.363
SD	0.002	0.007	0.004	0.003



Perhitungan IC₅₀:

$$y = 19,443 \ln x - 42,192$$

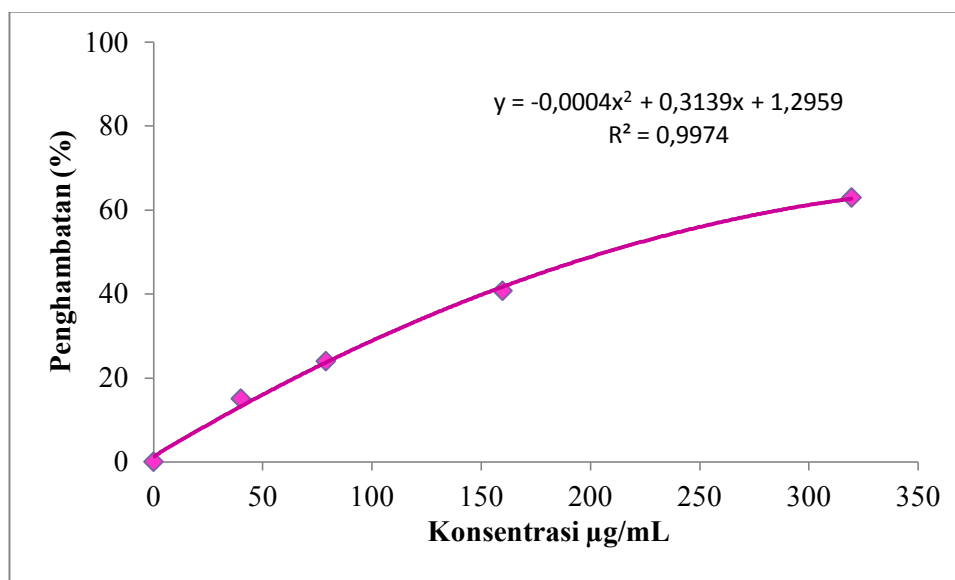
$$50 = 19,443 \ln x - 42,192$$

$$x = 114,54 \text{ (IC}_{50}\text{)}$$

B. Uji DPPH 4 ekstrak daun pare

EKSTRAK DAUN PARE					
	Blangko	MeOH	EA	MC	Hx
Abs 1	0.430	0.248	0.152	0.273	0.332
Abs 2	0.426	0.257	0.143	0.253	0.316
Abs 3	0.428	0.258	0.146	0.251	0.314
Rata2	0.428	0.254	0.147	0.259	0.321
Inhibisi (%)		40.576	65.654	39.486	25.078
SD	0.002	0.006	0.005	0.012	0.010

EKSTRAK EA DAUN PARE						
Blangko	Konsentrasi					
	319.46	159.73	78.86	39.93	19.97	9.98
0.614	0.231	0.361	0.468	0.522	0.562	0.583
0.614	0.229	0.373	0.47	0.525	0.563	0.583
0.621	0.225	0.362	0.468	0.524	0.565	0.577
0.616	0.228	0.365	0.469	0.524	0.563	0.581
Inhibisi (%)	62.953	40.725	23.959	15.035	8.599	5.733
SD		0.007	0.001	0.002	0.002	0.003



Perhitungan IC₅₀

$$y = -0,0004x^2 + 0,3139x + 1,2959$$

$$50 = -0,0004x^2 + 0,3139x + 1,2959$$

$$X = 211 \text{ (IC}_{50}\text{)}$$

C. Persen Inhibisi Senyawa 1 dan Fraksi

UJI ABTS				
	Blangko	MeOH	Fraksi R	S1
Abs 1	0.721	0.238	0.419	0.458
Abs 2	0.726	0.239	0.417	0.453
Abs 3	0.718	0.234	0.457	0.458
Rata2	0.722	0.237	0.431	0.456
Inhibisi (%)		67.159	40.277	36.767
SD	0.004	0.003	0.003	0.003

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil skrining dan uji pendahuluan daun pare (*M. charantia*) dipilih untuk isolasi senyawa. Ekstrak metanol daun pare (*M. charantia*) memiliki aktivitas penghambatan radikal kation ABTS (**26**) dengan nilai IC_{50} sebesar 27,58 $\mu\text{g/mL}$. Isolasi senyawa dari ekstrak metanol daun pare menghasilkan dua senyawa yaitu 3,7,23-trihidroksikukurbita-5,24-dien-19-al atau momordicine I (**29**) dan $3\beta,7\beta$ -dihidroksi-25metoksi-kukurbita-5,23-dien-19-al (**30**) yang diisolasi dari fraksi R. Uji aktivitas antioksidan fraksi R menunjukkan penghambatan pada DPPH (**23**) sebesar $21,12\pm 0,02\%$ dan pada radikal kation ABTS (**25**) sebesar $40,28\pm 0,04\%$. Senyawa 3,7,23-trihidroksikukurbita-5,24-dien-19-al (**30**) menunjukkan penghambatan pada DPPH (**23**) $5,51\pm 0,02\%$ dan pada ABTS (**25**) $36,76\pm 0,03\%$. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan asam galat sebagai kontrol positif dengan nilai IC_{50} 2,24 $\mu\text{g/mL}$ untuk radikal DPPH (**23**). Berdasarkan uraian diatas maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun pare berpotensi sebagai sumber senyawa bahan alam yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan tetapi tidak ditemukan senyawa baru pada tahap isolasi senyawa.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengisolasi senyawa- senyawa yang aktif sebagai antioksidan.

“halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

- Abena, A.A., Gbenou, J.D., Yayi, E., Moudachirou, M., Ongoka, R.P., Quamba, J.M., Silou, T. (2007), "Comparative Chemical and Analgesic Properties of Essensial Oil of *Cymbopogon nardus* Redle of B enin and Congo", *Journal of Altern*, **4**, 267-272.
- Akouwah, G.A., Sadikun, A., Mariam, A. (2002), "Flavonoid Identification and Hypoglycaemic Studies of the Butanol Fraction from *Gynura procumbens*", *Journal of Pharmaceutical Biology*, **40**(6), 405-410.
- Alfarabi, M., Bintang, M., Muhamad., Suryani., Safitri, M., (2010), "The Comperative Ability of Antioxidant Activity of *Piper crocatum* in Inhibiting Fatty Acid Oxidation and Free Radical Scavenging" *Journal of hayati*, **17**, 201-204.
- Ali, M. dan Mahalwal, V.S . (2003), "Volatile Constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.)" *Journal of flavour and fragrance*, **18**, 73-76.
- Anand, T., Naika, M., Kumar, P., Khanum, F. (2010), "Antioxidant and DNA Damage Preventive Properties of *Centella asiatica*" *Journal of Pharmocology* **2**, 53-58.
- Andarwulan, N., Batari, R., S andrasari, D.A., Bolling, B., Wijaya, H. (2010), "Flavonoid Content and Antioxidant Activity of V egetables from Indonesia" *Journal of Food and Chemistry*, **121**, 1231-1235.
- Arawbewela, L., Arawwawala, M., Rajapaksa, D. (2006), "*Piper betle*: a Potential Natural Antioxidant" *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 10-14.
- Ariffin, F., Chew, S.H., Bhupinder, K., Karim, A.A., Huda, N. (2011), "Antioxidant Capacity and Phenolic Composition of Fermented *Centella asiatica* Herbal Teas" *Journal of society and chemical industry*, **91**, 2731-2739.
- Ashraf, A., Adilsarfraz, R., Ra shid, M.A., Shahid, M. (2014), "Antioxidant, Antimicrobial, Antitumor, and Cytotoxic Activities of An Important Medicinal Plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan" *Journal of food and drug analysis*, **25**, 1-7.

- Bazma, A.A., Zakaria, Z., Latha, L.Y., Sasidharan, S. (2011), "Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of the Methanol Extract of *Euphorbia hirta*" *Journal of Asian Fasific Tropical Medicine*, **4**, 386-390.
- Bing, L., Guo-cai, W., Ji, Y., Mao-xin, Z., Guang-wen, L. (2008), "Antifeedant Activity and Active Ingredient Againts *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* Leaves." *Journal of Aglicultural Science*, **7**(12), 1466-1473.
- Cao, J.Q., Zhang, Y., Cusi, J.M., Zhao, Y.Q. (2011) . "Two New Cucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia* L." *Journal of Chinese Chemical Letters*, **22**, 283-286.
- Cos, P., Hermans, N., Calomme, M.,(2003), "Comparative study of eight well known polyphenolic antioxidant", *Journal of Pharm Pharmacol*, **55**, 1291-1297
- Chu, Y.H., Chang, C.L., Hsu, H.F., (2000) "Flavonoid Content of S everal Vegetables and Thier Antioxidant Activity." *Journal of the science of food Agliculture*, **6**, 561-566.
- Deo, B., Nath, M., Nayak, P.K., Dhal, Y., (2013). "Evaluation of Antioxidant Activity of *Ocimum tenuiflorum* an Important Medicinal Herb." *International Journal of Plant, Animal and Environmental*, **3**, 150-154.
- Emrizal., Fernando, A., Yuliandari, R., Rullah, K., Indrayani, N.R., Susanty, A., Yerti, R., A hmad, F., Sirat, H,M., dan Arbian, D., (2014), "Cytotoxic Activities of Fractions and Two Isolated Compounds from Sirih merah (Indonesian Red betle), *Piper crocatum*," *Journal of Procedia Chemistry*, **13**, 79-84.
- Fatope, M.O., Takeda, Y., Yamashita, H., Okabe, H., Yamauchi, T., (1990) . "New Cucurbitane Triterpenoids from *Momordica charantia*." *Journal of Natural Product*, **53**(6), 1491-1497.
- Fesenden, R.J., dan Fesenden, J.S., (1992), *Kimia Organik*, Edisi ketiga Jilid 1. Erlangga, Jakarta
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E., (1991), *Pengantar Kromatografi*, Edisi kedua. ITB, Bandung

- Harbone J.B., (1987) *Metode fitokimia: Penentuan cara moderen menganalisis tumbuhan*, terbitan kedua terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwan Soediro, *ITB Press*, Bandung
- He, QP., Ma, L., Lou, JY., He, FY., Lou, LG. dan Hu, LH. (2007),"Cytotoxic Withanolides from *Physalis angulata* L." *Journal of Biochemistry and Biodiversity*, **4**, 443-449.
- Hseu, YC., Wu, CR., Chang, HW., Kumar, K.J.S., Lin, MK., Chen, CS., Cho, HJ., Huang, CY., Lee, HZ., Hsieh, WT., Chung, JC., Wang, HM., Yang, HL., (2011),"Inhibitory Effects of *Physalis angulata* on Tumor Metastasis and Angiogenesis", *Journal of Ethnopharmacology*, **135**, 762-711.
- Kaewseejan, N., Sutthikhum, V., dan Siriamornpun, S., (2015),"Potential of *Gynura procumbens* Leaves as Source of Flavonoid-enriched Fractions with Enhanced Antioxidant Capacity" *Journal of functional food*, **12**, 120-128.
- King F.D.(1994), *Medicinal Chemistr: principle and practice* . Cambridge: The royal of society of chemistry
- Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpoviessi B.K., Sinsin, Brice., Accrombessi, G., Frederich, M., Moudachirou, M., dan Joelle, QL., (2013),"Chemical Composition, Cytotoxicity and *In vitro* Antitrypanosomal and Anti Plasmodial Activity of the Essential Oils of four *Cymbopogon* Species from Benin" *Journal of Ethnopharmacology*, **151**, 652-659.
- Krishnaiah, D., Sabatyl, R., N ithyanandam, R., (2011) "A Review of the Antioxidant Potential of Medicinal Plant Species" *Journal of Food and Bioproduct Processing* , **89**, 217-233.
- Kubola, J., dan Siriamornpun, S., (2008),"Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) Leaf, Stem, and Fruit Fraction Extract In Vitro" *Journal of food and chemitry*,**110**, 881-890.
- Kumar, V., Anwar, F., Ahmed, D., Verma, A., Ahmed, A., Damanhour, Z.A., Mishra, V., Ramteke, P.W., Bhatt, P.C., dan Mujeeb, M., (2014), "*Paederia foetida* Linn. Leaf Extract: an Antihyperlipidemic, Antihyperglycemic, and Antioxidant", *Journal of Complementary and Alternative Medicine*, **14**:76, 1-16.

- Liu, C.H., Yen, M.H., Tsang, S.F., Gan, K.H., Hsu, H.Y., (2010) "Antioxidant Triterpenoid From the Stems of *Momordica charantia*." *Journal of Food Chemistry*, **118**, 751-756.
- Mahomoodally, M.F., Fakim, A.G., Subratty, A.H., (2007), "Effect of exogenous ATP on *Momordica charantia* Linn. (Cucurbitaceae) Induced Inhibition of D-glucose, L-tyrosine and Fluid Transport Across Rat Everted Intestinal Sacs *In Vitro*", *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, 257-263.
- Matsuda, H., Morikawa, T., Ueda, H., dan Yishikawa, M., (2001), "Inhibitors of Aldose Reductase and New Triterpen and its Oliglycoside, Centellasapogenol A and *Centella asiatica* (Gotu Kola)", *Journal of Heterocycles*, **55**(8), 257-263.
- Matsuur, H., Asakawa, C., Kurimoto, M., dan Mizutani, (2002), "Alpha-glucosidase Inhibitor from the Seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the Bodies of *Grifola frondosa*", *Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **17**(3), 1576-1578.
- Molyneux, P., (2004), "The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity" *Journal of Science and Tekhnology*, **26**(2), 212-219.
- Mulyono, N., Lay, B.W., Ocktreya, L., dan Rahayu, S., (2013), "Antidiarrheal Activity of Apus Bamboo (*Gigantochoa apus*) Leaf Extract and its Bioactive Compounds", *American Journal of Microbiology*, **4**, 1-13.
- Munim, O., Negishi, O., Ozawa, T., (2003) "Antioxidative compound from *Crotolaria sessiliflora* Biosci ." *Journal of Biotech Biochem* **67**, 410-414.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., (2000) "The influence of n atural product ." *Journal Of Natural Product*, **17**, 215-234.
- Ohtsuki, T., Yokosawa, E., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Toida, T., dan Ishibashi, M., (2008), "Quinic Acid Esters from *Pluchea indica* with Collagenas, MMP-2 dan MMP-9 Inhibitory Activities", *Journal of Phytoteraphy Resesearch*, **22**, 264-266.
- Padmaja, K., Aswar, U., Bodhankar, S., Sinnathambi, A., Mohan, V., dan Thakurdesai, P., (2012), "Antidepressant Effect of Standardized Extract of *Centela asiatica* in Olfactory Bulbectomy Model", *Journal of Biomedicine and Aging Pathology*, **2**, 48-53.

- Pan, Y., Abd-Rashid, B.A., Ismail, Z., Ismail, R., Mak, J.W., Pook, P.CK., Er, H.M., Ong, C.E., (2011), "In Vitro Modulatory Effects of *Andrographis paniculata*, *Centella asiatica* and *Orthosiphon stamineus* on Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19)", *Journal of Ethnopharmacology*, **133**, 81-887.
- Pavia, D.L., dan Kniz, J.R., (1990). *Introduction to Organic Laboratory Techniques a Contemporary Approach edisi kedua*. Saunders College Publishing, New York.
- Peng, L., Jian-Feng, L., Li-Ping, K., He-Shui, Y., Li-Juan, Z., Xin-Bo, S., Bai-Ping, M., (2012) "A New C30 Sterol Glycoside from the Fresh Fruits of *Momordica charantia*." *Journal of Chinese Natural Medicines*, **16**(2), 0088-0091.
- Perumal, S., Mahmud, R., Pillai, S., Lee, W.C., dan Ramanathan, S., (2012), "Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Evaluation of *Euphorbia hirta* extracts from Malaysia" *Journal of APCBEE Procedia*, **2**, 80-85.
- Ragasa, C.Y., dan Cornelio, K.B., (2013), "Triterpenes from *Euphorbia hirta* and their cytotoxicity." *Journal of Chinese Natural Medicines*, **11**, 528-533.
- Rub, R.A., Patil, M.J., Ghorpade, P., dan Siddiqui, A., (2013), "Evaluation of Antioxidant Potential of *Celosia argentea* Extracts." *Journal of Pharmacognosy*, **3**, 140-141.
- Seow, LY., Beh, HK., Masjid, A.M.S.A., dan Murugaiyah, V., (2011), "Anti-angiogenic Activity of *Gynura segetum* Leaf Extracts and its Fractions" *Journal of Ethnopharmacology*, **134**, 221-227.
- Seow LY., Beh, HK., Umar, M.I., Sadikun, A., dan Asmawi, M.Z. (2014), "Anti-inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *Gynura segetum*" *Journal of International Immunopharmacology*, **23**, 186-191
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., dan Moril, T.C., (1998), " *Spectrometric Identification of Organic Compounds*", fifth edition Jhon Willey and Son Inc, Canada
- Singh, P.R., Gupta, D.S., dan Bajpaj, K.S., (1990), " *Experimental Organic Chemistry*", Mac Graw Hill, New Delhi

- Singh, A., Singh, S.P., dan Bamezai, R., (1998), "*Momordica charantia* (Bitter Gourd) Peel, Pulp, Seed and Whole Fruit Extract Inhibits Mouse Skin Papillomagenesis" *Journal of Toxicology Letters*, **94**, 37-46.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., dan Nieman, T.A., (1998), *Principle of Instrument analysis*, Thomson Learning Inc, Singapore
- Susetyarini E., (2011), *Khasiat beluntas sebagai anti fertilitas (Uji pre-klinis) [Pluchea indica as anti-fertility (pre-clinical test)]*. UM Press, Malang
- Svehla G., (1990), "*Buku teks Analisis Anorganik kualitatif makro dan mikro*, edisi kelima", Kalman Media Pustaka, Jakarta
- Tapan, E., (2005), "*Kanker, Antioksidan dan Terapi Komplemente*", PT Elex Media Komputindo, Jakarta
- Tengah, I.G.P., (1995), "*Studi tentang Inventarisasi, Determinasi dan Cara penggunaan Tanaman Obat*". Puslitbang Farmasi, Balitbang Kesehatan RI, Jakarta
- Unchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., dan Usmanghani, K., (1989), "Terpenic Glycoside from *Pluchea indica*", *Journal of Phytochemistry*, **28**, 3369-3372.
- Underwood, A.R., Day, J.R., dan R.A., (1986), *Analisa Kimia Kuantitatif edisi kelima*. Erlangga, Jakarta
- Upadhyaya S., (2013), "Screening of phytochemicals, nutritional status, antioxidant and antimicrobial activity of *Paederia foetida* L from different location", *Journal of pharmacology research*, **7**,139-141.
- Wu, Q.B., Wang, Y., Liang, L., Jiang, Q., Guo, M.L., dan Zhang, J.J., (2013) "Novel Triterpenoid Saponins from the Seeds of *Celosia argenta*" *Journal of Natural Product*, **27**(15) 1353-1360.
- Yi, W., Wei, Q., Di, G., Jiang-Yu, L., dan Yang-Li, L., (2012), "Phenols and Flavonoids from the Aerial Part of *Euphorbia hirta*" *Journal of Chinese Natural Medicines*, **10**, 40-42.
- Yuniarti T., (2008), "*Ensiklopedia tanaman obat tradisional*". Med Press, Yogyakarta

Zainol, M.K., Abd-Hamid, A., Yusof, S., dan Muse, R., (2002), "Antioxidative Activity and Total Phenolic Compound of Leaf, Root, and Petiole of Four Accessions of *Centella asiatica* " *Journal of Food and Chemistry*, **81**, 575-581.

Zhu, BR., Pu, SB., Wang, K.D.G., Xu, DR., dan Zhou, HH., (2013), "Chemical Constituents of the Aerial Part of *Gynura segetum*", *Journal of Biochemical Systematics and Ecology*, **46**, 4-6.

Zurowska, D.M., dan Wenta, W., (2012), "A Comparison of ABTS and DPPH Methods for Accessing the Total Antioxidant Capacity of Human Milk" *Journal of Technol Aliment*, **11**(1), 83-89.

“halaman ini sengaja dikosongkan”

BIODATA PENULIS

Penulis dilahirkan di Singaraja 18 Maret 1991, merupakan anak pertama dari 3 bersaudara. Penulis adalah lulusan SMAN 2 Singaraja (2006-2009). Penulis melanjutkan kuliah S1 (2009-2013) di Jurusan Pendidikan Kimia Universitas Pendidikan Ganesha Bali dan melanjutkan kuliah S2 (2014-2016) di Jurusan Kimia, Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya. Penulis mengambil bidang studi Kimia Organik Bahan Alam dibawah bimbingan Sri Fatmawati M.Sc., Ph.D. dan Prof. Dr. Taslim Ersam.