

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK DAUN PALIASA (*Kleinhovia hospita* L.) SECARA *IN VITRO***

**THE *INVITRO* ANTIOXIDANT AND SITOTOXIC ACTIVITIES OF PALIASA LEAVES (*Kleinhovia hospita* L.)**

**RISKASISWANTI**

**N012211016**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

# TESIS

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK DAUN PALIASA (*Kleinhovia hospita* L.) SECARA *IN VITRO*

RISKASISWANTI

N012211016



PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024

**THESIS**

**THE INVITRO ANTIOXIDANT AND SITOTOXIC ACTIVITIES OF PALIASA LEAVES  
(*Kleinhovia hospita* L.)**

**RISKASISWANTI**

**N012211016**



**POSTGRADUATE OF PHARMACY**

**PHARMACY FACULTY**

**HASANUDDIN UNIVERSITY**

**MAKASSAR**

**2024**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK DAUN PALIASA (*Kleinhovia hospita* L)  
SECARA *IN VITRO***

Tesis

Sebagai salah satu syarat mencapai gelas magister

Program Studi Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

RISKASISWANTI

N012211016

Kepada

**PROGRAM MAGISTER FARMASI**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2024**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SITOTOKSIK DAUN PALIASA (*Kleinhovia hospita* L.) SECARA *IN VITRO***

**RISKASISWANTI**

**NIM : N012211016**


Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Magister Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

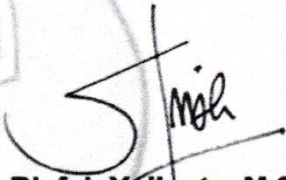
pada tanggal 16 Oktober 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama


Pembimbing Pendamping

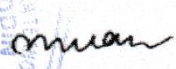
  
**Abdul Rahim, M.Si., Ph.D., Apt**  
NIP. 19771111 200812 1 001

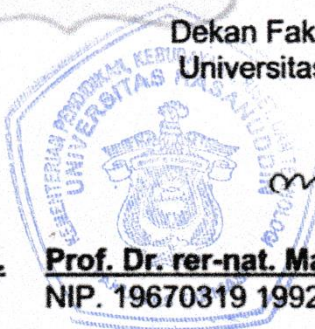
  
**Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt**  
NIP. 19780716 200312 2 001

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Farmasi

Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Hasanuddin

  
**Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.**  
NIP. 19800101 200312 1 004

  
**Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. Manggau, Apt.**  
NIP. 19670319 1992032 002



**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS  
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "**Uji Aktivitas Antioksidan Dan Sitotoksik Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L) Secara *In Vitro***" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing **Abdul Rahim, M.Si., Ph.D., Apt.** Sebagai pembimbing utama dan **Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt.** Sebagai pembimbing pendamping. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks yang telah dicantumkan dalam daftar pustaka tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin

Makassar,      Oktober 2024



Riskasiswanti

NIM. N012211016

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabiil 'alamiin segala puji bagi Allah subhanahu wa ta'ala yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, berupa kesehatan, kekuatan ilmu yang sempurna dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Tak lupa pula shalawat dan taslim kepada Rasulullah Muhammad SAW, sebagai teladan dan pembimbing kepada ilmu yang bermanfaat.

Tesis dengan judul “ uji aktivitas antioksidan dan sitotoksik daun paliasa (*Kleinhovia hospita* L. ) secara *invitro* disusun sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar Magister Sains pada Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini banyak kesulitan yang dihadapi, dalam penyusunan tesis ini tidak terlepas dukungan dari berbagai pihak. Peneliti banyak menerima bimbingan, petunjuk dan bantuan serta dorongan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material. Rasa syukur, ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya dan penghargaan setinggi - tingginya kepada:

1. Bapak Abdul Rahim, S.Si.,M.Si.,Ph.D., Apt selaku pembimbing utama dan ibu Dr. Risfah Yulianty, M.Si.,Apt., selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan yang sudah tidak bisa penulis ungkapkan dengan kata-kata.
2. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si.,Apt, Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si.,Ph.D.,Apt dan ibu prof. Yulia Yusrini Djabir, M.Si.,MMB.Sc.,Ph.D.,Apt selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dan memberikan masukan dan saran terkait penelitian ini dan dalam proses menyelesaikan tesis ini.
3. Dekan, Para Wakil Dekan, Kepala Prodi S2, Bapak-Ibu dosen, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana, dan memotivasi penulis dari awal memasuki bangku kuliah hingga saat ini.
4. Seluruh Bapak/ Ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmunya dan membimbing penulis selama masa studi S2 juga seluruh staf akademik dan laboran laboratorium serta segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh studi sehingga menyelesaikan penelitian ini.
5. Orang tua penulis, kakak serta keluarga penulis yang selalu memberikan dukungan, motivasi, kasih sayang, ridhonya serta doa yang tulus yang selalu mengiringi langkah penulis.
6. Sahabat-sahabat yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada saya
7. Semua pihak yang telah membantu yang tidak sempat disebutkan satu persatu. Penulis berharap agar tesis ini dapat memberikan manfaat dalam sumbangsih ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang Farmasi dan dapat dijadikan acuan untuk mengembangkan penelitian penelitian selanjutnya

Makassar, Oktober 2024

Riskasiswanti

## ABSTRAK

**RISKASISWANTI, Uji Aktivitas Antioksidan Dan Sitotoksik Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.) Secara In Vitro**

**Latar belakang:** *Kleinhovia hospita* L. atau dikenal dengan nama daerah “paliasa” merupakan tumbuhan yang kaya akan senyawa aktif dengan berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan, hepatoprotektif, dan antikanker. Sehingga perlu dilakukan penelitian uji aktivitas antioksidan dan sitoksisitas senyawa aktif yang diisolasi dari daun *K. hospita*. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antioksidan hasil fraksinasi ekstrak metanol *K. hospita* dan menguji efek sitotoksik senyawa triterpenoid sikloartan yang diisolasi dari daun *K. hospita* terhadap sel line HepG2. **Metode:** Daun *K. hospita* diekstraksi dengan metanol secara maserasi. Selanjutnya dipartisi dan difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Fraksi yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP. Sedangkan uji sitotoksik senyawa triterpenoid sikloartan yang diisolasi dari *K. hospita* terhadap sel line HepG2 dengan menggunakan metode MTT. **Hasil:** Hasil ekstraksi daun *K. hospita* diperoleh 47.08 g ekstrak metanol. Hasil fraksinasi dengan metode KCV diperoleh 15 fraksi (A–O). Uji antioksidan dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP menunjukkan bahwa fraksi D memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dengan nilai IC<sub>50</sub>, berturut-turut, 82,83; 36,50; dan 80,33 µg/ml. Uji sitotoksik senyawa sikloartan triterpenoid terhadap sel HepG2 dengan metode MTT menunjukkan bahwa senyawa 1 yang paling poten dengan nilai IC<sub>50</sub> 46.77 µg/ml. **Kesimpulan:** Fraksi D dari ekstrak daun *K. hospita* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dibanding fraksi yang lain. Sedangkan pada uji sitotoksisitas terhadap sel hepG2 menunjukkan bahwa senyawa 1 yang paling aktif dengan nilai IC<sub>50</sub> 46.77 µg/ml.

**Keyword :** Paliasa (*Kleinhovia Hospita* L), Fraksinasi, Antioksidan, Sitotoksik



## ABSTRACT

**RISKASISWANTI, *The Invitro Antioxidant and Cytotoxic Activities from Paliasa Leaves (Kleinhovia hospita L.)***

**Background:** *Kleinhovia hospita* L. known by the local name "paliasa" is a plant rich in active compounds with various pharmacological activities such as antioxidant, hepatoprotective, and anticancer. Therefore, it is important to examine the antioxidant activity and cytotoxicity of active compounds isolated from *K. hospita* leaves. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity of the fractionated methanol extract of *K. hospita* and test the cytotoxic effect of cycloartane triterpenoid compounds isolated from *K. hospita* leaves against the HepG2 cell line. **Methods:** *K. hospita* leaves were extracted with methanol by maceration. It was then partitioned and fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) method. The fractions obtained were tested for antioxidant activity using DPPH, ABTS, and FRAP methods. Meanwhile, the cytotoxic test of cycloartane triterpenoid isolated from *K. hospita* was tested against HepG2 cell line using the MTT method. **Results:** The extraction of *K. hospita* leaves obtained 47.08 g of methanol extract. The results of fractionation by the VLC method resulted in 15 fractions (A-O). Antioxidant tests with DPPH, ABTS, and FRAP methods showed that fraction D exhibited the strongest antioxidant activity with IC<sub>50</sub> values, respectively, 82.83; 36.50; and 80.33 µg/ml. The cytotoxic test of cycloartane triterpenoid compounds against HepG2 cells using the MTT method showed that compound 1 was the most potent with an IC<sub>50</sub> value of 46.77 µg/ml. **Conclusion:** Fraction D from *K. hospita* leaves extract demonstrated strong antioxidant activity compared to other fractions. While the cytotoxicity test against hepG2 cells indicated that compound 1 was the most active with an IC<sub>50</sub> value of 46.77 µg/ml.

**Keywords:** Paliasa (*Kleinhovia hospita* L), Fractionation, Antioxidant, Cytotoxic

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN .....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS .....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACK.....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	2
BAB II METODE PENELITIAN.....	3
2.1 Jenis Penelitian .....	3
2.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
2.3 Alat dan Bahan.....	3
2.3.1 Alat .....	3
2.3.2 Bahan .....	3
2.4 Prosedur Kerja .....	3
2.4.1 Pengolahan Sampel dari Tanaman Paliasa .....	3
2.4.2 Ekstraksi .....	3
2.4.3 Proses Partisi Ekstrak .....	3
2.4.4 Uji kualitatif antioksidan dengan dpph menggunakan KLT .....	3
2.4.5 Proses fraksinasi ekstrak menggunakan metode KCV .....	4
2.4.6 Antioksidan .....	4
2.4.7 Uji sitotoksik.....	5
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN .....	7
BAB IV KESIMPULAN .....	11
DAFTAR PUSTAKA .....	12

LAMPIRAN.....

14

**DAFTAR TABEL**

1. Tabel 1. Data hasil pengujian antioksidan fraksi D, N, O dan vitamin c dengan metode DPPH .....	7
2. Tabel 2. Data hasil pengujian antioksidan fraksi D, N, O dan vitamin c dengan metode ABTS .....	8
3. Tabel 3. Data hasil pengujian antioksidan fraksi D, N, O dan vitamin c dengan metode FRAP .....	8
4. Tabel 4. Data hasil uji sitotoksik senyawa triterpenoid sikloartan .....	10
5. Tabel 5. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan asam askorbat metode DPPH .....	16
6. Tabel 6. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode DPPH fraksi D .....	18
7. Tabel 7. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode DPPH fraksi N .....	19
8. Tabel 8. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode DPPH fraksi O .....	20
9. Tabel 9. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan asam askorbat metode ABTS .....	22
10. Tabel 10. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS fraksi D .....	23
11. Tabel 11. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS fraksi N .....	25
12. Tabel 12. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS fraksi O .....	26
13. Tabel 13. Hasil pengukuran aktivitas antioksidanasam askorbat metode FRAP .....	27
14. Tabel 14. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode FRAP fraksi D .....	28
15. Tabel 15. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode FRAP fraksi N .....	29
16. Tabel 16. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode FRAP fraksi O .....	31

## DAFTAR GAMBAR

1. Gambar 1. Hasil uji kualitatif (KLT) .....	7
2. Gambar 2. Struktur senyawa triterpenoid sikloartan yang diisolasi dari <i>K. Hospita</i> .....	9
3. Gambar 3. Grafik asam askorbat metode DPPH.....	17
4. Gambar 4. Grafik fraksi D metode DPPH .....	18
5. Gambar 5. Grafik fraksi N metode DPPH .....	20
6. Gambar 6. Grafik fraksi O metode DPPH.....	22
7. Gambar 7. Grafik asam askorbat metode ABTS .....	23
8. Gambar 8. Grafik fraksi D metode ABTS .....	24
9. Gambar 9. Grafik fraksi N metode ABTS .....	25
10. Gambar 10. Grafik fraksi O metode ABTS.....	27
11. Gambar 11. Grafik asam askorbat metode FRAP .....	28
12. Gambar 12. Grafik fraksi D metode FRAP .....	29
13. Gambar 13. Grafik fraksi N metode FRAP .....	31
14. Gambar 14. Grafik fraksi O metode FRAP .....	32
15. Gambar 15. Pengambilan sampel daun paliasa ( <i>kleinhovia hospita L</i> ) .....	33
16. Gambar 16. Proses pengeringan sampel .....	33
17. Gambar 17. Sampel yang telah kering .....	33
18. Gambar 18. Perendaman sampel.....	33
19. Gambar 20. Proses penyaringan .....	33
20. Gambar 20. Proses rotarievaporator .....	33
21. Gambar 21. Proses partisi .....	34
22. Gambar 22. Rotavapor partisi.....	34
23. Gambar 23. Proses fraksinasi.....	34
24. Gambar 24. Hasil fraksinasi .....	34
25. Gambar 25. Penotolan fraksi .....	35
26. Gambar 26. Lempeng KLT sebelum disemprot DPPH dibawah sinar UV 366 nm.....	35
27. Gambar 27. Penyemprotan pada lempeng menggunakan DPPH.....	35
28. Gambar 28. Hasil setelah disemprot DPPH .....	35
29. Gambar 29. Hasil pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH.....	36
30. Gambar 30. Hasil pengujian aktivitas antioksidan metode ABTS.....	36
31. Gambar 31. Hasil pengujian aktivitas antioksidan metode FRAP .....	36

**DAFTAR LAMPIRAN**

1. Lampiran 1. Skema kerja penelitian.....	14
2. Lampiran 2. Perhitungan .....	17
3. Lampiran 3. Foto penelitian .....	33

**DAFTAR SINGKATAN**

---

Lambang/singkatan	Arti dan penjelasan
μ	Mikro
ABTS	2,2- azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid
DPPH	2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
MTT	3- (4,5 dimetiltiazol -2-yl) - 2,5 diphenyl tetrazolium bromide
UV-VIS	Ultraviolet visible

---

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Kleinhovia hospita* L. atau dikenal dengan nama lokal "*paliasa*" oleh suku Makassar di Sulawesi Selatan merupakan salah satu tumbuhan obat yang potensial. Secara tradisional air rebusan daun *K. hospita* digunakan untuk mengobati berbagai penyakit seperti hepatitis dan kanker hati, (Makassar dan Bugis, Sulawesi Selatan); gastritis (Moronene, Sulawesi Tenggara); hipertensi (Wawoni, Sulawesi Tenggara), dan kolesterol tinggi (Lombok, Nusa Tenggara Barat) (Paramita, S. 2016). Tumbuhan *K. hospita* dilaporkan kaya akan senyawa sikloartan triterpenoid (Gan, L. S., et al., 2009; Zhou, C. X., et al. 2013; Rahim, A., et al., 2018).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Rahim, A., et al. (2018) pada tumbuhan *Kleinhovia hospita* yang berasal dari Sulawesi Selatan mendapatkan hasil yaitu tujuh senyawa baru triterpenoid sikloartan. Senyawa sikloartan tersebut ditandai dengan adanya cincin siklopropil dengan stretokomia  $\alpha$  yang jarang ditemukan pada bahan alam. Hasil yang telah dilakukan dilaporkan bahwa cincin dengan stereokimia  $\alpha$  memiliki efek hepatoprotektif yang lebih poten dibandingkan dengan stereokimia  $\beta$ .

Antioksidan merupakan salah satu target dari mekanisme hepatoprotektif (Hanifa, D. D., & Hendriani, R. 2016). Antioksidan dapat memainkan peran dalam mekanisme hepatoprotektif karena pada sebagian besar mekanisme kerusakan hati terdapat keterlibatan stres oksidatif (Domitrović dan Potočnjak, 2016). Pengukuran perbandingan aktivitas antioksidan akan dilakukan secara spektrofotometri UV-Vis dengan metode DPPH (1,1-difenil 2-pikril hidrazil), metode ABTS (2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6-sulfonic acid) dan metode FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

Penggunaan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan dan hepatoprotektif akan membantu menjaga dan memperbaiki fungsi hati. Selain dilaporkan memiliki aktivitas hepatoprotektif, *K. hospita* juga menunjukkan aktivitas antivirus (Rahim, A., et al., 2018) dan antioksidan (Arung, E. T, et al., 2012), sehingga sangat potensial dikembangkan sebagai obat hepatoprotektif.

Terdapat empat isolat sikloartan triterpenoid alkaloid dari *K. hospita*, yaitu Kleinhospitine A, B, C dan D. Kleinhospitine C dan D menunjukkan aktivitas hepatoprotektif terhadap kultur sel hepatosit yang diinduksi kerusakan dengan  $H_2O_2$  (Zhou et al., 2013). Penelitian lain menunjukkan adanya empat triterpenoid sikloartan yang diisolasi dari *K. hospita*, memberikan efek hepatoprotektif pada sel karsinoma hepatoseluler (HepG2) yang diinduksi sitotoksitas oleh nitrofurantoin (Gan et al., 2009). Penggunaan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan dan hepatoprotektif akan membantu menjaga dan memperbaiki fungsi hati. Selain dilaporkan memiliki aktivitas hepatoprotektif, *K. hospita* juga menunjukkan aktivitas antivirus (Rahim, A., et al., 2018) dan antioksidan (Arung, E. T, et al., 2012), sehingga sangat potensial dikembangkan sebagai obat hepatoprotektif.

Penelitian mengenai efek sitotoksik tanaman paliasa telah dilakukan oleh Morilla et al. (2015) menggunakan ekstrak etanol kulit batang dan batang dari ekstrak etanol dengan nilai  $LC_{50}$  452,03  $\mu$ g/mL. Ekstrak metanol daun, batang, dan kulit batang paliasa telah diteliti memiliki aktivitas sitotoksik pada sel hepatoma dan dapat menghambat sel murine leukemia (P388) dengan  $IC_{50}$  56  $\mu$ g/mL (Nurhidayah et al., 2013). Rebusan kulit kayu dan batang paliasa juga mempunyai aktivitas sitotoksik dengan nilai  $LC_{50}$  698,54  $\mu$ g/mL (Morilla et al., 2015).

Penelitian tentang uji antioksidan dan sitotoksik daun paliasa terhadap sel HepG2 telah dilakukan sebelumnya oleh Arung, E. T., et al. (2009). Dalam penelitian tersebut digunakan ekstrak kasar dari daun *K. hospita*. Sebagai kelanjutan dari penelitian tersebut, telah dilakukan uji antioksidan dari hasil fraksinasi ekstrak metanol dan uji sitotoksik terhadap beberapa senyawa aktif triterpenoid sikloartan yang diisolasi dari *K. hospita*.



## 1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan fraksi daun *Kleinhovia hospita* L. secara *in vitro*
2. Bagaimana aktivitas sitotoksik senyawa triterpenoid sikloartan terhadap sel HepG2

## 1.3 Tujuan penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah :

1. Menganalisis aktivitas antioksidan hasil fraksinasi dari ekstrak daun *Kleinhovia hospita* L. menggunakan metode DPPH, ABTS, dan FRAP.
2. Menganalisis aktivitas sitotoksik secara *in vitro* dari senyawa triterpenoid sikloartan terhadap sel HepG2

## 1.4 Manfaat penelitian

Secara umum hasil dari penelitian ini diperoleh informasi ilmiah aktivitas antioksidan dari hasil fraksinasi ekstrak daun *K. hospita* dan efek sitotoksik dari beberapa senyawa triterpenoid sikloartan *Kleinhovia hospita* L terhadap sel line HepG2. Sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi senyawa bioaktif yang bertanggung jawab terhadap efek antioksidan dan sitotoksik dari daun *Kleinhovia hospita* L.

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian menggunakan rancangan eksperimen.

#### 2.2 waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada juni 2022 sampai januari 2023, dimana pengambilan daun paliasa dilakukan di sekitaran kampus Universitas Hasanuddin. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fitokimia dan Biofarmaka Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

#### 2.3 Alat dan bahan

##### 2.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah corong, neraca digital, blender, spektrofotometer UV-Vis, alat-alat gelas cawan porselin, corong pisah, seperangkat alat kromatografi cair vakum, labu ukur, rotary evaporator, pipet ukur, pipet tetes.

##### 2.3.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan yaitu Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* L.), metanol, *n*-heksan, etil asetat, aluminium foil, aquadest, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sel hepatoma HepG2 (ATCC), Metanol p.a, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat), asam trikloroasetat (TCA), NaOH, Kalium Ferrisianida, Kalium persulfat ( $K_2S_2O_8$ ),  $FeCl_3$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ , etanol p.a, Asam askorbat (Vitamin C), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dari sigma, dan isopropanolol dan HCL dari merck digunakan dalam pengujian MTT.

#### 2.4 Prosedur Kerja

##### 2.4.1 Pengolahan sampel dari tanaman paliasa

Sampel daun paliasa (*Kleinhovia hospita*) yang telah dikumpulkan dipisahkan dari kotoran dan daun yang rusak, kemudian sampel dicuci dengan air mengalir hingga bersih. Setelah itu sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Setelah kering dibuat serbuk dan siap untuk di ekstraksi.

##### 2.4.2 Ekstraksi

Serbuk daun paliasa 300 gram dimasukkan dalam wadah maserasi kemudian ditambahkan pelarut metanol 2.5 L sampai terendam sempurna. Kemudian didiamkan selama tiga hari dan sesekali diaduk kemudian di saring. Setelah itu ampas ditambahkan lagi dengan pelarut metanol dengan cara dan perlakuan yang sama. Hal ini dilakukan sebanyak tiga kali. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak metanol kental 47.08 gram.

##### 2.4.3 Proses partisi ekstrak (Saputra et al, 2018)

Ekstrak metanol daun paliasa 47,08 gram dipartisi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksan dan etil asetat. Partisi dilakukan sebagai berikut: Ekstrak daun paliasa ditambahkan dengan pelarut methanol:air (9:1) kemudian dimasukkan kedalam corong pisah dan ditambahkan pelarut *n*-heksan sebanyak 250 ml. Campuran dikocok 2-3 menit kemudian diamkan hingga terbentuk lapisan antara *n*-heksan dan methanol:air. Lapisan *n*-heksan di tampung kemudian lapisan metanol air dimasukkan kembali kedalam corong pisah dan ditambahkan kembali dengan *n*-heksan 250 ml. Proses tersebut diulang sampai 3 kali. Lapisan *n*-heksan digabungkan dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak *n*-heksan kental.

Lapisan metanol:air diuapkan kemudian dipartisi kembali dengan 250 ml etil asetat dengan cara dan perlakuan yang sama sebanyak 3 kali. Lapisan etil asetat dihasilkan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak etil asetat kental 19.09 gram.

##### 2.4.4 Uji kualitatif antioksidan dengan DPPH menggunakan kromatografi lapis tipis

Ekstrak daun paliasa dilarutkan dengan pelarut 1 ml setelah itu ditotolkan kedalam lempeng. kemudian dimasukkan kedalam camber yang berisi eluen *n*-heksan etil asetat (4:1), setelah elusi selesai, lempeng diamati dibawah lampu uv 254/366 dan setelah itu disemprot dengan larutan 0,05 mM DPPH. Uji

positif yang bersifat antioksidan menghasilkan bercak kuning dengan latar belakang ungu dalam waktu 20 menit.

#### 2.4.5 Proses fraksinasi ekstrak menggunakan metode kromatografi kolom cair vakum (Mutmainnah, et al 2017)

Ekstrak etil asetat ditambahkan pelarut dan silika gel secukupnya, lalu diaduk hingga homogen dan menjadi serbuk kering. Kemudian fase gerak dimasukkan pada kolom yang telah ditekan agar menjadi padat dengan tingkat kepolarannya secara gradien, yaitu n-heksana 100%, n-heksan:etilasetat (9:1), (8:1), (7:1), (6:1), (5:1), (1:1), (1:5) 2, etil asetat 100 % , metanol. Fraksi yang diperoleh diidentifikasi secara klt. Fraksi yang memiliki kesamaan profil klt disatukan sehingga diperoleh 15 fraksi gabungan.

#### 2.4.6 Antioksidan

##### 2.4.6.1 Metode DPPH (2,2 dipenyl-1-picrylhidrazyl) (Maesaroh, K, dkk, 2018)

a. Pembuatan reagen DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 7,89 mg, kemudian dilarutkan dalam metanol absolut dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) dan Serapan Blanko

Larutan DPPH dipipet sebanyak 1000  $\mu$ l kemudian dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol absolut pada labu tentukur dan didiamkan selama 30 menit, kemudian diukur panjang gelombang maksimal dan serapannya. Semua pengerjaan dilakukan pada ruang yang terhindar dari cahaya matahari.

c. Pengukuran sampel

Larutan fraksi 10 ml dipipet masing-masing 125, 250, 375, 500 dan 625  $\mu$ l, lalu masing-masing ditambah 1000  $\mu$ l DPPH dan dicukupkan volumenya dengan metanol absolut hingga 5 ml dalam labu tentukur, sehingga didapatkan seri konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Larutan ini kemudian dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Serapan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (516 nm).

$$\%inhibisi = \left(1 - \frac{As}{Ak}\right) \times 100\%$$

Dengan : Ak = serapan control  
As = serapan sampel

d. Analisis data

IC<sub>50</sub> sediaan sampel terhadap larutan DPPH ditentukan dari persamaan regresi linier yang dihasilkan dari pengukuran variasi konsentrasi sampel terhadap larutan DPPH

e. Perbandingan vitamin c

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu tentukur 10 mL. Larutan vitamin C dipipet masing-masing 10, 20, 30, 40 dan 50  $\mu$ L dari larutan stok ke dalam labu tentukur 5 mL hingga diperoleh konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan dpph 1000 MI dan dicukupkan volumenya hingga 5 ml dengan metanol p.a. selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dan diukur serapannya dengan spektrofotometer.

##### 2.4.6.2 metode ABTS (Wahyono, dkk., 2018)

a. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak daun paliasa

Ekstrak daun paliasa ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu tentukur 10 mL (larutan stok konsentrasi 1.000 ppm).

b. Pembuatan Larutan Stok ABTS

ABTS ditimbang sebanyak 20,3 mg dan dilarutkan dengan 5 mL air suling. Selanjutnya kalium persulfate ditimbang sebanyak 3,5 mg dan dilarutkan dengan 5 mL air suling. Kedua larutan tersebut dicampurkan dan volumenya dicukupkan dengan metanol p.a sampai 25 mL, kemudian diinkubasi selama 16 jam diruangan gelap.

c. pengukuran sampel

Larutan stok fraksi daun paliasa dipipet masing-masing 40, 80, 120, 160 dan 200  $\mu$ L dari larutan stok ke dalam labu tentukur 5 mL hingga diperoleh konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm. Kemudian ditambahkan 1000  $\mu$ L larutan ABTS pada setiap seri konsentrasi dan dicukupkan volumenya ad 5 ml dengan metanol absolute. Selanjutnya diinkubasi di suhu ruang

dengan ruang gelap selama 30 menit, setelah 30 menit serapannya diukur dengan spektrofotometer uv-vis dengan panjang gelombang maksima 734 nm.

d. Pembeding vitamin c

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu tentukur 10 mL. Larutan vitamin C dipipet masing-masing 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 40  $\mu$ L dan 50  $\mu$ L dari larutan stok ke dalam labu tentukur 5 mL hingga diperoleh konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm. Kemudian ditambahkan 1000  $\mu$ L larutan ABTS pada setiap seri konsentrasi dan dicukupkan volumenya ad 5 ml dengan metanol absolute. Selanjutnya diinkubasi di suhu ruang dengan ruang gelap selama 30 menit, setelah 30 menit serapannya diukur dengan spektrofotometer uv-vis dengan panjang gelombang maksima 732 nm.

#### 2.4.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode FRAP (Vijayalakshmi dan Ruckmani, 2016)

a. Larutan kalium ferrisianida 1%

Kalium ferrisianida ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL dalam labu tentukur.

b. Larutan  $\text{FeCl}_3$  0,1%

$\text{FeCl}_3$  ditimbang 0,1 g dan dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL dalam labu tentukur.

c. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%

TCA ditimbang 10 g dan dilarutkan dengan air suling hingga 100 mL dalam labu tentukur.

d. Pembuatan dan Pengukuran Serapan Larutan FRAP

Dapar fosfat pH 6,6 dipipet Sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL kalium ferrisianida dipipet ke dalam labu tentukur 5 mL. Kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah diinkubasi larutan ditambahkan 1 mL TCA dan larutan disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifuge supernatan dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1 mL air suling serta 0,5 mL  $\text{FeCl}_3$  dan dihomogenkan. Larutan didiamkan lagi selama 10 menit kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombangnya 724 nm.

e. Pengukuran sampel

Larutan stok fraksi *K. hospita* dipipet masing-masing 300, 600, 900, 1200, dan 1500 ppm ke dalam labu tentukur 5 mL. Kemudian masing masing konsentrasi dicuplik 1 mL dan ditambahkan masing-masing 1 mL dapar fosfat 0,2 N (pH 6,6) serta 1 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1%. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL larutan TCA 10% dan ditambahkan 1 mL air suling dan 0,5 mL  $\text{FeCl}_3$  0,1% dan dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 10 menit kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 724 nm.

f. Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu tentukur 10 mL. Larutan vitamin C dipipet masing-masing 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm ke dalam labu tentukur 5 mL. Kemudian masing masing konsentrasi dicuplik 1 mL dan ditambahkan masing-masing 1 mL dapar fosfat 0,2 N (pH 6,6) serta 1 mL  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1%. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit dengan suhu 50°C. Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL larutan TCA 10% dan ditambahkan 1 mL air suling dan 0,5 mL  $\text{FeCl}_3$  0,1% dan dihomogenkan. Larutan didiamkan selama 14 menit kemudian serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 724 nm.

#### 2.4.7 Uji sitotoksik (Vakele, et al,2022)

1. Preparasi kultur sel

Kultur sel disiapkan dan sel-sel dikultur dengan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) yang dilengkapi dengan 10% foetal bovine serum (FBS), koktail pen-strep 1% dari 100  $\mu$ g/ml penisilin dan 100  $\mu$ g/ml streptomisin. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dalam 5%  $\text{CO}_2$  inkubator yang dilembabkan. Sel-sel disemaikan pada kerapatan  $1 \times 10^5$  sel/ml dalam 96-well plate dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Viabilitas sel dievaluasi dengan pengamatan langsung dibawah sistem pencitraan inti EVOS XL.

## 2. Identifikasi aktivitas sitotoksik menggunakan uji 3, 4, 5-dimetiltiazol-2-il-2, 5-difeniltetrazolium bromida (MTT)

Aktivitas mitokondria sel diukur menggunakan spektrofotometer melalui reduksi garam MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna ungu oleh enzim suksinat tetrazolium reduktase atau suksinat dhidrogenase, yang hanya ada dalam sel aktif secara metabolik. Semakin pekat warna ungu pada reaksi, semakin sedikit tingkat senyawa tertentu yang menginduksi kematian sel pada reaksi spesifik. Sitotoksitas dari ekstrak tanaman dalam jalur sel diukur dengan dua putaran prosedur skrining secara berurutan menggunakan MTT. Stok larutan senyawa disaring menggunakan penyaring jarum suntik millipore 0,22  $\mu\text{m}$  untuk memastikan kemurniannya. Senyawa stok aru disiapkan dalam 100% DMSO diuat hingga 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  menggunakan 5% DMEM. Penyaringan awal dilakukan dengan menguji sitotoksitas ekstrak fitokimia pada sel HepG2 yang di semaikan dalam mikrotiter 96 well plate (100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) dan diberi perlakuan dengan konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dari senyawa selama 24 jam. Setelah perawatan, 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ ml MTT ditambahkan ke masing-masing wells sel dan wells kontrol (mengandung 10% DMSO dan jalur sel) dalam triplikasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam. Kriztal formazan yang tidak larut dilarutkan dengan menambahkan 100  $\mu\text{l}$  DMSO. Reduksi MTT (absorbansi) diaca pada 570 nm menggunakan microplate reader. Sitotoksitas dihitung berdasarkan rumus berikut :

$$\text{sitotoksitas (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{absorbansi rata} - \text{rata sel yang dirawat}}{\text{rata} - \text{rata serapan kontrol}} \right) 100$$