

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obat tradisional merupakan warisan turun temurun dari nenek moyang yang berakar kuat dalam budaya bangsa dan dalam pengobatan masih berdasarkan pengalaman yang diturunkan dari generasi ke generasi. Secara empiris masyarakat Nias memanfaatkan batang ciplukan sebagai obat tradisional untuk penyakit hipertensi (Laia, 2022).

Masyarakat desa Watmuri, kepulauan Tanimbar menggunakan daun ciplukan sebagai obat tradisional untuk menabuh darah dan menghilangkan pegal linu, akar, buah, dan daun juga dimanfaatkan sebagai obat asma (Batalajery, 2022). Masyarakat etnis Bali dan Jawa di desa Simpang Bayat menggunakan seluruh bagian tumbuhan ciplukan untuk mengobati cacar air. Masyarakat suku Melayu di desa Sungai Serabek dan Desa Sungai Baru, menggunakan buah ciplukan sebagai obat batuk, demam, diare, hipertensi, pegal linu dan sakit pinggang (Sholichin, 2020; Pranaka, 2020).

Antioksidan merupakan molekul stabil yang dapat menghambat reaksi oksidasi yang akan menyumbangkan elektron ke radikal bebas kemudian menetralkannya. Molekul yang reaktif akibat kerusakan sel, asam lemak tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, asam deoksiribonukleat dan jaringan lipid sehingga menimbulkan penyakit didalam tubuh. Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas atau suatu bahan yang berfungsi mencegah sistem biologi tubuh dari efek merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi yang menyebabkan oksidasi berlebihan (Niah dan Helda 2016; Juwita, 2011).

Pemberian senyawa antioksidan berfungsi mengatasi atau menetralkan radikal bebas sehingga kerusakan sel tubuh dapat dihambat serta dapat mencegah terjadinya kerusakan tubuh dan timbulnya penyakit degenerative. Antioksidan alami yang terkandung dalam tumbuhan umumnya merupakan senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, flavanon, isoflavone, katekin dan kalkon (Winarsi, 2007; Marxen, *et.al*, 2007).

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung atau lebih elektron tidak berpasangan dan sangat reaktif sehingga menjadi stabil ia cenderung akan mengambil elektron dari molekul lain yang menimbulkan tidak normalnya molekul lain dan dapat



merusak jaringan lain sehingga diperlukan senyawa yang dapat meredam efek negatif dari radikal bebas yaitu antioksidan. Radikal bebas dapat bereaksi dengan protein, asam-asam lemak, bahkan DNA sehingga dapat menimbulkan penyakit. Kerusakan pada sel dan jaringan yang sebagian besar disebabkan oleh radikal bebas. Manusia dapat memproduksi senyawa-senyawa yang dapat berperan aktif dalam menanggulangi radikal bebas, seperti enzim *superoxide dismutase* dan *glutathione* namun jumlahnya seringkali tidak mencukupi sehingga dibutuhkan asupan makanan yang banyak mengandung antioksidan seperti vitamin C, E, betakaroten maupun antioksidan sehingga dapat melindungi diri dari radikal bebas (Jami'ah dkk, 2018; Kumalaningsih, 2006).

Salah satu sumber antioksidan dari tanaman yaitu ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang merupakan jenis tanaman obat yang secara klinis terbukti memiliki kandungan aktif yaitu steroid, flavonoid, alkaloid. Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara menyumbangkan satu elektron pada electron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Windono, *et.al.* 2001).

Herba dari tanaman ciplukan terdapat kandungan senyawa fisalin B, fisalin D, fisalin F, withangulatin A. Pada bagian biji terdapat 12-25% protein, 15-40% minyak lemak dengan komponen utama asam palmitat dan asam stearat, bagian akar terdapat alkaloid dan bagian daun terdapat glikosida flavonoid dalam bentuk luteolin dan pada bagian tunas terdapat flavonoid dan saponin (Latifah, *et.al.* 2015). Ciplukan dapat dimanfaatkan sebagai anti hiperglikemik, antibakteri, antivirus, imunostimulan dan imunosupresan (imunomodulator), antiinflamasi, antioksidan, analgesik, dan sititoksik. Buah ciplukan sendiri sering dimakan langsung untuk mengobati epilepsi, sulit buang air kecil dan penyakit kuning. Tanaman ciplukan yang digunakan sebagai obat adalah seluruh bagian dari tanaman, baik segar maupun telah dikeringkan. Ciplukan juga merupakan jenis tanaman herbal liar yang berperan sebagai penghilang nyeri dan penetral racun. Manfaat lain dari ciplukan yaitu mampu menghambat penyakit seperti hepatitis, dermatitis, asma, malaria, hipertensi, gusi berdarah dan bisul (Sasmito, 2017; Marpaung, dkk. 2015)

Penelitian yang dilakukan oleh Ikpefan, dkk (2024) menyatakan bahwa ekstrak daun *Physalis angulata* L. menunjukkan kandungan senyawa saponin, alkaloid, flavonoid, dan terpenoid.



Penelitian yang dilakukan oleh Krishna, dkk. (2013) menunjukkan bahwa ekstrak air daun ciplukan pada konsentrasi 25 mg/ml dapat menghambat radikal bebas dengan konsentrasi hambat sebesar 92,31%. Penelitian Nuranda, dkk. (2016) tentang potensi tumbuhan ciplukan (*Physalis angulata* Linn.) sebagai antioksidan alami menunjukkan bahwa ekstrak metanol batang mengandung alkaloid dan flavonoid, sedangkan bagian buah hanya mengandung alkaloid dengan nilai IC_{50} dibawah 100 ppm. Flavonoid yang terdapat dalam batang ciplukan mampu menekan pembentukan radikal bebas dengan cara menghambat enzim atau dengan pengkhelatan ion logam (*metal ion chelating*) yang terlibat dalam produksi radikal bebas, sedangkan alkaloid dalam batang dan buah berpotensi menghambat berbagai proses oksidatif. Penelitian Sari, (2018) Fraksi etil asetat herba ciplukan memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat dengan nilai IC_{50} 213,34 μ g/mL mendekati quarcetin IC_{50} 3,85 μ g/mL sebagai kontrol positif. Devitria, dkk. (2020) menyatakan bahwa ekstrak metanol daun ciplukan memiliki aktivitas antioksidan lemah dengan nilai IC_{50} sebesar 820,56 ppm. Berdasarkan hasil penelitian diatas maka ciplukan memiliki potensi sebagai antioksidan sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi komponen senyawa yang terkandung dalam berbagai bagian tanaman ciplukan dan pengujian aktivitas antioksidannya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* Linn.) menggunakan metode DPPH, FRAP, CUPRAC, ABTS dan β -Carotene Bleaching?
2. Mengetahui profil kimia yang terdapat pada berbagai bagian tanaman ciplukan (*Physalis angulata* Linn.) dengan metode kromatografi lapis tipis?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Melihat aktivitas antioksidan dari akar, batang, daun dan buah dengan menggunakan metode DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP, dan β -Carotene Bleaching.
2. Melihat profil fitokimia dari akar, batang, daun dan buah tanaman ciplukan menggunakan kromatografi lapis tipis.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Diperoleh informasi tentang aktivitas antioksidan dari tanaman ciplukan.

Diperoleh informasi tentang komponen kimia yang terdapat pada bagian tanaman ciplukan



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 LOKASI DAN WAKTU

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar dan Laboratorium Stifa Makassar.

2.2 POPULASI DAN SAMPEL

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan Ciplukan. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbagai bagian tanaman akar, batang, daun, dan buah ciplukan (*Physalis angulata* Linn). yang diperoleh dari Desa Benteng kabupaten Pinrang Sulawesi Selatan.

2.3 ALAT

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, Batang penganduk, Corong (Pyrex®), Cawan porselin (Pyrex®), Erlenmeyer (Pyrex®), Gelas kimia (Pyrex®), Gelas Ukur (Pyrex®), Labu ukur (Pyrex®), Mikropipet (*Dragonlab Micropipette Bio red*®), pipet tetes, plat KLT silika Gel F₂₅₄, *rotary vacuum evaporator* (Heidolph), *ultrasonic cleaning bath*, timbangan analitik (*Mettler toledo*®), dan Vortex (*Velp Scientifica*®).

2.4 BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah β -carotene (TCI, Japan), CuCl₂, etanol p.a, etanol 70%, etil asetat, ekstrak etanol 70% sampel, DPPH, kuersetin, metanol p.a, Aquadest (*One Med*®), AlCl₃, asam linoleat (*Alorich*), Dragendroff, DPPH, FeCl₃, Kloroform (*Merk*, Germany), n-hexana, pereaksi Libermann-Buchard, pereaksi FeSO₄ dan Tween 20.

2.5 PROSEDUR KERJA

2.5.1 Pengolahan sampel tanaman ciplukan.

Sampel dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* Linn.) yang telah dikumpulkan dilakukan sortasi basah untuk mengurangi kotoran yang terdapat pada tanaman kemudian tanaman di pisahkan menjadi bagian akar, batang, daun dan buah. Bagian tanaman yang telah dipisahkan kemudian dikeringkan terlindung dari sinar matahari langsung.

2 Ekstraksi ciplukan dengan metode sonikasi

Serbuk simplisia dari masing-masing bagian tanaman akar, batang, daun dan buah dimasukkan kedalam wadah (toples) yang terpisah dan diberi tanda kemudian ditambahkan dengan



pelarut etanol 70% hingga sampel terendam. Sampel di sonikasi dalam *ultrasonic cleaning bath* 42 kHz selama 15 menit, selanjutnya dilakukan penyaringan dan filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dilakukan perhitungan rendemen yang dihasilkan dari tiap bagian-bagian tanaman (Kautsari, dkk. 2020).

2.5.3 Metode Kromatografi Lapis Tipis

Skrining Fitokimia dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam Silica gel G60 F254.

Ekstrak ditotolkan pada batas bawah fase diam dan dimasukkan ke dalam chamber yang berisi fase gerak yang telah dijenuhkan kemudian dibiarkan terelusi oleh fase gerak hingga batas atas lempeng kemudian dideteksi dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Hasil uji komponen kimia dapat dilihat dengan menggunakan penampak bercak dengan cara menyemprotkan lempeng KLT dengan reagen yang sesuai.

2.5.4 Aktivitas Antioksidan

2.5.4.1 Metode DPPH

a. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM

Larutan stok dibuat dengan cara ditimbang 7,884 mg DPPH (BM 394,33). Kemudian larutkan dengan etanol p.a, dan masukkan kedalam labu ukur 50 ml yang dilapisi dengan aluminium foil, dicukupkan pelarutnya hingga tanda batas kemudian homogenkan.

b. Pembuatan dan pengukuran Larutan Pembanding

Larutan stok dibuat dengan cara menimbang kuersetin 1 mg kuersetin, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a, homogenkan lalu dicukupkan volumennya hingga 1 ml selanjutnya dibuat variasi konsentrasi 4 ppm, 8 ppm, 12 ppm, 16 ppm, dan 20 ppm. Diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 520 nm.

c. Pengukuran absorbansi antioksidan ekstrak dari berbagai bagian tanaman ciplukan

Ditimbang masing-masing ekstrak sebanyak 10 mg/1 ml etanol 70% (10.000 ppm). Kemudian dilakukan pengenceran dengan memipet 100 μ l/1 ml (1000 ppm), Kemudian dipepipet 900 μ l, dan selanjutnya 500 μ l etanol pa kedalam masing masing mikrotube sampel, kemudian sampel di pipet sebanyak 500 μ l dari konsentrasi sampel 10.000 ppm kedalam masing-masing mikrotube sehingga diperoleh konsentrasi 250, 125, 62,5, dan 312,5 ppm. Sampel Daun sebanyak 20 μ l, Buah 100 μ l, Akar 100 μ l, dan Batang 100



μl , masing-masing dipipet kedalam *mikroplate reader* kemudian ditambahkan blanko DPPH 100 μl dan etanol p.a di cukupkan hingga 200 μl . Diinkubasi selama 30 menit dan absorbansinya dibaca pada Panjang gelombang 520 nm. Sampel dibuat dengan 3 replikasi (Devitria, 2020).

2.5.4.2 Metode ABTS

a. Pembuatan larutan pembanding kuarsetin

Kuersetin dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm dengan menimbang sebanyak 1 mg kuersetin dilarutkan dengan etanol p.a 1 ml. Dibuat seri konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dimasukkan kedalam *mikroplate reader* dan ditambahkan ABTS 80 μl dan etanol pa dicukupkan hingga 200 μl . Diinkubasi selama 30 menit, dan diukur pada panjang gelombang 740 nm.

b. Pembuatan larutan Blanko ABTS

- Larutan ABTS: Ditimbang ABTS 8,974 mg larutkan dengan 5 ml aquadest.
- Larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$: Ditimbang Kalium persulfat sebanyak 4 mg dilarutkan dengan akuades sebanyak 5 ml.
- Larutan stok ABTS: Sebanyak 5 mL larutan ABTS ditambahkan 5 mL larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ diinkubasi di ruang gelap suhu kamar 22-24°C selama 12-16 jam sebelum digunakan serta menghasilkan ABTS warna biru.

c. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel

Larutan stok sampel 10.000 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg, dilarutkan menggunakan etanol 70% sebanyak 1 mL (10.000 ppm). Kemudian dilaukan pengenceran dengan mepipet 100 μl /1 ml (1000 ppm), Kemudian dipepipet 900 μl , dan selanjutnya 500 μl etanol pa kedalam masing masing mikrotube sampel, kemudian sampel di pipet sebanyak 500 μl dari konsentrasi sampel 1000 ppm kedalam masing-masing mikrotube sehigga diperoleh konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25 ppm. Dipipet sampel daun sebanyak 30 μl ditambahkan dengan 100 μl ABTS dan di cukupkan dengan etanol p.a hingga 200 μl . Dipipet sampel Akar sebanyak 100 μl , di tambahkan dengan ABTS 80 μl dan di cukupkan dengan etanol p.a hingga 200 μl . Dipipet sampel batang sebanyak 80 μl ditambahkan dengan 80 μl ABTS dan dicukupkan dengan etanol p.a 200 μl . Dipipet sampel buah 80 μl di tambahkan dengan ABTS 80 μl dan dicukupkan dengan etanol p.a hingga 200 μl . Kemudian



diinkubasi selama 30 menit dan diukur pada panjang gelombang 740 nm. Sampel dibuat 4 replikasi. (Faisal, 2019).

2.5.4.3 Metode β -Carotene Bleaching

a. Penyiapan Emulsi β -Carotene

Disiapkan emulsi β -Carotene dengan menimbang sebanyak 2 mg serbuk β -Carotene dilarutkan dengan 0,2 mL kloroform dan penambahan 0,2 mL asam linoleat serta tween 20 sebanyak 2 mL dan dicukupkan hingga 100 mL dengan aquadest. Kemudian dihomogenkan dengan menggunakan alat vortex hingga diperoleh larutan yang transparan.

b. Pengujian Aktivitas Antioksidan β -Carotene Bleaching

Larutan Stok yang telah dibuat masing-masing dipipet dengan 5 konsentrasi sampel dan quersetin sebagai pembanding dengan variasi konsentrasi 10, 20, 30 40, 50 ppm. Selanjutnya dipipet 100 μ l dicukupkan volumenya hingga 200 μ l dengan aquadest. diinkubasi pada suhu 50°C selama 20 menit. Setelah masa inkubasi kemudian diukur pada panjang gelombang 460 nm dan pengukuran dimonitoring selama 2 jam. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan perubahan degradasi sampel dan kontrol BCB. Persen penghambatan laju degradasi β -carotene dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Penghambatan laju degradasi} = \ln [(a/b) \times (1/t) \times 100]$$

Dimana a, absorbansi kontrol (tanpa sampel), b adalah absorbansi sampel setelah inkubasi 20 menit dan t adalah absorbansi sampel setelah inkubasi 2 jam. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan cara memplot persen penghambatan terhadap masing-masing konsentrasi sampel (Wardaniyati, 2019).

d. Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan uji serta larutan sampel. Persentase inhibisi dapat dihitung menggunakan persamaan (Devitria, 2020):

$$\text{Inhibisi} = \frac{A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{Kontrol}}} \times 100 \%$$



Keterangan : A_{kontrol} = Absorbansi tidak mengandung sampel

A_{sampel} = Absorbansi sampel

Adapun rumus persamaan linier sebagai berikut: $Y=aX+b$

Keterangan : Y = Absorbansi sampel

X = Konsentrasi sampel

Hasil perhitungan dari aktivitas antioksidan dimasukkan kedalam persamaan garis $y = a + bx$ dengan konsentrasi (ppm) sebagai absis (sumbu x) dan nilai persentase aktivitas antioksidan sebagai ordinatnya (sumbu y) nilai IC_{50} dari perhitungan pada saat persentase aktivitas antioksidan sebesar 50% akan diperoleh dari persamaan garis (Chandra, dkk.2019).

e. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan pengukuran absorbansi sampel dan menggunakan rumus persentase inhibisi, Data dianalisis dengan cara membuat kurva kalibrasi kemudian dimasukkan kedalam persamaan regresi linier dari konsentrasi larutan dengan persentase inhibisi dan selanjutnya dihitung nilai IC_{50} (Devitria, dkk. 2020).

2.5.4.4 Metode CUPRAC

a. pembuatan Larutan Stok Asam Galat

Dibuat larutan stok asam galat dengan cara ditimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 10 mL dalam labu ukur (1000 $\mu\text{g/mL}$).

b. Pembuatan Larutan CuCl_2

Ditimbang CuCl_2 sebanyak 268,9 mg kemudian dilarutkan dengan aquadest dan dicukupkan dengan labu ukur hingga 100 mL, lalu digojok hingga homogen dan dipindahkan ke dalam botol coklat.

c. Pembuatan Larutan Neocuproine

Ditimbang neocuproine sebanyak 78 mg kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dan dicukupkan volume akhir dalam labu ukur 50 mL, lalu digojok hingga homogen dan dipindahkan ke dalam botol coklat

d. Pembuatan larutan ammonium asetat

Ditimbang Amonium asetat sebanyak 3,5 g kemudian dilarutkan dengan aquadest dan dicukupkan volume akhir dalam labu ukur hingga 50 mL, lalu digojok hingga homogen dan dipindahkan ke botol coklat.



e. Pengukuran Antioksidan

Larutan stok ekstrak etanol 70% akar dipipet sebanyak 40 μL , batang 80 μL , daun 5 μL , dan buah 40 μL , kemudian ditambahkan CuCl_2 40 μL , Neocuproine 40 μL , Amonium Asetat 40 μL , dicukupkan volumenya dengan aquades hingga 200 μL . campuran larutan diinkubasi selama 30 menit, serapan diukur pada panjang gelombang 410 nm.

GAEAC (*Galate Acid Equivalent Antioxidant Capacity*) sampel diperoleh dengan menghitung absorbansi sampel terhadap seri konsentrasi larutan standar asam galat dan dicatat sebagai equivalent dengan $\mu\text{Mol/g}$ sampel yang diperoleh dari hasil kurva kalibrasi dengan persamaan $y = bx + a$, dimana profil aktivitas antioksidan diperoleh dengan menginterpolasikan nilai absorbansi sampel sebagai nilai (y) sehingga profil aktivitas antioksidan sebagai nilai (x) pada sampel dapat diketahui.

$$\text{GAEAC} = \frac{(C \times 1/1000) \times V \times FP}{\text{berat sampel (g)}}$$

Rumus dalam penentuan aktivitas potensi dalam mereduksi ion cupri dimana C adalah konsentrasi sampel, V adalah volume sampel (ml), FP adalah faktor pengenceran dan BS adalah bobot sampel (g) yang digunakan (Nur, 2022).

2.5.4.5 Metode FRAP (Sami,2017)

a. Penyiapan Larutan

1. Larutan 3 mM FeCl_3 dalam asam sitrat 5 mM (50 ml)

Dilarutkan 23,33 mg serbuk FeCl_3 dan dilarutkan dalam 50 ml larutan asam sitrat 5 mM (48 mg dalam 50 ml H_2O).

2. Larutan 1 mM TPTZ dilarutkan dalam HCL 0,05 M sebanyak 100 ml. Campuran dihomogenkan dengan cara divortex.

3. Pembuatan Kurva Baku FeSO_4

Dibuat larutan kurva baku besi (II) sulfat dengan seri konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 ppm.

4. Pengukuran Antioksidan Sampel

Larutan stok ekstrak etanol 70% akar dipipet sebanyak 100 μL , batang 120 μL , daun 50 μL , dan buah 100 μL , kemudian ditambahkan TPTZ 50 μL , FeCl_3 30 μL dicukupkan volumenya dengan Buffer asetat pH 3,6 hingga 200 μL . campuran larutan diinkubasi selama 30 menit, pada panjang gelombang 590 nm.

