

SKRINING, FRAKSINASI DAN UJI AKTIVITAS
ANTIRADIKAL BEBAS EKSTRAK DAUN ANGSANA
(*Pterocarpus indica* Willd.), DAUN AKASIA (*Acacia* sp.
Willd.), DAUN KUPU-KUPU (*Bauhinia purpurea* Linn.),
DAN DAUN FLAMBOYAN (*Delonix regia* Raf.)

MURNI SIMIN
H 511 03 010



8 - 12 - 2007
fak. farmasi
(satu)
Hadiah
47
SKR-FOJ
SIM ->

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2007

**SKRINING, FRAKSINASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL BEBAS
EKSTRAK DAUN ANGSANA (*Pterocarpus indica* Willd.), DAUN
AKASIA (*Acacia* sp. Willd.), DAUN KUPU-KUPU (*Bauhinia purpurea*
Linn.), DAN DAUN FLAMBOYAN (*Delonix regia* Raf.)**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**MURNI SIMIN
H 511 03 010**

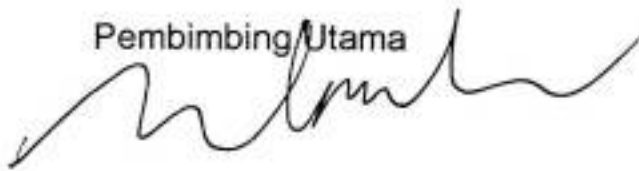
**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2007**

SKRINING, FRAKSINASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIRADIKAL BEBAS
EKSTRAK DAUN ANGSANA (*Pterocarpus indica* Willd.), DAUN AKASIA
(*Acacia* sp. Willd.), DAUN KUPU-KUPU (*Bauhinia purpurea* Linn.), DAN
DAUN FLAMBOYAN (*Delonix regia* Raf.)

MURNI SIMIN
H 511 03 010

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama



(Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.)
NIP : 131 876 917

Pembimbing Pertama,



(Mufidah, S.Si., M.Si., Apt)
NIP : 132 240 180

Pembimbing Kedua,



(Dra. Christiana Lethe M.Si., Apt)
NIP : 131 122 062

Pada Tanggal :

ABSTRAK

Skrining aktivitas antiradikal bebas dan fraksinasi empat tanaman Fabaceae, diantaranya daun angkana (*Pterocarpus indica* Willd.), daun akasia (*Acacia* sp. Willd.), daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), dan daun flamboyan (*Delonix regia* Raf.) yang berdasarkan prinsip bioassay. Semua sampel tanaman diekstraksi dengan n-heksan dan etanol sehingga diperoleh delapan ekstrak dan diuji aktivitas antiradikal bebas berdasarkan aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 5 mg/ml memiliki aktivitas paling baik sebagai antiradikal bebas. Ekstrak etanol akasia kemudian dipartisi dengan etil asetat sehingga diperoleh dua ekstrak yaitu ekstrak yang larut dalam etil asetat dan tidak larut dalam etil asetat. Ekstrak yang mempunyai aktivitas paling baik (ekstrak tidak larut etil asetat) lalu difraksinasi dengan kolom cair vakum hingga diperoleh empat fraksi dan fraksi yang mempunyai aktivitas paling baik adalah fraksi II dan fraksi III dengan nilai IC_{50} sebesar 0,72 mg/ml dan 0,74 mg/ml. Senyawa tersebut diidentifikasi sebagai senyawa golongan flavonoid dengan KLT.

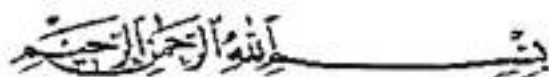
Kata kunci : Skrining, Fraksinasi, Antiradikal bebas, DPPH, Angkana (*Pterocarpus indica* Willd.), Akasia (*Acacia* sp Willd.), Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), dan Flamboyan (*Delonix regia* Raf.)

ABSTRACT

Screening antifree radical activity and fractionation of four Fabaceae plant i.e, angšana leaves (*Pterocarpus indica* Willd.), akasia leaves (*Acacia* sp. Willd.), kupu-kupu leaves (*Bauhinia purpurea* Linn.), and flamboyan leaves (*Delonix regia* Raf.) have been conducted based on the principal of bioassay guided. Sample of plants were extracted with n-hexane and ethanol, to obtained eight extracts four hexan extract and four etanolic extract. The antifree radical activity then tested based on the concentration of DPPH free radical which bound. Acacia ethanol extract 5 mg/ml had the greatest activity as the antifree radical. Acacia ethanol extract then was partitionated with ethyl acetate so that found two kind extract i,e the extract soluble and insoluble ethyl acetate extract. The insoluble in ethyl acetate extract was fractionated with vaccum liquid collumn chromatography so that, four fractions were derived and the most active were the 2nd fraction and 3rd fraction with IC₅₀ were 0.72 mg/ml and 0.74 mg/ml, respectively. The compound in the 2nd and 3rd fraction was identified as flavonoid class compound by TLC.

Key words : Fractionation, Screening antifree radical, DPPH, Angšana (*Pterocarpus indica* Willd.), Akasia (*Acacia* sp Willd.), Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), and Flamboyan (*Delonix regia* Raf.)

UCAPAN TERIMA KASIH



Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

Rasa bangga, hormat terlebih lagi rasa terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada: Bapak Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt selaku pembimbing utama, Ibu Mufidah, S.Si., M.Si., Apt selaku pembimbing pertama dan Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt selaku pembimbing kedua atas keikhlasan meluangkan waktu, memberikan bimbingan, saran, semangat serta pengalaman berharga yang penulis belum pernah dapatkan sebelumnya.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada ; Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Bapak Prof. Dr. H. Tadjuddin Naid, MSc. selaku penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan dan masukan yang bermakna selama penulis menempuh studi, Bapak dan Ibu Dosen serta pegawai Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin, Kepala Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Universitas Hasanuddin.

Teramat khusus, rasa bangga dan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada **Ayahanda Simin Wahid** dan **Ibunda Nurhani** tercinta yang telah menghadirkan saya ke dunia ini, memberikan dorongan moril dan bantuan material, serta doa yang tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Kepada **kakak-kakakku** tersayang atas cinta, doa, bantuan, dan semangatnya

Kepada teman-teman angkatan 2003 yang tidak bisa disebutkan satu-satu, Thank you so much guyz. *Special thanks to sahabat-sahabatku Farida, Karlina, Ira Eka Pratiwi, Rahmatia, Asriani, Irma Damayanti atas semua bantuan dan kebersamaannya dalam suka dan duka, Satu dari banyak rasa syukurku ketika kalian menjadi bagian dari warna hidupku.* Kepada pak Syuaib atas bantuannya selama penulis melaksanakan penelitian.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan kelemahan, oleh karena itu kritik dan saran sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membuka dan membacanya.

Makassar, November 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Uraian Tanaman	4
II.1.1 Ansgsana	4
II.1.2 Akasia	6
II.1.3 Kupu-kupu	7
II.1.4 Flamboyan	8
II.2 Uraian Umum Radikal Bebas	9
II.3 Uraian Umum Antioksidan	12

BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	38
III.1 Alat dan Bahan	38
III.2 Metode Kerja	39
III.2.1 Pengambilan dan Penyiapan Sampel.....	39
III.2.1.1 Pengambilan Sampel.....	39
III.2.1.2 Pengolahan Sampel.....	39
III.2.2 Ekstraksi Sampel.....	39
III.3 Partisi dengan Etil Asetat.....	40
III.4 Fraksinasi Senyawa Aktif	40
III.5 Prosedur Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas DPPH.....	41
III.5.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 Mm.....	41
III.5.2 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas.....	41
III.5.2.1 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas Blanko	41
III.5.2.2 Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C	41
III.5.2.3 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas Ekstrak.....	42
III.6 Identifikasi Komponen Kimia	43
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	50
V.1 Kesimpulan.....	50
V.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51

II.3.1 Jenis-jenis Antioksidan	13
II.3.2 Mekanisme Kerja dan Antioksidan	16
II.3.3 Uji Aktivitas antioksidan.....	16
II.4 Uraian Umum Tentang DPPH	19
II.5 Uraian Umum Flavonoid	20
II.5.1 Klasifikasi Flavonoid	21
II.5.2 Peranan Flavonoid	22
II.5.3 Identifikasi Flavonoid	22
II.5.4 Kelarutan Flavonoid	25
II.6 Metode Ekstraksi	26
II.6.1 Definisi Ekstrak	26
II.6.2 Definisi Ekstraksi	26
II.6.3 Tujuan Ekstraksi	27
II.6.4 Ekstraksi Senyawa Flavonoid	28
II.6.5 Ekstraksi Cair-cair	29
II.7 Metode Pemisahan.....	31
II.7.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	31
II.7.2 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Cair Vakum	32
II.8 Spektrofotometer UV-VIS.....	33
II.8.1 Prinsip Dasar.....	33
II.8.2 serapan oleh Senyawa	35
II.8.3 Peralatan Spektrofotometer	36

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Harga Probit Sesuai Persentasenya	55
2. Hasil Pengukuran Serapan DPPH Ekstrak Daun angkana, Akasia, Kupu-kupu dan Flamboyan	56
3. Hasil Perhitungan IC ₅₀	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Reaksi reduksi radikal bebas DPPH	14
2. Mekanisme reaksi oksidasi ion fero oleh radikal bebas.....	17
3. Mekanisme reaksi pembentukan radikal hidroksil dengan penambahan asam askorbat	19
4. Struktur kimia molekul DPPH	19
5. Kerangka dasar flavonoid	20
6. Pembentukan struktur kuinoid dari flavonoid	24
7. Pembentukan kompleks flavonoid dengan aluminium klorida	25
8. Diagram sederhana spektrofotometer	37
9. Profil KLT hasil fraksinasi ekstrak etanol akasia yang tidak larut etil asetat dengan eluen etil asetat-metanol (10:1)	70
10. Profil KLT setelah disemprot $FeCl_3$	71
11. Profil KLT setelah disemprot Sitroborat	71
12. Profil KLT setelah disemprot Dragendorff	71
13. Daun Kupu-kupu	72
14. Daun Akasia	72
15. Daun Angsana	73
16. Daun Flamboyan	73

17. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 5 mg/ml	74
18. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 2,5 mg/ml.....	74
19. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 1,25 mg/ml.....	75
20. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 0,625 mg/ml	75
21. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia pada konsentrasi 0,3125 mg/ml	76
22. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia tidak larut etil asetat pada konsentrasi 5 mg/ml	76
23. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia tidak larut etil asetat pada konsentrasi 2,5 mg/ml	77
24. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia tidak larut etil asetat pada konsentrasi 0,625 mg/ml	77
25. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh ekstrak etanol akasia tidak larut etil asetat pada konsentrasi 0,3125 mg/ml	78
26. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh Fraksi II pada konsentrasi 5 mg/ml	78
27. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh Fraksi II pada konsentrasi 2,5 mg/ml	79
28. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh Fraksi II pada konsentrasi 1,25 mg/ml	79
29. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh Fraksi II pada konsentrasi 0,625 mg/ml	80

30. Kurva absorbansi DPPH yang tidak terikat oleh Fraksi II pada konsentrasi 0,3125 mg/ml	80
31. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak etanol daun akasia dengan nilai probit	81
32. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak tidak larut etil asetat daun akasia dengan nilai probit	81
33. Grafik hubungan antara log konsentrasi fraksi II daun akasia dengan nilai probit	82

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Skrining Antiradikal Bebas	64
2. Skema Kerja Uji Daya Antiradikal Bebas	65
3. Contoh Perhitungan Daya Antiradikal Bebas	66
4. Contoh Perhitungan IC_{50}	67
5. Contoh Perhitungan Persamaan Regresi Linear	68

BAB I PENDAHULUAN

Antioksidan adalah molekul yang umumnya ditemukan dalam tanaman yang dapat mempengaruhi kesehatan manusia dengan menangkap jenis lain dari molekul yang disebut spesi oksigen reaktif (ROS/Reactive Oxygen Species) (1). ROS terdiri dari kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas misalnya O_2^- (superoksid), HO_2^- (hidroperoksil), OH^- (hidroksil), dan NO^- (nitrit oksida), sedangkan kelompok non radikal antara lain $ONOO^-$ (peroksi nitrit), OCl (hipoklorit), O_2 (oksigen singlet), $L(R)OOH$ (hidroperoksida) dan H_2O_2 (hydrogen peroksida) (2).

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil yang terbentuk dari proses metabolik normal. Radikal bebas mengandung satu elektron yang tidak berpasangan yang dapat mengikat elektron dari molekul lain sehingga mengubah struktur dan membahayakan protein, DNA dan enzim sel. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung dan kanker sehingga

BAB I

PENDAHULUAN

Antioksidan adalah molekul yang umumnya ditemukan dalam tanaman yang dapat mempengaruhi kesehatan manusia dengan menangkap jenis lain dari molekul yang disebut spesi oksigen reaktif (ROS/Reactive Oxygen Species) (1). ROS terdiri dari kelompok radikal bebas dan kelompok non radikal. Kelompok radikal bebas misalnya O_2^- (superoksid), HO_2^- (hidroperoksil), OH^- (hidroksil), dan NO^- (nitrit oksida), sedangkan kelompok non radikal antara lain $ONOO^-$ (peroksi nitrit), OCl (hipoklorit), O_2 (oksigen singlet), $L(R)OOH$ (hidroperoksida) dan H_2O_2 (hydrogen peroksida) (2).

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil yang terbentuk dari proses metabolik normal. Radikal bebas mengandung satu elektron yang tidak berpasangan yang dapat mengikat elektron dari molekul lain sehingga mengubah struktur dan membahayakan protein, DNA dan enzim sel. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung dan kanker sehingga

untuk mencegah atau mengurangi penyakit kronis akibat radikal bebas diperlukan antioksidan (2).

Sebenarnya, tubuh manusia dapat menetralsir radikal bebas ini, hanya saja bila jumlahnya berlebihan, maka kemampuan untuk menetralsirnya akan semakin berkurang (3). Antioksidan endogen yang diproduksi di dalam tubuh adalah enzim superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GSH Px), katalase, serta senyawa non enzim, yaitu senyawa protein kecil glutathion. Ketiga enzim dan senyawa glutathion tersebut bekerja menetralkan radikal bebas. Reaksi tersebut dapat dibantu oleh asupan antioksidan dari luar (eksogen) yang berasal dari bahan makanan. Misalnya, vitamin E, C, betakaroten dan senyawa flavonoid yang diperoleh dari tumbuhan (2).

Fabaceae atau Leguminosae ialah nama botani untuk sebuah famili tumbuhan yang besar, dengan 650 genus dan melebihi 18,000 spesies (4). Umumnya penyusunan sistem klasifikasi biasanya didasarkan pada perbedaan dan persamaan dari suatu ciri dan sifatnya yang sama (5). Namun menurut ilmu kemotaksonomi, tumbuhan dalam suku yang sama mengandung senyawa-senyawa kimia dengan kerangka struktur sama sehingga berpotensi memiliki aktivitas biologis yang sama (6).

Sebagian besar tanaman fabaceae mengandung senyawa kimia flavonoid yang telah dilaporkan efektif menghambat peroksidasi asam linoleat dan mencegah pembentukan anion superoksida antara lain quersetin,

isorhamnetin dan rhamnazin. Senyawa ini potensial melawan peroksidasi mikrosomal lipid yang diinduksi oleh Fe(III)-ADP/NADPH (6)

Beberapa tanaman suku Fabaceae digunakan sebagai tanaman peneduh karena memiliki beberapa mekanisme diantaranya penapis cahaya silau, penahan dan penyaring partikel padat dari udara, penyerap dan penjerap partikel timbal dan debu semen, peredam kebisingan, mengurangi bahaya hujan asam, penyerap karbonmonoksida, mengatasi penggenangan, penyerap karbondioksida dan penghasil oksigen, ameliorasi iklim, penyerap dan penapis bau, mengatasi intrusi air laut, pengelolaan sampah, pelestarian air tanah, mengurangi stress, mengamankan pantai terhadap abrasi, dan lain-lain (7,8). Pohon-pohon tersebut juga dijadikan penduduk sebagai bahan obat karena mempunyai manfaat besar terhadap kesehatan serta kandungan kimianya berupa flavonoid yang mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining antiradikal bebas terhadap beberapa tanaman famili fabaceae Angsana (*Pterocarpus indica*), Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea*), Akasia (*Acacia sp.*), dan Flamboyan (*Delonix regia*). Uji aktivitas dilakukan dengan metode pengikatan radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrasil).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1. Angsana (*Pterocarpus indica* Willd.)

a. Klasifikasi (10)

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Anak kelas : Dialypetalae
Bangsa : Fabales = Leguminosae
Suku : Fabaceae = Papilionaceae
Marga : *Pterocarpus*
Jenis : *Pterocarpus indicus* Willd.

b. Nama Daerah (11)

Bugis : Candana
Makassar : Patene
Bali : Angsana
Sunda : Sana kembang
Aceh : Asan
Maluku : Lala, lingua kasturi
Madura : Sana

c. Morfologi

Pohon angkana merupakan salah-satu tanaman pelindung yang memiliki tinggi 10-30 m dan berakar tunggang. Batang tanaman ini berbentuk bulat, berkayu dan bercabang dengan warna putih kotor. Tumbuhan ini tersebar di seluruh nusantara dengan tipe daun majemuk dan jumlah anak daun 5-13 helai. Daunnya berwarna hijau atau hijau muda dengan ujung runcing dan pangkal tumpul serta pertulangan meyirip. Panjang daun 3-10 cm dan lebarnya 2-5 cm. Bunga tergolong bunga majemuk terletak di ujung cabang dan di ketiak daun dengan bentuk tandan serta warna jingga. Buah berbentuk bulat pipih dan bersayap serta berwarna hijau dengan diameter \pm 5 cm, berisi 2-6 biji. Biji berbentuk bulat dan berwarna coklat (14).

d. Penggunaan

Daun digunakan untuk pengobatan buta kedis, bisul, dan penumbuh rambut (11). Sedangkan kulit batang digunakan sebagai obat sariawan, obat mencret dan bisul (14).

e. Kandungan Kimia

Angkana mengandung senyawa kimia yaitu saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri (14).

II.1.2 Akasia (*Acacia* sp.)

a. Klasifikasi (10)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Fabales = Leguminosae
Suku	: Mimosaceae
Marga	: <i>Acacia</i>
Jenis	: <i>Acacia</i> sp.

b. Nama daerah (11)

Jawa	: Akasia
Bugis	: Akasia
Sunda	: Pilang
Makassar	: Akasia

c. Morfologi

Pohon akasia memiliki tinggi 15-20 m dengan bentuk batang tegak, bulat dan berwarna putih kotor. Daunnya berhadapan, menyirip, lonjong dengan tepi rata dan tergolong daun majemuk dengan lebar 1-2 cm, pertulangan menyirip, serta berwarna hijau. Memiliki akar tunggang dengan warna putih kotor. Bunga berwarna kuning (12)

d. Penggunaan

Akar akasia digunakan sebagai obat demam dan obat perut mulas. Batang akasia digunakan sebagai penurun panas dan pembunuh kuman (12).

e. Kandungan kimia

Akar, daun dan buah *Acacia sp.* mengandung saponin, di samping itu daun dan buahnya mengandung flavonoida dan buahnya juga mengandung polifenol (12).

II.1.3 Kupu- kupu (*Bauhinia purpurea* L.)

a. Klasifikasi (10)

Kingdom : Plantae
 Divisi : Spermatophyta
 Kelas : Dicotyledoneae
 Anak kelas : Dialypetalae
 Bangsa : Fabales = Leguminosae
 Suku : Caesalpiniaceae
 Marga : Bauhinia
 Jenis : *Bauhinia purpurea* L.

b. Nama daerah (11)

Jawa : Kupu-kupu, daun lilin
 Madura : Ping-keping
 Sunda : Areuy kupu-kupu

c. Morfologi

Pohonnya berukuran sedang dengan pertumbuhan dapat mencapai hingga 17 m, daunnya luas berbentuk sayap kupu-kupu dengan lebar 10 -20 cm, bunganya sangat mencolok, berwarna merah jambu dan baunya harum. Memiliki buah yang tergolong buah polong dengan panjang 30 cm (11,13).

d. Penggunaan

Daunnya digunakan sebagai obat batuk yang keras (11).

e. Kandungan Kimia

Daun kupu-kupu mengandung alkaloid (18).

II.1.4 Flamboyan (*Delonix regia* Raf.)

a. Klasifikasi (10)

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermarophyta
- Kelas : Dicotyledoneae
- Anak kelas : Dialypetalae
- Bangsa : Fabales = Leguminosae
- Suku : Caesalpiniaceae
- Subsuku : Caesalpinioideae
- Marga : Delonix
- Jenis : *Delonix regia* Raf.

b. Nama daerah (11)

Palembang : Kayu koset, saga

Makassar : Palamboyan

c. Morfologi

Pohon flamboyan memiliki tinggi 10-20 m dengan ujung ranting berambut. Daun penumpu bentuk garis atau menyirip atau menyirip rangkap. Sirip daun 4-21 pasang, yang tengah terbesar. Anak daun berhadapan, persirip 6-35 pasang, oval sampai memanjang, tumpul, membulat atau melekuk. Bunga dalam tandan yang berbentuk malai rata. Tabung kelopak pendek, taju dari luar hijau kuning dari dalam merah. Bakal buah bertangkai pendek (15).

e. Kandungan Kimia

Daunnya mengandung saponin dan alkaloid (8).

II.2 Uraian Umum Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang sangat reaktif dan memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (16). Radikal bebas cenderung mengambil partikel dari molekul lain yang kemudian menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh (17). Tidak semua spesies oksigen reaktif adalah radikal bebas misalnya H_2O_2 dan *singlet oksigen* bukan radikal bebas, tetapi termasuk spesies oksigen reaktif. Karena adanya kecenderungan mengambil

sebuah elektron dan senyawa-senyawa lain maka spesies oksigen ini sangat reaktif (18).

Radikal bebas yang terdapat dalam tubuh adalah hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, asam hipoklorat, oksigen singlet, dan peroksil (19). Zat gizi yang paling sensitif terhadap kerusakan oleh radikal bebas adalah asam lemak majemuk tak jenuh yang dikenal dengan lipid peroksidasi. Di luar tubuh asam lemak dalam makanan yang bereaksi dengan radikal bebas menghasilkan peroksidan (20). Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species/ROS) lainnya yang diproduksi dalam jumlah normal sangat penting untuk menjaga fungsi biologis, seperti halnya sel darah putih menghasilkan hidropersida untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan fungi. Namun, jika jumlahnya berlebihan akan mencari pasangan elektronnya dengan merampas secara radikal dari molekul lain yang mengakibatkan kerusakan oksidatif jaringan yang sering dikenal sebagai stres oksidatif (19).

Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain : (21)

- 1). Membran sel

Terutama komponen penyusun membran berupa asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid dan mungkin juga protein. Perusakan bagian dalam pembuluh darah akan mempermudah pengendapan berbagai zat pada bagian yang rusak tersebut, termasuk kolesterol, sehingga

timbul aterosklerosis. Serangan radikal hidroksil pada asam lemak tak jenuh dimulai dengan interaksi oksigen pada rangkaian sehingga terbentuk lipid hidroperoksida, yang selanjutnya merusak bagian sel dimana hidroperoksida ini berada.

2). Kerusakan protein

Terjadinya kerusakan protein termasuk oksidasi protein akan mengakibatkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada, sebagai contoh kerusakan protein pada lensa mata mengakibatkan terjadinya katarak.

3). Kerusakan DNA

Radikal bebas hanya salah satu faktor dari banyak faktor yang menyebabkan kerusakan DNA. Penyebab lain misalnya virus, radiasi dan zat kimia karsinogen. Sebagai akibat kerusakan DNA ini dapat timbul penyakit kanker.

4). Peroksida lipid

Lipid dianggap molekul yang paling sensitif terhadap serangan radikal bebas sehingga terbentuk lipid peroksida. Terbentuknya lipid peroksida yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan lain dianggap salah satu penyebab terjadinya berbagai penyakit degeneratif.

5). Autoimun

Autoimun adalah terbentuknya antibodi terhadap suatu sel tubuh biasa. Pada keadaan normal antibodi hanya terbentuk bila ada antigen yang

masuk dalam tubuh. Adanya antibodi untuk sel tubuh normal dapat merusak jaringan tubuh dan sangat berbahaya.

6). Proses ketuaan

Secara teori radikal bebas dapat dipunahkan oleh berbagai antioksidan, tetapi tidak pernah mencapai 100%. Karena itu secara pelan dan pasti terjadi kerusakan jaringan oleh radikal bebas yang tidak terpunahkan. Kerusakan jaringan secara pelan ini menyebabkan terjadinya ketuaan.

II.3 Uraian Umum Tentang Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang stabil. Jika dikaitkan dengan penyakit, antioksidan dapat didefinisikan sebagai senyawa-senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif (16). Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif atau spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler, dan penuaan (20).

Zat-zat yang memiliki sifat antioksidan adalah senyawa poliphenol, indol, monoterpen, katekin, enzim, flavonoida dan karotenoida (21). Senyawa poliphenol mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara

menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (22).

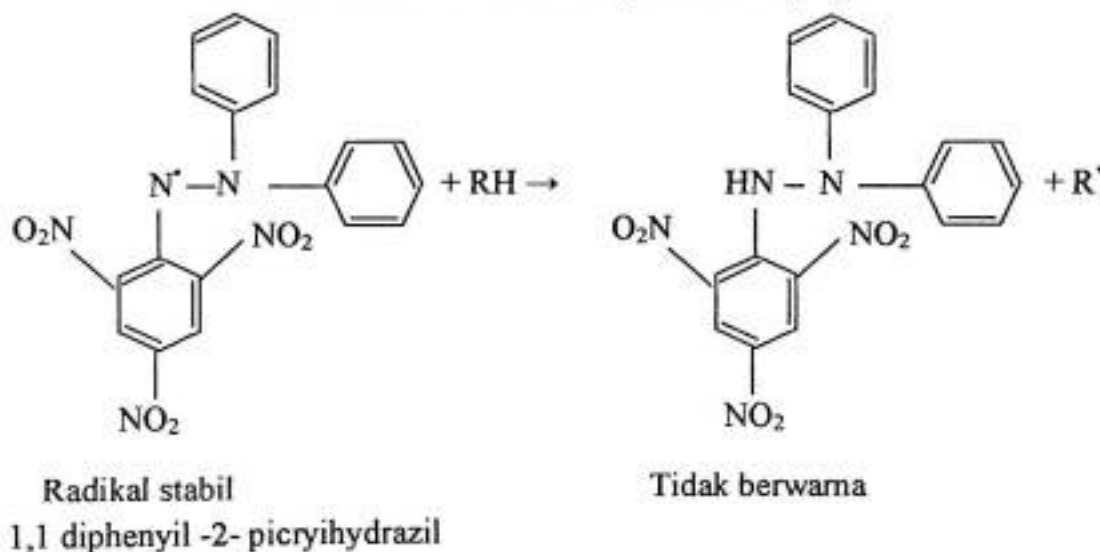
II.3.1 Jenis-jenis antioksidan

Antioksidan ada dua macam, yaitu antioksidan enzim dan antioksidan vitamin. Antioksidan enzim adalah antioksidan yang ada dalam tubuh organisme misalnya enzim katalase, glutathion peroksidase (GSH.Prx), superoksida dismutase (SOD), asam urat, dan ubiquinol. Superoksida dismutase berperan dalam melawan radikal bebas pada mitokondria, sitoplasma dan bakteri aerob dengan mengurangi bentuk radikal bebas superoksida. Enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen adalah katalase. Berfungsi menetralkan hidrogen peroksida beracun dan mencegah formasi gelembung CO₂ dalam darah. Antioksidan eksogen (vitamin) adalah antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh organisme seperti tokoferol, flavonoid, karotenoid dan vitamin C (23,24).

Enzim antioksidan dalam tubuh biasanya akan memerangi radikal bebas dalam jumlah normal. Jika jumlah radikal bebas melebihi jumlah yang dapat ditangani enzim tubuh, zat-zat antioksidan dari luar seperti, vitamin A, C, dan E akan bekerja. Antioksidan mencegah pembentukan lebih lanjut radikal bebas dengan memberikan elektron untuk menstabilisasi radikal bebas. Mengonsumsi suplemen vitamin dan mineral memegang peran penting dalam membantu tubuh menghancurkan dan mengeluarkan unsur-unsur kimia beracun dari dalam tubuh (18).

Antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluen), PG (propil galat), dan TBHQ (tetra-butyl hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz) sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan (22).

Reaksi Reduksi Radikal bebas DPPH sebagai berikut (25) :



Gambar 1. Reaksi reduksi radikal bebas DPPH

Antioksidan terdapat secara alamiah dalam lemak nabati. Ada dua macam antioksidan berdasarkan cara kerjanya yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

a. Antioksidan primer

Antioksidan primer adalah suatu zat yang dapat menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal yang melepaskan hydrogen. Zat-zat yang termasuk dalam golongan ini adalah yang berasal dari alam dan dapat pula buatan antara lain ; tokoferol, lesitin, fosfatida, sesamol, gosipol, dan asam askorbat. Antioksidan alam yang paling banyak ditemukan dalam minyak

nabati adalah tokoferol yang mempunyai keaktifan vitamin E dan terdapat dalam bentuk α , β , γ , dan δ tokoferol tapi α -tokoferol yang menunjukkan keaktifan vitamin E yang paling tinggi. Antioksidan sintetik yang banyak digunakan sekarang adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya agak beracun. Karena itu, penambahan antioksidan ini harus memenuhi beberapa syarat, misalnya tidak berbahaya bagi kesehatan, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, efektif pada konsentrasi rendah, larut dalam lemak, mudah didapat, dan ekonomis. Empat macam antioksidan yang sering digunakan pada bahan makanan adalah *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *Nordihydroquairitic acid* (NDGA) (26).

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder adalah suatu zat yang dapat mencegah kerja prooksidan sehingga dapat digolongkan sebagai sinergik. Beberapa asam organik tertentu, biasanya asam di- atau trikarboksilat, dapat mengikat logam-logam (sequistran). Misalnya satu molekul asam sitrat akan mengikat prooksidan Fe seperti sering dilakukan pada minyak kacang kedelai. EDTA (Etilendiamin tetraasetat) adalah sequistran logam yang sering digunakan dalam minyak salad (26).

II.3.2 Mekanisme kerja antioksidan

Antioksidan melindungi sel dan jaringan sasaran dengan cara (27)

1. memusnahkan (*scavenging*) radikal bebas secara enzimatik atau dengan reaksi kimia langsung
2. mengurangi pembentukan radikal bebas
3. mengikat ion logam yang terlibat dalam pembentukan spesies yang reaktif (transferin, seruloplasmin, albumin)
4. memperbaiki kerusakan sasaran
5. menghancurkan molekul yang rusak dan menggantinya dengan yang baru.

II.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, antara lain :

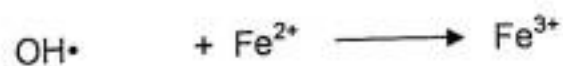
I. Metode DPPH

Metode DPPH untuk skrining antioksidan diperkenalkan oleh Blois (1958). DPPH merupakan molekul radikal bebas yang stabil yang ditandai oleh delokalisasi cadangan elektron disekeliling molekulnya secara keseluruhan dengan baik sehingga tidak akan membentuk dimer seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya. Prinsipnya berdasarkan reaksi antara antioksidan dengan DPPH radikal melalui donasi proton. Dengan demikian antioksidan yang bekerja dengan

menangkap radikal (*radikal scavenger*) dapat dideteksi dengan metode ini. Prinsip penentuan aktivitas antioksidan metode ini berdasarkan pengukuran serapan senyawa hasil reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan. Antioksidan akan mendonorkan protonnya kepada DPPH radikal yang berwarna ungu dan akan menghasilkan senyawa yang tidak berwarna. Besarnya aktivitas dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal DPPH (28).

2. Metode linoleat-tiosianat

Dalam metode ini digunakan asam linoleat sebagai sumber radikal yang merupakan asam lemak tidak jenuh. Radikal ini akan mengoksidasi ion fero (dari feroklorida) menjadi ion feri, dengan adanya ion tiosianat akan menghasilkan kompleks feri-tiosianat yang berwarna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut : (29)



Radikal



Gambar 2. Mekanisme reaksi oksidasi ion fero oleh radikal bebas

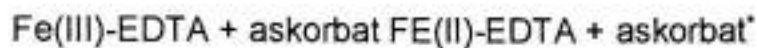
3. Metode tiosianat

Metode ini menggunakan 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) sebagai inisiator pembentukan radikal. Penguraian senyawa ini terjadi dengan bantuan pemanasan menghasilkan molekul nitrogen dan radikal karbon yang dapat bergabung menghasilkan produk yang stabil atau bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan radikal peroksil, sedangkan lemak yang dioksidasi menghasilkan produk primer peroksida. Dalam metode ini bilangan peroksida dinyatakan sebagai kemampuan senyawa mengoksidasi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , selanjutnya Fe^{3+} yang terbentuk bereaksi dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang memberikan panjang gelombang maksimum 500 nm. Makin lama waktu inkubasi, nilai absorpsi makin meningkat, yang berarti bahwa asam linoleat dalam sampel telah mengalami oksidasi. Meningkatnya intensitas warna merah menunjukkan meningkatnya bilangan peroksida. Kemampuan aktivitas antioksidan pada metode tiosianat dilihat dari rendahnya nilai absorpsi yang terbentuk dibandingkan konsentrasi. Makin rendah absorpsi berarti makin sedikit peroksida yang dihasilkan (28).

4. Metode DNPH

Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan terhadap radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi antara H_2O_2 dan Fe(III)-EDTA dengan penambahan asam askorbat pH 7,4. Penambahan asam askorbat

ini akan mempercepat laju pembentukan radikal hidroksil dengan cara mereduksi besi dan mempertahankan penyediaan Fe(III). Reaksi yang terjadi adalah



Gambar 3. Mekanisme reaksi pembentukan radikal hidroksil dengan penambahan asam askorbat

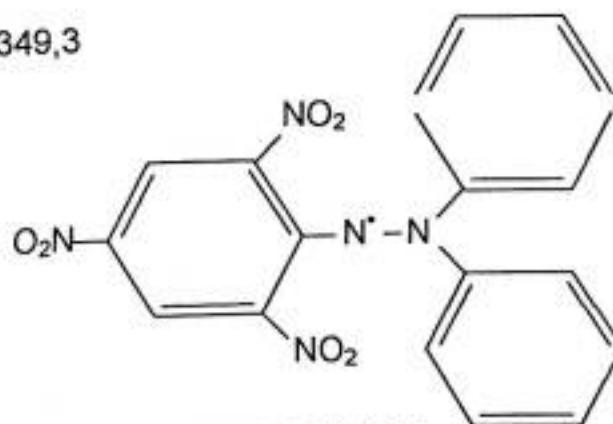
Senyawa karbonil yang dihasilkan diukur dengan metode DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) yang dimodifikasi. Warna yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 390 nm (30).

II. 4 Uraian Umum Tentang DPPH

Nama kimia : 2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl (31)

Rumus Kimia : $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$

Berat molekul : 349,3

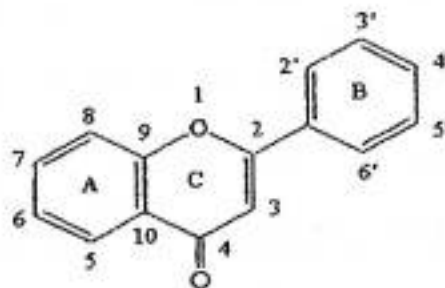


Gambar 4. Struktur kimia molekul DPPH (32)

DPPH merupakan molekul radikal bebas yang stabil yang ditandai oleh delokalisasi cadangan elektron disekeliling molekulnya secara keseluruhan dengan baik sehingga tidak akan membentuk dimer seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya (32).

II.5 Uraian Umum Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol alam yang dalam tumbuhan merupakan aglikon mengandung 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzene yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier terdiri dari 3 atom C_6 dan 3 atom karbon sehingga mempunyai struktur dasar $C_6 - C_3 - C_6$. Setiap atom C_6 yang merupakan cincin benzene yang dihubungkan dengan tiga karbon (C_3) rantai alifatis yang dapat pula membentuk cincin ketiga. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid (33).



Gambar 5. Kerangka Dasar Flavonoid

Semua varian flavonoid saling berkaitan karena alur biosintesis yang sama, yang memasukkan prazat dari alur sikimat dan alur asetat-malonat. Flavonoid pertama dihasilkan segera setelah kedua jalur itu bertemu. Flavonoid yang dianggap pertama kali terbentuk pada biosintesis ialah khalkon dan semua bentuk lain diturunkan dari khalkon melalui berbagai alur. Modifikasi flavonoid lebih lanjut mungkin terjadi pada berbagai tahap dan menghasilkan penambahan atau pengurangan hidroksilasi, metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; isoprenilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid; metilenasi gugus orto-dihidroksil; dimerisasi (pembentukan biflavonoid); pembentukan bisulfat; dan yang terpenting, glikosilasi gugus hidroksil (pembentukan flavonoid O-glikosida) atau inti flavonoid (pembentukan flavonoid C- glikosida) (33).

II.5.1 Klasifikasi flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (36).

Senyawa-senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis, tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propan dari system 1,3-diarilpropan. Dalam hal ini, flavon mempunyai tingkat oksidasi yang terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa-senyawa turunan flavon (33).

Penggolongan heterosiklik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksigen pada atom C₃ menentukan sifat, khasiat, dan golongan atau tipe flavonoid. Perbedaan pola distribusi dan hidrosilasi pada atom C₃ juga menentukan klasifikasi dari senyawa flavonoid yaitu flavon, flavanon, flavanol, flavanonol, isoflavon, auron, khalkon. Bagian terbesar adalah flavon dan flavanol.

Flavonoid dalam jaringan tumbuhan digolongkan pada awalnya berdasarkan sifat kelarutan dan reaksi wamanya. Selanjutnya pada pemeriksaan kromatografi lapis tipis satu atau dua dimensi sebelum dan sesudah hidrolisis senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan cara membandingkan kromatogram dan spektrum dari senyawa lain yang telah diketahui.

II.5.2 Peranan flavonoid

Flavonoid telah digunakan sebagai anti inflamasi, antioksidan, antialergi, melindungi dari kerusakan hati, antiviral, dan efektif sebagai antikanker. Flavonoid mengandung senyawa fenolik sehingga efektif sebagai pengkhelat dan penghambat radikal bebas. Flavonoid efektif sebagai antioksidan melalui pemutusan rantai pembentukan radikal bebas (34).

II.5.3 Identifikasi Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid terdapat dalam semua bagian tumbuhan tingkat tinggi seperti bunga, daun bunga, akar, kayu, dan kulit kayu. Sebagian besar dari flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida, dimana unit

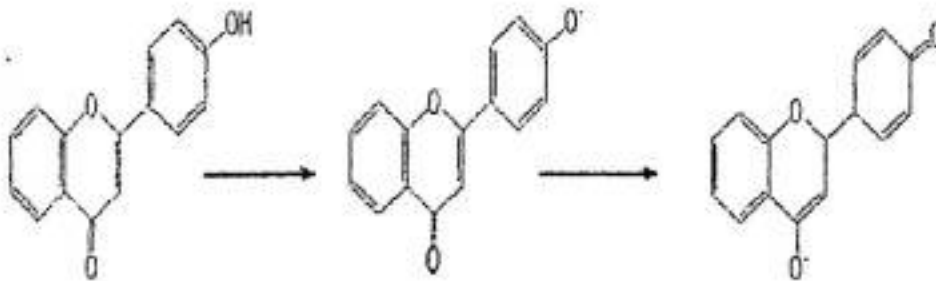
flavonoid terikat pada suatu gula, jika dihidrolisis dengan asam, maka suatu glikosida terurai kembali atau komponen-komponennya menghasilkan gula dan alkohol (35).

Secara umum, golongan senyawa flavonoid biasanya dapat ditentukan dengan uji warna, penentuan kelarutan, bilangan Rf, dan ciri spectrum UV (38). Dari segi struktur, senyawa-senyawa flavonoid turunan flavon dapat dianggap sebagai 2-arilkromon, oleh karena itu, sebagaimana kromon dan kumarin, flavonoid dapat dideteksi berdasarkan warnanya dibawah sinar tampak atau sinar ultraviolet.

Flavonoid mempunyai sistem karbonil yang berkonyugasi dengan cincin aromatik sehingga karakterisasi flavonoid dapat dilakukan dengan pengukuran spektrofotometri selain dengan identifikasi reaksi warna, yang mana dengan pereaksi $AlCl_3$ 1% dalam etanol menghasilkan warna kuning, pereaksi Benedict menghasilkan warna biru, dan pereaksi Wilstater menghasilkan warna merah (35).

Jika tidak tercampur dengan pigmen lain, flavonoid dapat dideteksi dengan uap ammonia dan akan memberi warna spesifik untuk masing-masing golongan. Flavon dan flavonol akan berwarna kuning sampai kuning kemerahan. Antosianin berwarna merah biru sedang flavonol berwarna jingga atau coklat. Warna merah dan lembayung yang terjadi mendadak dalam suasana asam disebabkan adanya khalkon atau auron.

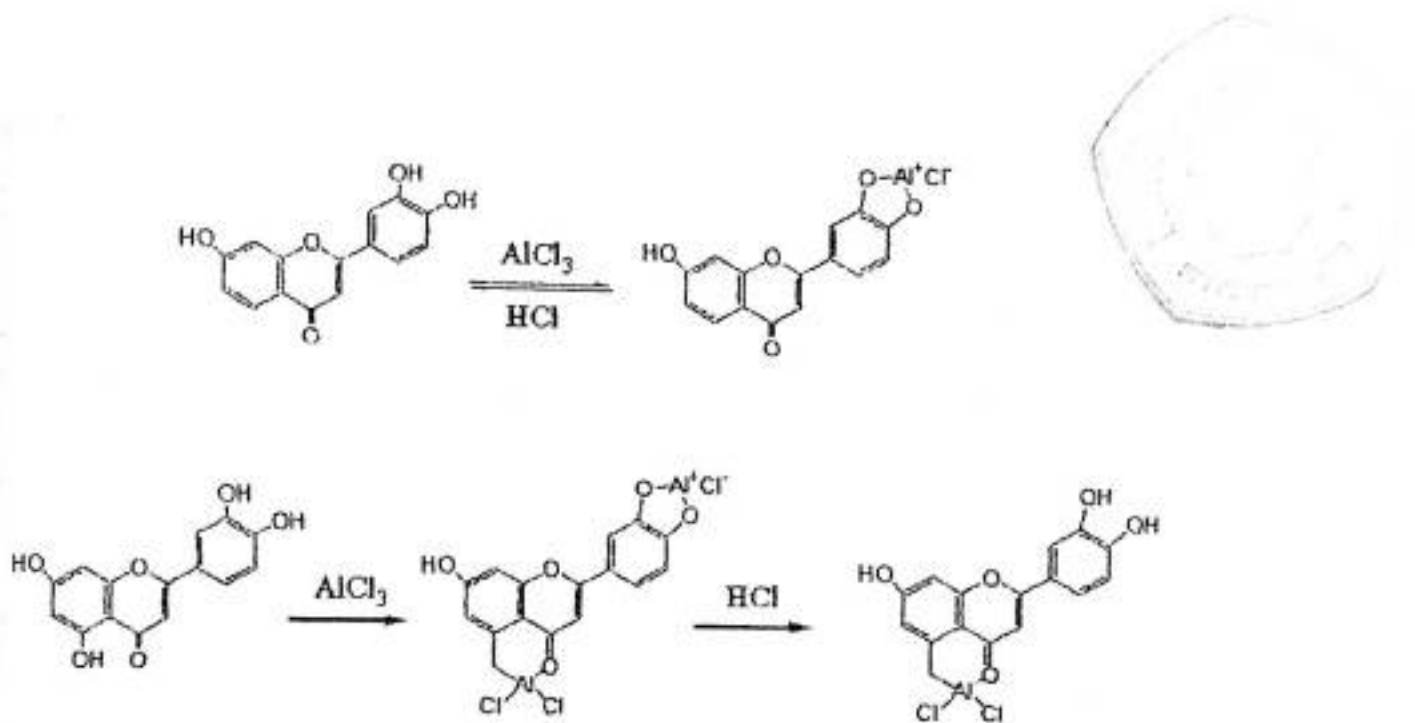
Flavonoid menjadi kuning terang atau jingga dalam larutan basa dapat dideteksi jika bagian rumbuhan diuapi ammonia. Timbulnya warna ini disebabkan oleh pembentukan garam dan terbentuknya struktur kuinoid pada cincin B sebagai berikut



Gambar 6. Pembentukan Struktur Quinoid dari Flavonoid

Adanya gugus fenol pada flavonoid memberikan reaksi positif dengan pereaksi fenol, antara lain akan memberikan warna spesifik dengan pereaksi besi (III) klorida dan pereaksi asam sulfat pekat, tetapi reaksi ini tidak spesifik untuk digunakan dalam membedakan masing-masing golongan dan perlu diikuti uji warna lainnya.

Aluminium klorida juga dapat membentuk kompleks dengan flavonoid menimbulkan warna kuning dengan reaksi sebagai berikut :



Gambar 7. Reaksi pembentukan kompleks antara flavonoid dengan Aluminium Klorida

Reaksi yang terjadi antara aluminium klorida dengan gugus ortohidroksi akan terbentuk kompleks yang tidak stabil dalam suasana asam. Jika reaksi yang terjadi antara aluminium klorida dengan gugus hidroksi dan karbonil, maka kompleks yang terjadi stabil walaupun ditambah dengan asam. Pembentukan kompleks flavonoid dengan aluminium klorida lewat 2 macam gugus yang berbeda ini menjadi dasar penetapan adanya gugus hidroksi pada kedudukan tertentu dalam molekul flavonoid (33).

II.5.4 Kelarutan Flavonoid

Aglikon flavonoid adalah polifenol dan karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa, karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau

suatu gula, flavonoid merupakan senyawa polar dan umumnya flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol, methanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO), dimetilformamida (DMF), air. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (33).

II.6 Metode Ekstraksi

II.6.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengesktraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok diluar pengaruh cahaya matahari langsung (36), kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (37).

II.6.2 Defenisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis hewan termasuk biota laut. Komponen kimia yang terdapat pada tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik. Pelarut organik yang paling umum digunakan untuk mengekstraksikan komponen kimia dari sel tanaman adalah methanol, etanol, kloroform, heksan, eter, aseton, benzen dan etil asetat.

Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang

mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (37).

II.6.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi secara umum, disesuaikan dengan 4 situasi (38):

1. Senyawa kimia telah diketahui identitasnya untuk diekstraksi dari organisme diekstraksi dengan prosedur yang telah dipublikasi dapat diikuti dan dibuat modifikasi yang sesuai untuk mengembangkan proses atau menyesuaikannya dengan kebutuhan pemakai.
2. Bahan diperiksa untuk menemukan kelompok senyawa kimia tertentu, misalnya alkaloid, flavonoid, atau saponin meskipun struktur kimia sebetulnya dari senyawa ini, bahkan keberadaannya belum diketahui. Dimana, metode umum yang digunakan untuk senyawa kimia yang diminati dapat diperoleh dari pustaka. Hal ini diikuti dengan uji kimia atau kromatografik yang sesuai untuk kelompok senyawa kimia tersebut.
3. Organisme (tanaman atau hewan) digunakan dalam pengobatan Cina (Traditional Chinese Medicine / TCM) seringkali membutuhkan herba yang dididihkan dalam air untuk diberikan sebagai obat. Proses ini harus ditiru sedekat mungkin jika ekstrak akan melalui kajian ilmiah biologi atau kimia lebih lanjut, khususnya jika tujuannya untuk memvalidasi penggunaan tradisional.

4. Sifat senyawa yang akan diisolasi belum ditentukan sebelumnya dengan cara apapun. Situasi ini (utamanya dalam program skrining) dapat timbul jika tujuannya adalah untuk menguji organisme, baik yang dipilih secara acak atau didasarkan pada penggunaan tradisional untuk mengetahui adanya senyawa dengan aktivitas biologis khusus. Oleh karena itu perlu pemilihan metode ekstraksi yang sesuai dengan bioassay dan juga mencoba mengekstraksi sebanyak mungkin tipe senyawa kimia. Secara umum hal ini dicapai dengan menggunakan serangkaian pelarut, tetapi jumlah pelarut yang digunakan harus dibatasi oleh skala program skrining. Jika hanya sedikit organisme yang diuji dapat dibuat berbagai jenis ekstrak dari tiap sampel, sedangkan dalam program skrining skala besar yang mencakup ribuan organisme, hanya satu atau dua ekstrak (biasanya dengan polaritas berbeda) yang dibuat dari masing-masing sampel.

II.6.4 Ekstraksi Senyawa Flavonoid

Pada umumnya kelarutan flavonoid berbeda-beda terhadap berbagai pelarut sesuai dengan golongan dan substituenya. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan polaritasnya sehingga untuk mengekstraksi digunakan pelarut yang memiliki polaritas sesuai dengan flavonoid tersebut.

Pemilihan pelarut tidak hanya tergantung pada kandungan zat aktif yang diteliti, tetapi juga perlu dipertimbangkan pada bagian mana substansi tersebut diambil. Bila flavonoid terdapat dalam vakuola sel yang umumnya bersifat hidrofilik, maka penyarian dilakukan dengan menggunakan air atau

pelarut-pelarut alkoholik. Berbeda jika flavonoidnya terdapat dalam kloroplas yang memerlukan pelarut-pelarut non polar sebelum melakukan penyarian dengan alkohol.

Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi atau suatu gula, sehingga flavonoid merupakan senyawa polar maka ia larut dalam pelarut polar seperti etanol, butanol, air, dan lain-lain. Adanya gula menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air, dengan demikian campuran air pelarut di atas merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavanol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut non polar seperti eter dan kloroform.

Umunya pelarut-pelarut alkoholik merupakan pelarut pilihan untuk mengekstraksi semua golongan flavonoid. Bahan segar dapat langsung diekstraksi dengan alkohol absolut, yang kering dan berkayu dapat menggunakan alkohol berair. Glikosida flavonoid dan aglikon seperti flavon terhidroksilasi, flavonol, auron, dan khalkon biasanya diisolasi dengan aseton, alkohol, air, atau kombinasi dari bahan-bahan tersebut. Pelarut yang banyak digunakan untuk mengekstraksi adalah campuran metanol : air (1:1), metanol atau etanol 70% - 80% (33).

II.6.5 Ekstraksi Cair-cair (38)

Ekstraksi cair-cair biasa juga disebut sebagai metode corong pisah. Jika suatu cairan ditambahkan ke dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam

cairan lain yang tidak dapat bercampur dengan yang pertama, akan terbentuk dua lapisan. Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan dalam kedua lapisan tersebut (biasanya disebut fase) dan setelah beberapa waktu dicapai kesetimbangan konsentrasi dalam kedua lapisan. Waktu yang diperlukan untuk tercapainya kesetimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran keduanya dalam corong pisah.

Pelarut yang mudah menguap tidak dicampur dengan fase air yang panas (atau bahkan hangat). Hal ini dapat menyebabkan peningkatan tekanan uap sangat besar yang dihasilkan sehingga tutup corong pisah terbang dan isinya tersemprot keluar. Hal ini dapat juga terjadi dengan cairan dingin jika terjadi reaksi eksotermis misal pencampuran asam dan basa, pengenceran asam-asam kuat.

Beberapa fase organik mudah membentuk emulsi dengan fase air, khususnya jika terdapat partikel kecil atau terbentuk oleh pengendapan. Kelarutan senyawa tidak bermuatan dalam satu fase pada suhu tertentu tergantung pada kemiripan kepolarannya dengan fase cair, menggunakan prinsip "like dissolve like". Molekul bermuatan yang memiliki afinitas tinggi terhadap cairan dengan sejumlah besar ion bermuatan berlawanan dan juga dalam kasus ini menarik yang berlawanan misalnya senyawa asam akan lebih larut dalam fase air yang basa daripada yang netral atau asam. Ratio konsentrasi senyawa dalam kedua fase disebut koefisien partisi K . Senyawa yang berbeda akan mempunyai koefisien partisi yang berbeda, sehingga jika

satu senyawa sangat polar, koefisien partisi relatifnya ke fase polar lebih tinggi daripada senyawa nonpolar.

II.7 Metode Pemisahan

II.7.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk pemisahan senyawa secara cepat dengan menggunakan zat penjerap berupa serbuk halus yang dilapiskan serba rata pada lempeng kaca (39).

Kromatografi lapis tipis adalah kromatografi cairan-cairan dimana sebagai fase diam adalah lapisan tipis air yang diserap dari lembab udara oleh lempeng gelas atau aluminium yang dilapisi dengan lapisan tipis alumina, silika gel atau bahan serbuk lainnya (40). Kecepatan KLT yang lebih besar disebabkan oleh sifat penjerap yang lebih padat bila disapukan pada pelat (37).

Deteksi senyawa pada plat KLT biasanya dilakukan dengan penyemprotan dan karena permukaan pelat yang lebih sempit (20 X 20 cm), maka penyemprotannya merupakan prosedur nisbi sederhana (31).

Prinsip KLT adalah pemisahan secara fisikokimia. Lapisan yang memisahkan yang terdiri dari bahan yang berbutir-butir (fase diam), ditempatkan dalam penyangga berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan yang ditotolkan berupa bercak atau pita (awal). Setelah plat atau lapisan ditaruh di dalam bejana

yang ditutup rapat berisi fase gerak, pemisahan terjadi selama pengembangan. Senyawa berwarna terdeteksi (37).

Penyerap umum yang digunakan adalah silica gel, aluminium oksida, kieselguhr, selulosa dan turunannya, poliamida, dan lain-lain. Silica gel adalah penyerap yang banyak digunakan karena mempunyai pemisahan yang baik. Zat penyerap dilapiskan secara merata pada penyangga dengan ketebalan lapisan antara 0,1-0,3 mm. Pemisahan suatu senyawa yang dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis tergantung pada jenis pelarut, zat penyerap, dan sifat daya serap masing-masing komponen. Komponen yang terlarut akan terbawa fase diam (penyerap) dengan kecepatan Bergeraknya komponen terlarut dalam fase gerak (37).

II.7.2 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Cair Vakum

Kromatografi kolom cair vakum menggunakan corong Buchner kaca masir atau kolom pendek dan dapat pula menggunakan kolom yang lebih panjang. Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penjerap KLT 10-40 mikro meter) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan siap dipakai. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang cocok kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom atau pada lapisan prapenjerap (tanah diatomae, celite) dan dihisap perlahan-lahan ke dalam

kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi.

Kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak. Berbeda dengan metode yang menggunakan tekanan pada bagian atas kolom untuk meningkatkan laju aliran, mengotak-atik kolom mudah karena kepala kolom berada dalam tekanan atmosfer (41).

II.8 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmitans dan absorbans suatu contoh sebagai fungsi panjang gelombang; pengukuran terhadap suatu deretan contoh pada suatu panjang gelombang tunggal mungkin dapat juga dilakukan (42).

II.8.1 Prinsip Dasar

Apabila radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan sinar tampak melalui senyawa yang memiliki ikatan-ikatan rangkap, sebagian dari radiasi biasanya diserap oleh senyawa. Jumlah radiasi yang diserap tergantung pada panjang gelombang radiasi dan struktur senyawa. Penyerapan sinar radiasi disebabkan oleh pengurangan energi dari sinar

radiasi pada saat elektron-elektron dalam orbital berenergi rendah tereksitasi ke orbital berenergi lebih tinggi (43).

Hubungan antara kadar dengan intensitas sinar yang diserap oleh contoh yang dianalisis dinyatakan oleh hukum Lambert-Beer (42) :

$$\text{Log } I_0/I = A = a \cdot b \cdot C$$

Dimana : I_0 = intensitas sinar sebelum melewati contoh

I = intensitas sinar setelah melewati contoh

A = absorban

a = absorpsivitas molekul

b = ketebalan kuvet

C = konsentrasi larutan

Oleh karena a dan b nilainya tetap (wadah yang dipakai spesifik), maka A berbanding lurus dengan c (konsentrasi larutan). Dalam penurunan hukum ini dianggap bahwa, (1) radiasi yang masuk adalah monokromatik, (2) spesies penyerap berkelakuan tidak tergantung satu terhadap lainnya dalam proses penyerapan, (3) penyerapan terjadi dalam volume yang mempunyai luas penampang yang sama, (4) dengan radiasi tenaga adalah cepat (tidak terjadi fluoresensi), dan (5) indeks bias tak tergantung pada konsentrasi (tidak berlaku pada konsentrasi yang tinggi) (44).

Untuk penentuan kadar spektrofotometri, yang ditentukan adalah absorpsi maksimum kurva absorpsi. Jika absorpsi ini untuk penentuan kadar sangat rendah atau senyawa mula-mula mengabsorpsi di bawah 220 nm,

maka seringkali senyawa diubah dulu menjadi suatu zat warna melalui reaksi kimia dan absorpsi ditentukan dalam daerah sinar tampak (45).

II.8.2 Serapan oleh Senyawa

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet dan terlihat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra ultraviolet dan visible dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Oleh karena itu, serapan radiasi ultraviolet/visible sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi biasanya antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital-orbital yang bersangkutan. Pemisahan tenaga yang paling tinggi diperoleh bila elektron-elektron dalam ikatan- π tereksitasi yang menimbulkan serapan dalam daerah dari 120 hingga 200 nm. Daerah ini dikenal sebagai daerah ultraviolet vakum dan relatif tidak banyak memberikan keterangan. Diatas 200 nm, eksitasi elektron dari orbital-orbital p dan d dan orbital π terutama sistem terkonjugasi- π segera dapat diukur dan spektrum yang diperoleh memberikan banyak keterangan. Meskipun demikian, terdapat keuntungan yang selektif dari serapan ultraviolet yaitu gugus-gugus karakteristik dapat dikenal dalam molekul-molekul yang sangat kompleks. Sebagian besar dari molekul yang relatif kompleks mungkin transparan

dalam ultraviolet sehingga kita mungkin memperoleh spektrum yang semacam dari molekul yang sederhana (44).

Spektrum ultraviolet adalah gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmitasi atau absorbansi). Sering juga data ditunjukkan sebagai gambar grafik atau tabel yang menyatakan panjang gelombang lawan serapan molar atau log dari serapan molar (44).

II.8.3 Peralatan Spektrofotometer

Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi (44) :

1. Sumber tenaga radiasi

Sumber radiasi yang ideal untuk pengukuran serapan harus menghasilkan spektrum kontinu dengan intensitas yang seragam pada keseluruhan kisaran panjang gelombang yang sedang diamati. Sumber-sumber radiasi UV yang kebanyakan digunakan adalah lampu hidrogen dan lampu deuterium. Terdiri dari sepasang elektroda yang terselubung dalam tabung gelas dan diisi dengan gas hidrogen atau deuterium pada tekanan yang rendah dengan panjang gelombang 180-350 nm dan digunakan juga lampu xenon, tetapi lampu xenon tidak se-stabil lampu hidrogen.

2. Monokromator

Dalam spektrofotometer, radiasi polikromatik diubah menjadi monokromatik. Ada dua jenis alat yang digunakan yaitu penyaring dan monokromator. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang

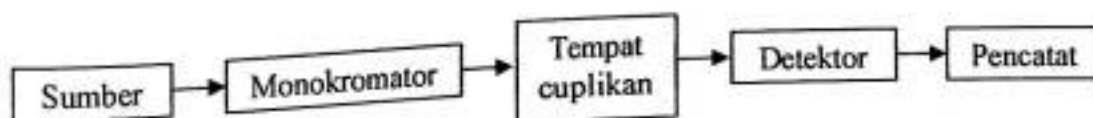
menguraikan radiasi polikromatik menjadi jalur-jalur yang efektif atau panjang gelombang tunggal.

3. Tempat cuplikan

Larutan ditempatkan dalam sel atau kuvet. Untuk daerah visibel digunakan gelas biasa atau quartz. Sel untuk larutan mempunyai panjang 1-10 cm. Sebelum sel dipakai, harus dibersihkan dengan air atau jika dikehendaki dapat dicuci dengan larutan deterjen atau asam nitrat panas.

4. Detektor dan pencatat

Detektor menyerap tenaga foton yang mengenai cuplikan dan merubah tenaga tersebut untuk diukur secara kuantitatif seperti sebagai arus listrik atau perubahan-perubahan panas. Kebanyakan detektor menghasilkan sinyal listrik yang dapat mengaktifkan meter atau pencatat. Persyaratan-persyaratan penting untuk detektor meliputi: (1) sensitivitas tinggi hingga dapat mendeteksi tenaga cahaya yang mempunyai tingkatan rendah sekalipun, (2) waktu respon yang pendek, (3) stabilitas yang panjang/lama untuk menjamin respon secara kuantitatif, dan (4) sinyal elektronik yang mudah diperjelas (45).



Gambar 8. Diagram sederhana spektrofotometer

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah bejana maserasi, seperangkat alat KLT dan KLT Preparatif, seperangkat alat kromatografi cair vakum, labu Erlenmeyer (Pyrex), labu tentukur 5,0 ml; 10,0 ml; 50,0 ml; 100 ml, magnetic stirrer (Nouva II Styrrer), mikropipet (Mettler), neraca analitik (Sartorius), oven listrik (Mettler), pengocok (Vorteks), seperangkat alat rotavapor (Buchii), sentrifuse (*Hettich*), seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis (Hewlett Packard), timbangan Kasar (O' Hauss).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun angkana (*Pterocarpus Indica* Willd.), daun akasia (*Acacia* sp Willd.), daun kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), dan flamboyan (*Delonix regia* Raf.), air suling, aluminium foil, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) (Sigma), vitamin C (E. Merck), asam asetat glasial (E. Merck); asam sulfat 10%; amonia; butanol; etanol (E. Merck), etil asetat; kloroform; metanol, lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (E. Merck).

III.2. Metode Kerja

III.2.1 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil di lingkungan kampus Universitas Hasanuddin Tamalanrea Makassar. Konfirmasi penyandraan tanaman dilakukan pada jurusan Biologi FMIPA Universitas Hasanuddin.

III.2.1.2 Pengolahan Sampel

Sampel daun angkana (*Pterocarpus indica* Willd.), akasia (*Acacia* sp. Willd.), kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), dan flamboyan (*Delonix regia* Raf.), diambil kemudian dicuci bersih dengan air mengalir, dan dikeringanginkan lalu dipotong-potong kecil.

III.2.2 Ekstraksi Sampel

Sampel ditimbang sebanyak 500 g kemudian dimasukkan dalam bejana maserasi. Cairan pengekstraksi berupa n-heksan dimasukkan ke dalam bejana hingga 1-2 mL diatas sampel, bejana maserasi disimpan selama 3 hari. Campuran kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut heksan. Proses penyarian dilakukan sebanyak 3 kali. Hasil maserasi dikumpulkan kemudian diuapkan dengan menggunakan alat rotavapor hingga diperoleh ekstrak heksan lalu ampasnya diangin-anginkan sampai kering. Sampel yang telah dimaserasi dengan heksan diangin-anginkan kembali hingga kering selanjutnya dimaserasi lagi dengan etanol

70% selama 3 hari dengan 3 kali penyarian. Hasil maserasi lalu diuapkan dengan menggunakan alat rotavapor, sehingga diperoleh ekstrak kering heksan dan etanol 70%. Kedua ekstrak tersebut lalu dimasukkan kedalam eksikator.

III.3. Partisi dengan Etil Asetat

Sebanyak 10,6 g ekstrak kental etanol dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak ditambahkan etil asetat, dilarutkan dan dihomogenkan dengan bantuan *magnetic stirrer* kemudian disentrifuse sehingga terpisah menjadi dua bagian. Bagian yang terpisah tersebut ditempatkan pada wadah yang berbeda dan diuapkan, hingga diperoleh ekstrak etanol yang larut etil asetat dan tidak larut etil asetat. Ekstrak yang larut etil asetat dan tidak larut etil asetat dimonitor profil komponen kimianya dengan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen hexan-etil asetat (3:1). Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antiradikal bebas terhadap ekstrak larut etil asetat dan ekstrak tidak larut etil asetat. Hasil pengujian yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak tidak larut etil asetat memiliki aktivitas sebagai antiradikal bebas.

III.4 Fraksinasi Senyawa Aktif

Ekstrak aktif (ekstrak tidak larut etil asetat) difraksinasi secara kromatografi cair vakum menggunakan eluen Hexan - etil asetat dengan perbandingan (1:1), (1:5), (1:10), Etil asetat, Etil asetat - methanol dengan perbandingan (10:1), (10:1), 5:1, (1:1), (1:5), dan (1:10); serta methanol. Fraksi-fraksi yang diperoleh dimonitor profil KLTnya menggunakan eluen etil

asetat-metanol (10:1). Fraksi dengan profil KLT yang sama digabung dan diperoleh 4 fraksi (fraksi I, II, III, dan IV). Keempat fraksi tersebut lalu diuji aktivitas antiradikal bebasnya dan diperoleh fraksi aktif (fraksi II dan fraksi III).

III.5 Prosedur Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas DPPH

III.5.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan cara ditimbang DPPH (2,2 difenil-1-pikril hidrazil) sebanyak 0,0157 g dilarutkan dengan 100 ml etanol absolut dalam labu tentukur (11).

III.5.2 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas

III.5.2.1 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas Blanko

Pengujian dilakukan dengan memipet 1,0 ml DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya dengan etanol absolut sampai 5,0 ml dalam labu tentukur. Larutan ini kemudian dipindahkan dalam wadah gelas cokelat dan dibiarkan selama 30 menit, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 518 nm. Semua pekerjaan dilakukan pada ruang yang terhindar dari cahaya.

III.5.2.2 Pembuatan Larutan Pembanding Vitamin C

Larutan stok 0,25 mg/ml disiapkan dengan cara menimbang sebanyak 5 mg dan dicukupkan dengan aquadest hingga 20 ml. Untuk konsentrasi 0,125 mg/ml dan 0,0625 mg/ml diperoleh dengan memipet 1000 μ l, 500 μ l dari larutan stok dan volume dicukupkan dengan campuran kloroform - metanol (1:1) hingga 2 ml.

Pengujian dilakukan dengan memipet 100 µl larutan Vitamin C lalu ditambah 1,0 ml DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya sampai 5,0 ml dengan etanol absolut. Campuran selanjutnya dihomogenkan dan serapannya diukur setelah 30 menit pada panjang gelombang 518 nm.

III.5.2.3 Pengukuran Daya Antiradikal Bebas

Disiapkan larutan uji Ekstrak hexan daun angkana, flamboyant, akasia, kupu-kupu dan ekstrak etanol daun kupu-kupu konsentrasi 20 mg/ml dengan menimbang masing-masing 80 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan campuran kloroform - metanol (1:1) sambil diaduk dan dihomogenkan dengan bantuan vorteks, volume akhir dicukupkan dengan etanol absolut hingga 10 ml. Dari larutan stok dibuat pengenceran yang sesuai untuk konsentrasi masing-masing ekstrak kemudian volume dicukupkan dengan campuran kloroform - methanol (1:1) hingga 5 ml.

Pengujian dilakukan dengan memipet 100 µl larutan sampel lalu ditambah 1,0 ml DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya sampai 5,0 ml dengan etanol absolut. Campuran selanjutnya dihomogenkan dan serapannya diukur setelah 30 menit pada panjang gelombang 518 nm.

Besarnya persentase pengikatan radikal bebas dihitung dengan rumus :

$$\text{Persen pengikatan radikal bebas} = \frac{(\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \%$$

Nilai IC_{50} (50% *Inhibitory concentration*) ditentukan dengan analisis probit dari data log konsentrasi dengan probit persentase pengikatan radikal bebas.

III.6 Identifikasi Komponen Kimia

III.6.1 Identifikasi Komponen Kimia

- Uji Kromatografi Lapis Tipis

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu $100^{\circ}C$ selama 30 menit sebelum digunakan. Kemudian ekstrak yang paling aktif sebagai antiradikal bebas ditotolkan pada lempeng KLT menggunakan pipa kapiler. Ekstrak yang ditotolkan pada lempeng KLT dikeringkan dengan hair dryer lalu dimasukkan dalam chamber/bejana kromatografi yang telah jenuh dengan eluen heksan - etil asetat - asam asetat (1:5:0,1) lalu dibiarkan mengembang sampai batas atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan hingga cairan pengembangnya menguap. Diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm, lalu kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi sebagai berikut :

- $FeCl_3$, positif fenolik jika terjadi perubahan warna noda menjadi hijau kehitaman
- Pereaksi sitroborat, lalu kromatogram dimasukkan dalam oven pada suhu $100^{\circ}C$ selama 5-10 menit lalu diamati warna noda yang tampak. Positif flavonoid jika terjadi perubahan warna pada noda menjadi kuning.

- pereaksi Dragendorff lalu kromatogram dimasukkan dalam oven pada suhu 100°C selama 5 - 10 menit lalu diamati warna noda yang tampak. Positif alkaloid jika terjadi perubahan warna pada noda menjadi warna jingga.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil

IV.1.1 Skrining Antiradikal Bebas Ekstrak

Kedelapan ekstrak (ekstrak heksan dan etanol daun angkana, daun kupu-kupu, daun flamboyan, daun akasia) diskining aktivitas antiradikal bebasnya dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol, dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 518 nm. Nilai analisis probit ditunjukkan dari persen nilai aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH. Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC_{50} .

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akasia memiliki aktivitas yang paling baik dibandingkan ekstrak yang lain dengan nilai persen pengikatan radikal bebas sebesar 78,15%.

IV.1.2 Skrining Antiradikal Bebas Fraksi Hasil Partisi Ekstrak

Ekstrak etanol akasia dipartisi dengan menggunakan etil asetat sehingga diperoleh 2 ekstrak hasil partisi yaitu ekstrak etanol akasia yang larut etil asetat dan tidak larut etil asetat. Kemudian dilakukan uji antiradikal bebas pada kedua ekstrak tersebut, dan berdasarkan hasil pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada

panjang gelombang 518 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun akasia yang tidak larut etil asetat memiliki aktivitas yang paling baik.

IV.1.3 Uji Antiradikal Bebas Fraksi

Ekstrak etanol akasia tidak larut etil asetat difraksinasi secara kromatografi cair vakum dan diperoleh 4 fraksi (fraksi I, fraksi II, fraksi III, dan fraksi IV), keempat fraksi tersebut diuji efek antiradikal bebas dan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi II dan fraksi III memiliki aktivitas tinggi.

IV.2 Pembahasan

Bahan diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi karena maserasi merupakan jenis ekstraksi secara dingin yang sesuai dengan tekstur keempat tanaman yang lunak dan mencegah kerusakan komponen kimia yang tidak tahan terhadap pemanasan. Sampel dimaserasi dengan n-heksan terlebih dahulu kemudian dengan etanol 70%, agar komponen kimia yang bersifat non polar dapat tersari pada heksan dan komponen kimia yang bersifat polar dapat tersari pada etanol 70%. Hal ini dilakukan untuk mempermudah skrining senyawa aktif antiradikal bebas dalam keempat sampel tersebut.

Skrining aktivitas antiradikal bebas kedelapan ekstrak (ekstrak heksan dan etanol daun angkana, daun kupu-kupu, daun flamboyan, daun akasia) dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan diukur pada panjang gelombang 518 nm dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Hasil skrining menunjukkan bahwa ekstrak etanol

daun akasia memiliki aktivitas paling baik sebagai antiradikal bebas dengan nilai persen pengikatan radikal bebas sebesar 78,15% pada konsentrasi 5 mg/ml serta nilai IC_{50} 2,19 mg/ml.

Aktivitas ekstrak dipengaruhi oleh cairan pengestraksi yaitu etanol. Ekstrak etanol pada umumnya lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak heksan, hal ini diduga disebabkan karena senyawa yang aktif sebagai antiradikal bebas adalah senyawa polar.

Ekstrak etanol daun akasia selanjutnya dipartisi dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan metode partisi cair-padat dengan bantuan magnetik stirer kemudian disentrifuse sehingga terpisah menjadi dua bagian yaitu bagian yang larut di dalam etil asetat dan bagian yang tidak larut etil asetat. Aktivitas antiradikal bebas daun akasia diduga karena adanya kandungan flavonoid. Kemampuan flavonoid sebagai antiradikal bebas disebabkan oleh gugus katekol (o-hidroksil) yang dimiliki oleh flavonoid sehingga dapat berperan sebagai donor elektron. Selain itu, flavonoid memiliki ikatan rangkap atom karbon C2-C3 yang berkonjugasi dengan gugus 4-okso pada cincin heterosiklik.

Uji daya antiradikal bebas dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil). DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol, dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 518 nm. Nilai analisis probit ditunjukkan dari persen nilai aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH. Aktivitas antiradikal bebas

ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Berdasarkan hasil pengujian diperoleh bahwa ekstrak yang tidak larut etil asetat memiliki nilai persen pengikatan radikal bebas sebesar 81,26% dengan nilai IC_{50} 1,12 mg/ml pada konsentrasi 5 mg/ml dan ekstrak yang larut etil asetat memiliki nilai persen pengikatan radikal bebas sebesar 78,58% dengan nilai IC_{50} 1.76 mg/ml.

Ekstrak tidak larut etil asetat kemudian difraksinasi menggunakan kolom cair vakum. Fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan profil KLT disatukan dan diperoleh 4 fraksi yaitu fraksi I,II,III, dan fraksi IV. Hasil pengujian yang diperoleh adalah nilai IC_{50} masing-masing fraksi sebesar 365,59 mg/ml (fraksi I), 0.72 mg/ml (fraksi II), 0.74 mg/ml (fraksi III), dan 323,0 mg/ml (fraksi IV). Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi II dan fraksi III memiliki aktivitas paling baik. Namun demikian, efek fraksi II dan fraksi III tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan vitamin C (dengan nilai IC_{50} 0.001 mg/ml).

Identifikasi lebih lanjut terhadap bercak pada fraksi II dilakukan dengan Dragendorff yang tidak menunjukkan adanya perubahan warna bercak menjadi jingga pada lempeng yang berwarna kuning (negatif untuk alkaloid). Sedangkan penyemprotan dengan $FeCl_3$ menunjukkan adanya perubahan warna bercak pada kromatogram menjadi hijau kehitaman yang mengindikasikan adanya flavonoid, serta dengan sitroborat, menunjukkan adanya perubahan warna menjadi kuning muda. Selain itu, bila kromatogram

dilewatkan pada uap amonia maka bercak kuning pada kromatogram menjadi lebih terang dari warna sebelumnya, hal ini juga merupakan salah satu indikasi adanya kandungan flavonoid.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V. 1 Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Ekstrak etanol 70% daun Akasia dan hasil partisinya (ekstrak tidak larut etil asetat) memiliki aktivitas pengikatan radikal bebas.
2. Fraksi aktif hasil fraksinasi dari ekstrak etanol daun Akasia adalah fraksi II dan fraksi III dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 0.72 mg/ml dan 0.74 mg/ml
3. Ekstrak daun Angsana (*Pterocarpus indica* Willd.), daun Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), dan daun Flamboyan (*Delonix regia* Raf.) tidak memiliki aktivitas sebagai antiradikal bebas.
4. $FeCl_3$ memberikan hasil yang positif untuk golongan flavonoid.

V. 2 Saran

1. Perlu dilakukan isolasi dan elusidasi struktur senyawa aktif antiradikal bebas daun akasia (*Acacia* sp. Willd).
2. Memformulasikan sediaan dari daun akasia (*Acacia* sp. Willd).

DAFTAR PUSTAKA

1. Hanson, B.A. 1984. *Understanding Medicinal Plants : Their Chemistry and Therapeutic Action*. The Haworth Herbal Press® . New York, London, Oxford.
2. Anonim. 2006. *Radikal Bebas*. [http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal bebas](http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal_bebas). Diakses tanggal 12 januari 2007.
3. Sauriasari R., 2006. *Mengenal dan Menangkal Radikal Bebas*. www.berita iptek.com. Diakses tanggal 19 Januari 2007..
4. Anonim, 2007. Fabaceae. <http://ms.wikipedia.org/wiki/Fabaceae>. Diakses tanggal 20 April 2007.
5. Batoro, J. 2002. *Kesatuan-kesatuan Klasifikasi Tumbuhan*. Artikel. Malang.
6. Tringali C., 2001. *Bioactive Compounds from Natural Sources*. Taylor and francis. Universita di Catania, Italy.
7. Anonim. Departemen kehutanan.(online), 2000. (<http://www.dephut.go.id/informasi.HUTKOT/hutkot.html>.)
8. Pery, M, Lily., 1980. *Medical Plants of East and Southest Asia: Atributed Properties and Uses*, the MIT Press Cambridge, Massachusetts and London, England.
9. Rohman, Abd & Sugeng, R. 2005. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) Secara In Vitro. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16 (3) : 136-140
10. Bambang Sutrisno, R., 1998. Taksonomi Spermatophyta Untuk Farmasi Edisi I. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta
11. Heyne, K.1987. *Tumbuhan berguna Indonesia* edisi II & IV, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Departemen Kehutanan. Penerbit Yayasan sarana Wana Jaya, Jakarta
12. Anonim,2007, *Akasia*. <http://en.wikipedia.org/wiki/Akasia>. Diakses 14 Juli 2007.
13. Anonim,2007, *Bauhiniaurpurea*. http://en.wikipedia.org/wiki/Bauhinia_purpurea. Diakses 14 Juli 2007.

14. Anonim.2007. *Pterocarpus indica Willd.* [http : // warintek . ristek.go.id/pangan_kesehatan/tanaman obat depkes/1-244](http://warintek.ristek.go.id/pangan_kesehatan/tanaman_obat_depkes/1-244).diakses 14 Juli 2007.
15. Steenis Van, *FLORA*, PT Pradnya Paramita, Jakarta,2003
16. [www.kompas cyber media.com](http://www.kompas.cybermedia.com), *Antioksidan Resep Sehat dan Umur Panjang*. Diakses 29 Januari 2007.
17. Lautan. 1997. Radikal Bebas Pada Eritrosit dan Leukosit. *Cermin Dunia Kedokteran* No.116
18. Husaini, M.A. 1991. Gizi, Proses Penuaan dan umur Panjang. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran* No. 73 : 22,23
19. Muhilal. 1991. Teori Radikal Bebas dalam Gizi dan Kedokteran. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran* No. 73 : 10
20. Tan, H. T. & Rahardja, K. 2002. *Obat-Obat Penting*. Edisi Kelima. PT. Gramedia. Jakarta. 602
21. Pokorni, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. 2001. *Antioxidant in Food; Practical Applications*. CRC Press. New York
22. Halliwell, Barry dan John MC Gutteridge,. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine 3rd edition*. Oxford University Press. London
23. Soewoto H. 2001. Antioksidan eksogen sebagai lini pertahanan kedua dalam menanggulangi peran radikal bebas. Disampaikan pada *Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam*, Jakarta, 24 Maret 2001.
24. Inarno, F. G., 1997, *Kimia Pangan dan Gizi*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 121
25. Hostettmann,K., 2007. *Simple Bioassays, Isolation and Structure Determination of Natural Products from Plant Sources*. Workshop Documentation. Surabaya. 6. Tidak Dipublikasikan.
26. Sadikin, N. 2001. Antioksidan eksogen dan penilaian status antioksidan. Disampaikan pada *Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam*, Jakarta, 24 Maret 2001

27. Catalog and Handbook Of Compound. 1999. *Biochemical and Reagents For Life Science Research*, Sigma-Aldrich, Singapura. 1004
28. Hanani, E., Mun'im,A., Sekarini,R., Wiryowidagdo,S. 2006. Uji Aktivitas Antioksidan Beberapa Spons Laut dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. Vol : 6. 1-3.
29. Rohman, A. & Sugeng, R. 2005. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) Secara In Vitro. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16 (3) : 136-140
30. Suhartono,E., Triawanti, Setiawan B., Firdaus,T.R., Sari, M.P. 2004. Peran Rebusan Daun Tapak Dara (*Catharanthus roseus* L. G.Don) Sebagai Antioksidan dalam Menghambat Fotooksidasi Cairan Nutrisi parenteral Glukosa. *Majalah Obat Tradisional*. Vol : 9. 21-25.
31. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 1997. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.9
32. Molyneux,P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*. Vol 26 (2) : 212
33. Markham, K. R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit ITB. Bandung. 1-2
34. Ebadi, M. 2001. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*. Crc Press. Washington D.C. 395
35. Wildah, Dj., 2001. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Pada Daun Kemuning. *Skripsi*. Jurusan Farmasi Fakultas MIPA. Universitas Hasanuddin. Makassar. 16,17
36. Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Terjemahan oleh Kokasih Padmawinata & Iwang sudiro. Penerbit ITB Bandung. 3-4
37. Harborne, J.B. 1984. *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Penerbit ITB. Bandung.102-103
38. Houghton, Peter, J., Raman, A. 1998. Laboratory Handbook For The Fractination of Natural Extract. 11, 12, 75, 77, 83
39. Sudjadi. 1986. *Metode Pemisahan*. UGM Press. Yogyakarta

40. Gritter, J., Bobbitt, J., Schwarting, A., 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi 2. ITB. Bandung. 140, 142
41. Hostettmann, K., M. dan Marston. A 1985. *Cara Kromatografi Preparatif, Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam*. Penerjemah Dr. Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. 9-12, 33-34.
42. Day, Jr. R.A., and Underwood, A. L., terjemahan oleh R. Soendoro, 1989, *Analisis Kimia Kuantitatif*, edisi kelima, Erlangga, Jakarta, 383-417
43. Solomons, T. W. G., 1980, *Organic Chemistry*, 2nd edition, University of South Florida, John Wiley and Sons, New York, 413
44. Sastroamidjojo, H., 1985, *Spektroskopi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta. 11-15
45. Roth., J.H., Blaschke. 1994. *Analisis Farmasi*. Terjemahan oleh Kisman, S., Ibrahim. S., Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 374

Tabel 1. Harga Probit Sesuai Persentasenya

PROSENTASE	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,87	3,92	3,92	3,95	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,17	4,19	4,23	4,29	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,59	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,85	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,10	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,36	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,64	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,99	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,25	6,34	6,41	6,55	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,66	7,75	7,88	8,09

Tabel 2. Hasil Pengukuran Serapan DPPH Ekstrak Daun Angsana (*Pterocarpus indica* Willd.), Daun Akasia (*Acacia sp* Willd.), Daun Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), Dan Daun Flamboyan (*Delonix regia* Raf.).

Ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas
Etanol Akasia	5	0,1904	0,1898	78,15
		0,1900		
		0,1892		
	2,5	0,4425	0,4403	49,48
		0,4400		
		0,4385		
	1,25	0,5977	0,5965	31,69
		0,5966		
		0,5952		
	0,625	0,7283	0,7268	16,63
		0,7266		
		0,7255		
0,3125	0,8030	0,8018	8,02	
	0,8018			
	0,8006			
Hexan etanol	50	0,6429	0,6080	17,34
		0,5911		
		0,5901		
	20	0,7498	0,7479	14,20
		0,7476		
		0,7463		
	10	0,8308	0,8294	4,85
		0,8291		
		0,8283		
	5	0,8514	0,8496	2,53
		0,8489		
		0,8487		
	2,5	0,8697	0,8672	0,52
		0,8675		
		0,8645		
	1,25	0,8714	0,8694	0,26
		0,8699		
		0,8670		

Ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas
Etanol Flamboyan	5	0,3171	0,2989	65,70
		0,2903		
		0,2894		
	2,5	0,6597	0,6221	28,67
		0,6513		
		0,5555		
	1,25	0,7127	0,7117	18,35
		0,7124		
		0,7102		
	0,625	0,7827	0,7753	11,06
		0,7720		
		0,7712		
0,3125	0,8271	0,8234	5,54	
	0,8222			
	0,8209			
Hexan Flamboyan	50	0,5925	0,5912	23,83
		0,5911		
		0,5901		
	20	0,8028	0,8011	8,10
		0,8015		
		0,7990		
	10	0,8074	0,8074	7,38
		0,8078		
		0,8071		
	0,5	0,8202	0,8187	6,08
		0,8182		
		0,8177		
	2,5	0,8394	0,8383	3,83
		0,8389		
		0,8368		
1,25	0,8537	0,8524	2,21	
	0,8526			
	0,8511			
50	0,5492	0,5479	29,41	
	0,5487			
	0,5459			
20	0,7501	0,7494	14,03	
	0,7499			
	0,7482			
10	0,8096	0,8077	7,34	
	0,8076			
	0,8061			

Ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas
	5	0,8028	0,802	8,00
		0,8022		
		0,8010		
	2,5	0,8133	0,8097	7,11
		0,8087		
		0,8073		
	1,25	0,8381	0,8365	5,09
		0,8365		
		0,8349		
Hexan Kupu-kupu	50	0,5188	0,5112	34,44
		0,5083		
		0,5065		
	20	0,7561	0,7549	13,40
		0,7549		
		0,7537		
	10	0,7922	0,7912	9,23
		0,7906		
		0,7910		
	5	0,7955	0,7944	8,86
		0,7943		
		0,7936		
	2,5	0,8188	0,8174	6,22
		0,8174		
		0,8162		
	1,25	0,8238	0,8223	5,67
		0,8222		
		0,8209		
Hexan Angsana	50	0,5020	0,5007	35,48
		0,5008		
		0,4995		
	20	0,6578	0,6557	24,91
		0,6533		
		0,6561		
	10	0,7516	0,7496	14
		0,7494		
		0,7478		
	5	0,7498	0,7487	14,11
		0,7486		
		0,7478		
	2,5	0,7833	0,7811	10,39
		0,7808		
		0,7794		

Ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas
	1,25	0,8458	0,8438	3,20
		0,8431		
		0,8426		
Etanol Angsana	10	0,4733	0,4724	45,80
		0,4725		
		0,4716		
	5	0,6013	0,6003	31,12
		0,6006		
		0,5992		
	2,5	0,6359	0,6347	27,19
		0,6345		
		0,6337		
	1,25	0,6572	0,6561	24,73
		0,6561		
		0,6552		
	0,625	0,6931	0,6925	20,56
		0,6925		
		0,6919		
Akasia etanol larut etil asetat	5	0,1658	0,1662	78,58
		0,1665		
		0,1665		
	2,5	0,3750	0,3708	52,13
		0,3690		
		0,3684		
	1,25	0,4689	0,4674	39,78
		0,4669		
		0,4664		
	0,0625	0,5570	0,5559	28,37
		0,5559		
		0,5550		
	0,3125	0,6504	0,6482	16,21
		0,6459		
		0,6483		
Akasia etanol tidak larut etil asetat	5	0,1464	0,1454	81,26
		0,1450		
		0,1450		
	2,5	0,1873	0,188	75,78
		0,1887		
		0,1880		
	1,25	0,2616	0,2601	66,5
		0,2599		
		0,2590		

Ekstrak	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas	
	0,625	0,4655	0,4655	40,03	
		0,4658			
		0,4652			
	0,3125	0,5920	0,5912	23,83	
		0,5914			
		0,5903			
Fraksi I	5	0,5398	0,5388	38,18	
		0,5387			
		0,5381			
	2,5	0,5707	0,5730	34,26	
		0,5748			
		0,5737			
	1,25	0,5771	0,5752	34,01	
		0,5748			
		0,5737			
	0,625	0,6047	0,6037	30,74	
		0,6033			
		0,6031			
	0,3125	0,6108	0,6097	30,06	
		0,6098			
		0,6085			
	Fraksi II	5	0,1485	0,1485	82,95
			0,1484		
			0,1487		
2,5		0,1673	0,1669	80,85	
		0,1672			
		0,1662			
1,25		0,3218	0,3203	63,25	
		0,3203			
		0,3189			
0,625		0,4847	0,4831	44,57	
		0,4828			
		0,4820			
0,3125	0,5923	0,5902	32,29		
	0,5898				
	0,5887				
Fraksi III	5	0,1587	0,1584	81,81	
		0,1588			
		0,1579			
	2,5	0,1598	0,1598	81,67	
		0,1598			
		0,1598			

	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	Serapan Rata-rata	% Pengikatan Radikal Bebas
	1,25	0,1745	0,1732	80,12
		0,1732		
		0,1720		
	0,625	0,5581	0,551	36,2
		0,5561		
		0,5543		
	0,3125	0,6415	0,6399	26,59
		0,6395		
		0,6388		
Fraksi IV	5	0,6317	0,6309	27,61
		0,6313		
		0,6297		
	2,5	0,7006	0,6990	19,80
		0,6992		
		0,6974		
	1,25	0,7059	0,7046	19,16
		0,7046		
		0,7035		
	0,625	0,7173	0,717	17,75
		0,7171		
		0,7166		
	0,3125	0,7633	0,7629	12,73
		0,7646		
		0,7608		

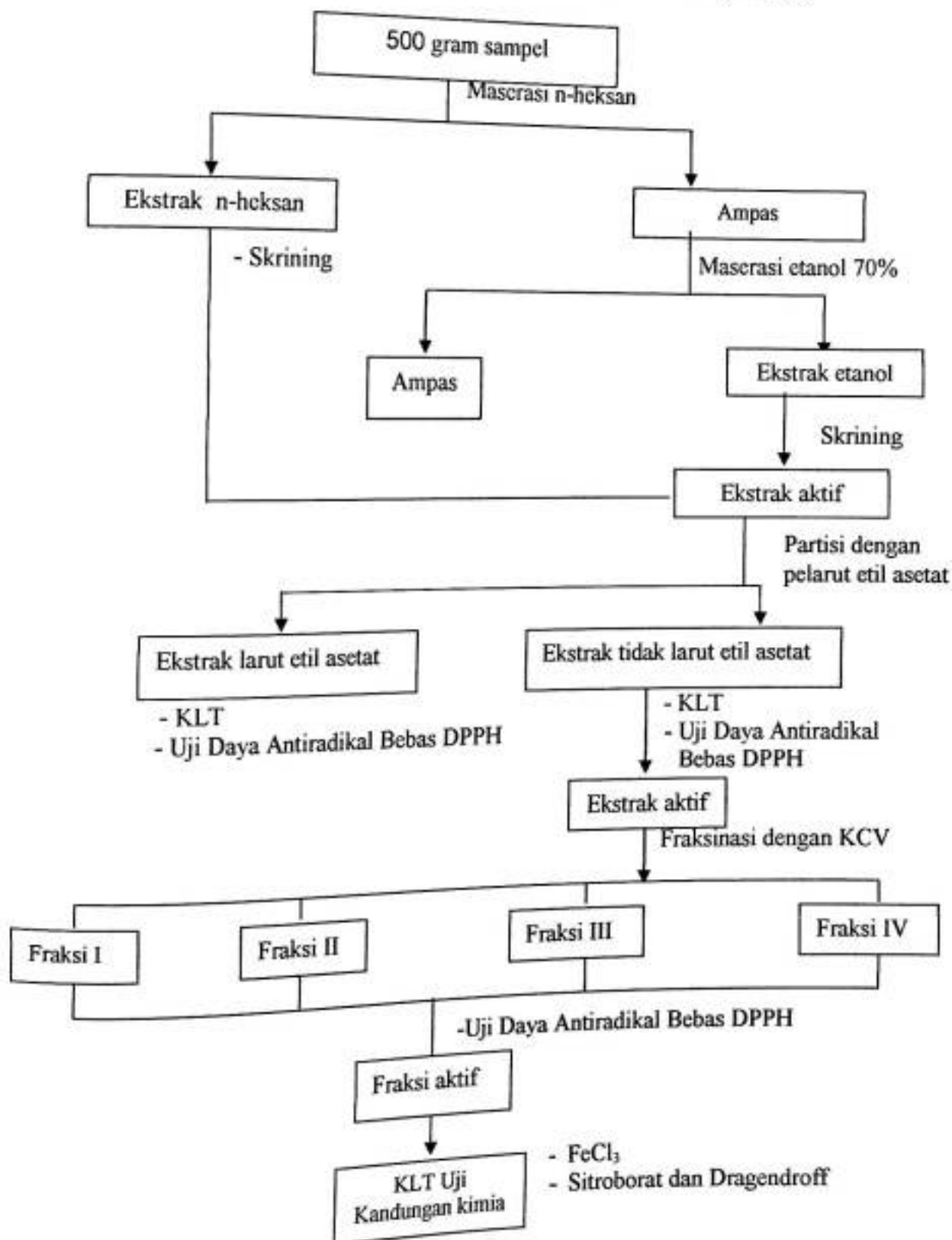
	Konsentrasi (mg/ml)	Serapan	% Pengikatan Radikal bebas
Vitamin C	5	0,0490	92,81
	0,25	0,1841	78,88
	0,125	0,1861	78,64
	0,0625	0,1936	77,79

Tabel 3. Hasil Perhitungan IC₅₀

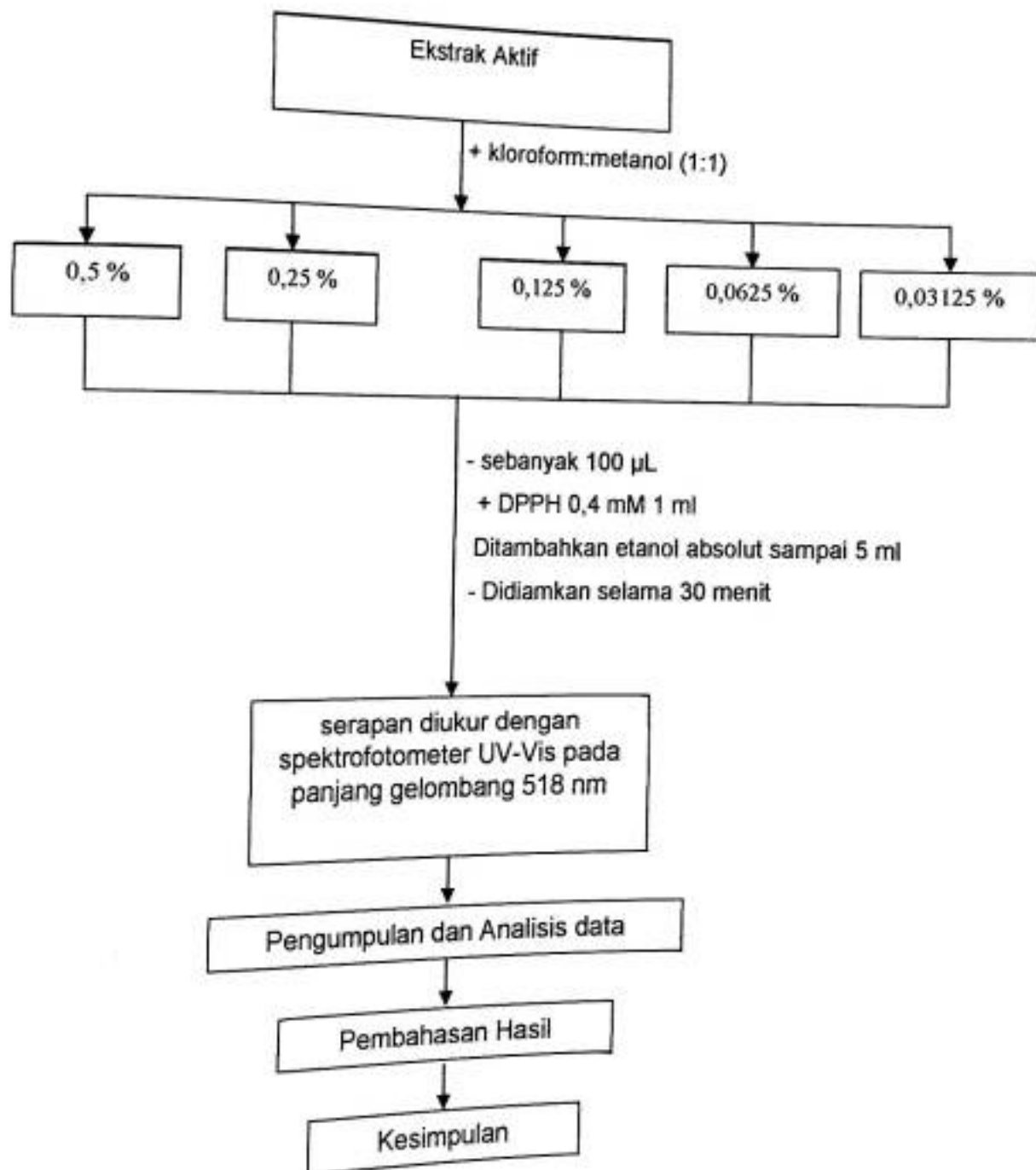
Ekstrak	Konsentrasi mg/ml	Log Konsentrasi (x)	% Pengikatan DPPH	Probit (y)	Persamaan Garis Linier	IC ₅₀ mg/ml
Etanol Akasia	5	0,6989	78,21	5,77	$y = 4,3967 + 1,7674x$ $R^2 = 0,9831$	2,19
	2,5	0,3979	49,48	4,97		
	1,25	0,0969	31,69	4,50		
	0,625	-0,2041	16,63	4,01		
	0,3125	-0,5051	8,02	3,59		
Hexan Akasia	50	1,6989	17,34	4,05	$y = 2,8223 + 0,6827x$ $R^2 = 0,7232$	1548,1
	20	1,3010	14,20	3,92		
	10	1	4,85	3,25		
	5	0,6989	2,53	2,95		
	2,5	0,3979	0,52	3,36		
	1,25	0,0969	0,26	2,95		
Etanol Flamboyan	5	0,6989	65,70	5,39	$y = 4,0523 + 1,5647x$ $R^2 = 0,9363$	4,03
	2,5	0,3979	28,67	4,42		
	1,25	0,0969	18,35	4,08		
	0,625	-0,2041	11,06	3,77		
	0,3125	-0,5051	5,54	3,36		
Hexan Flamboyan	50	1,6989	23,83	4,29	$y = 2,8392 + 0,7498x$ $R^2 = 0,9109$	761,7
	20	1,3010	8,10	3,59		
	10	1	7,38	3,52		
	5	0,6989	6,08	3,45		
	2,5	0,3979	3,83	3,13		
	1,25	0,0969	2,21	2,95		
Etanol Kupu-kupu	50	1,6989	29,41	4,45	$y = 3,1884 + 0,6217x$ $R^2 = 0,8414$	820,16
	20	1,3010	14,03	3,92		
	10	1	8,00	3,59		
	5	0,6989	7,34	3,52		
	2,5	0,3979	7,11	3,52		
	1,25	0,0969	5,09	3,36		
Hexan Kupu-kupu	50	1,6989	34,44	4,59	$y = 3,1502 + 0,7063x$ $R^2 = 0,8497$	415,9
	20	1,3010	13,40	3,92		
	10	1	9,23	3,66		
	5	0,6989	8,86	3,59		
	2,5	0,3979	6,22	3,45		
	1,25	0,0969	5,67	3,36		
Hexan Angsana	50	1,6989	35,48	4,61	$y = 3,2910 + 0,7766x$ $R^2 = 0,8450$	158,7
	20	1,3010	24,91	4,29		
	10	1	14	3,92		
	5	0,6989	14,11	3,92		
	2,5	0,3979	10,39	3,92		
	1,25	0,0969	3,20	3,12		

Etanol Angsana	10	1	45,80	4,87	$y = 4,2311 + 0,5348x$ $R^2 = 0,9035$	27,39
	5	0,6989	31,12	4,50		
	2,5	0,3979	27,19	4,39		
	1,25	0,0969	24,73	4,29		
	0,625	-0,2041	20,56	4,17		
Akasia etanol tidak larut etil asetat	5	0,6989	81,26	5,88	$y = 5,0680 + 1,3621x$ $R^2 = 0,9562$	1,12
	2,5	0,3979	75,78	5,67		
	1,25	0,0969	66,5	5,41		
	0,625	-0,2041	40,03	4,75		
	0,3125	-0,5051	23,83	4,29		
Akasia etanol larut etil asetat	5	0,6989	78,58	5,77	$y = 4,6604 + 1,3787x$ $R^2 = 0,9685$	1,76
	2,5	0,3979	52,13	5,05		
	1,25	0,0969	39,78	4,72		
	0,625	-0,2041	28,37	4,42		
	0,3125	-0,5051	16,21	4,01		
Fraksi I	5	0,6989	38,18	4,69	$y = 4,5489 + 0,1760x$ $R^2 = 0,8968$	365,59
	2,5	0,3979	34,26	4,59		
	1,25	0,0969	34,01	4,59		
	0,625	-0,2041	30,74	4,48		
	0,3125	-0,5051	30,06	4,48		
Fraksi II	5	0,6989	82,95	5,92	$y = 5,1786 + 0,1760x$ $R^2 = 0,9635$	0,72
	2,5	0,3979	80,85	5,84		
	1,25	0,0969	63,25	5,36		
	0,625	-0,2041	44,57	4,85		
	0,3125	-0,5051	32,29	4,53		
Fraksi III	5	0,6989	81,48	5,88	$y = 5,1822 + 1,4219x$ $R^2 = 0,8028$	0,74
	2,5	0,3979	81,67	5,88		
	1,25	0,0969	80,12	5,84		
	0,625	-0,2041	36,2	4,64		
	0,3125	-0,5051	26,59	4,36		
Fraksi IV	5	0,6989	27,61	4,39	$y = 4,0743 + 0,3689x$ $R^2 = 0,8810$	323,0
	2,5	0,3979	19,80	4,12		
	1,25	0,0969	19,16	4,12		
	0,625	-0,2041	17,75	4,05		
	0,3125	-0,5051	12,73	3,87		
Vitamin C	5	0,6989	92,81	6,41	$y = 6,1110 + 0,3751x$ $R^2 = 0,9334$	0,001
	0,25	-0,6020	78,88	5,77		
	0,125	-0,9030	78,64	5,77		
	0,0625	-1,2041	77,79	5,74		

Lampiran 1. Skema Kerja Skrining Antiradikal Bebas Ekstrak Daun Angsana (*Pterocarpus indica* Willd.), Kupu-kupu (*Bauhinia purpurea* Linn.), Akasia (*Acacia* sp. Willd.), Flamboyan (*Delonix regia* Raf.).



Lampiran 2. Skema Kerja Uji Daya Antiradikal bebas



Lampiran 3. Contoh Perhitungan Daya Antiradikal Bebas

$$\text{Daya antiradikal bebas} = \frac{(\text{Abs.blanko} - \text{Abs.sampel})}{\text{Abs.blanko}} \times 100\%$$

Untuk 5 mg/ml pada ekstrak akasia etanol

$$\begin{aligned} &= \frac{0,8718 - 0,1904}{0,8718} \times 100 \% \\ &= 78,16 \% \end{aligned}$$

Lampiran 4. Contoh Perhitungan IC₅₀

[C] mg/ml	Log [C] (x)	Daya Antiradikal Bebas (%)	Nilai Probit (y)
5	0,6989	78,21	5,77
2,5	0,3979	49,48	4,97
1,25	0,0969	31,69	4,50
0,625	-0,2041	16,63	4,01
0,3125	-0,5051	8,02	3,59

$$y = a + bx$$

$$y = 4,3967 + 1,7674 x$$

$$R^2 = 0,9831$$

$$x = \frac{(5 - 4,3967)}{1,7676}$$

$$x = 0,3413$$

$$\text{Alog}(\text{IC}_{50}) = 2,19 \text{ mg/ml}$$

Lampiran 5. Contoh Perhitungan Persamaan Regresi Linear

X	Y	XY	X ²	Y ²
0,6989	5,77	4,03	0,48	33,2
0,3979	4,97	1,97	0,15	24,7
0,0969	4,50	4,59	0,009	20,2
-0,2041	4,01	0,81	-0,04	16,08
-0,5051	3,59	1,81	-0,25	12,8
$\Sigma X=0,4845$ $(\Sigma X)^2=0,2347$	$\Sigma Y= 22,84$ $(\Sigma Y)^2=521,66$	$\Sigma XY= 13,19$	$\Sigma X^2=0,349$	$\Sigma Y^2=106,98$

Persamaan regresi $Y = a + bx$

Y = Serapan

X = Log konsentrasi

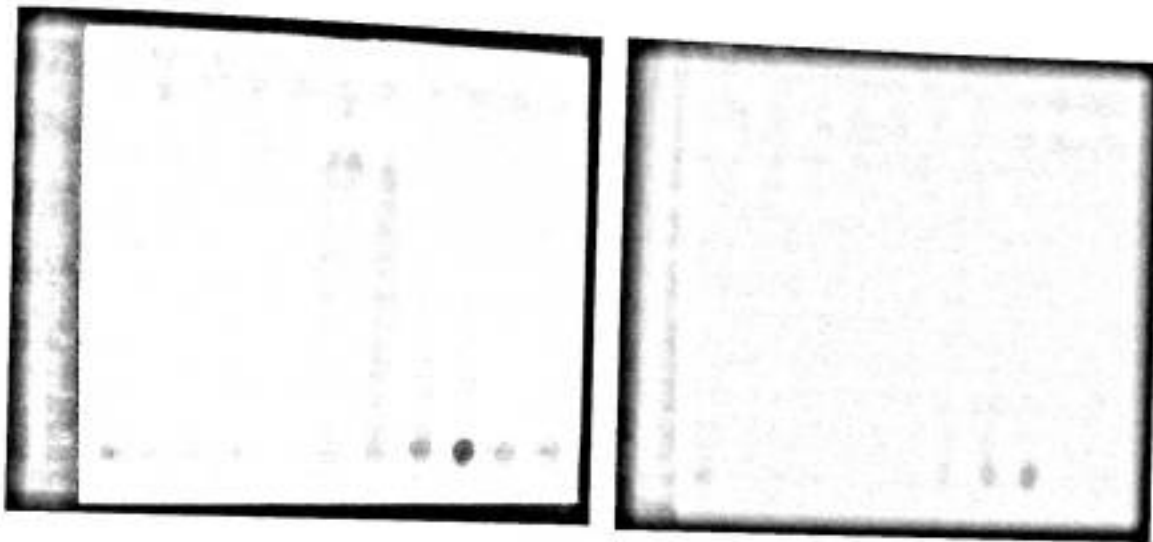
n = jumlah data

Berdasarkan rumus :

$$\begin{aligned}
 b &= \frac{n \Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \\
 &= \frac{5 \times 13,19 - \{(0,4845) (22,84)\}}{5 \times 0,349 - 0,2347} \\
 &= \frac{65,95 - 11,06}{8,725 - 0,2347} \\
 &= \frac{54,89}{8,4903} \\
 &= 6,465
 \end{aligned}$$

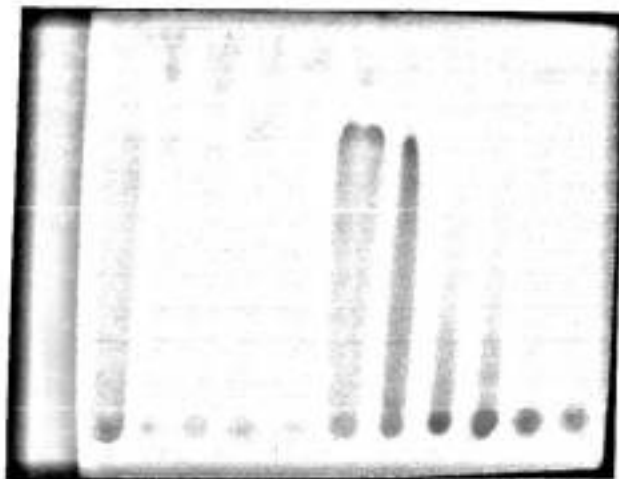
$$\begin{aligned} a &= \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n} \\ &= \frac{22,84 - 6,465 (0,4845)}{5} \\ &= \frac{22,84 - 3,132}{5} \\ &= \frac{19,708}{5} \\ &= 3,9416 \end{aligned}$$

Jadi, $y = 3,9416 + 6,465 x$



UV 254 nm

UV 366 nm

 H_2SO_4 10%

Gambar 9 : Profil KLT Hasil Fraksinasi Ekstrak Etanol Akasia Yang Tidak Larut Etil Asetat dengan eluen etil asetat - metanol (10:1)



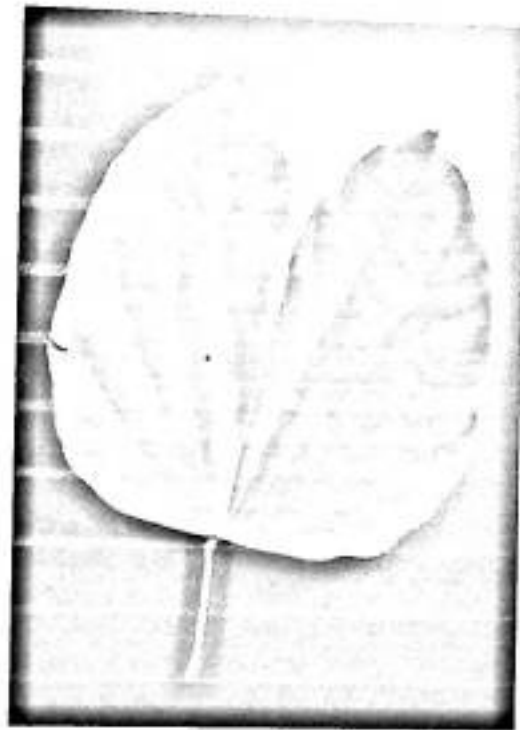
Gambar 10. Profil KLT Ekstrak Etanol Akasia Setelah Disemprot FeCl_3



Gambar 11. Profil KLT Ekstrak Etanol Akasia Setelah Disemprot Sitroborat



Gambar 12. Profil KLT Ekstrak Etanol Akasia Setelah Disemprot Dragendorff



Gambar 13. Daun KUPU-KUPU (*Bauhinia purpurea* Linn)



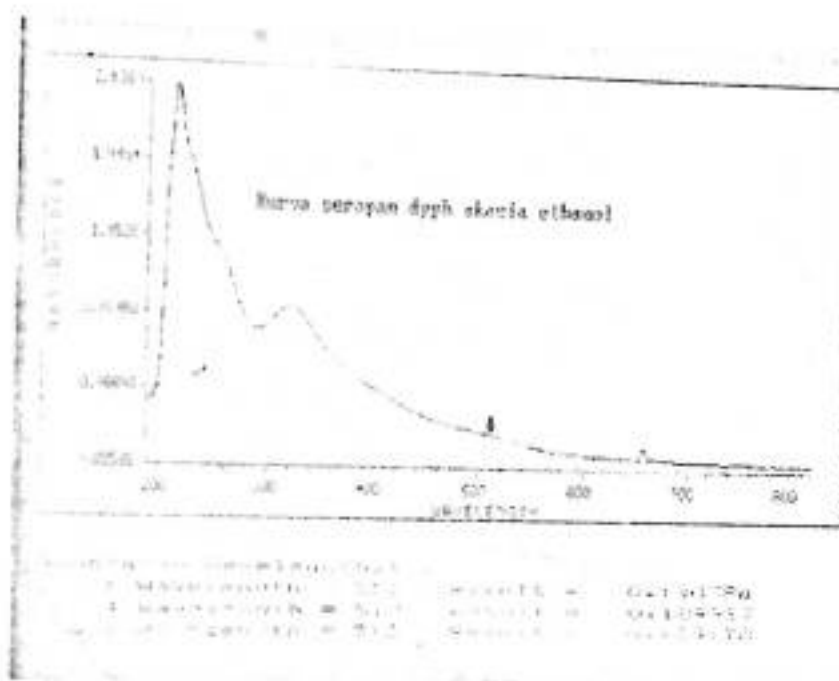
Gambar 14. AKASIA (*Acacia* sp Wild)



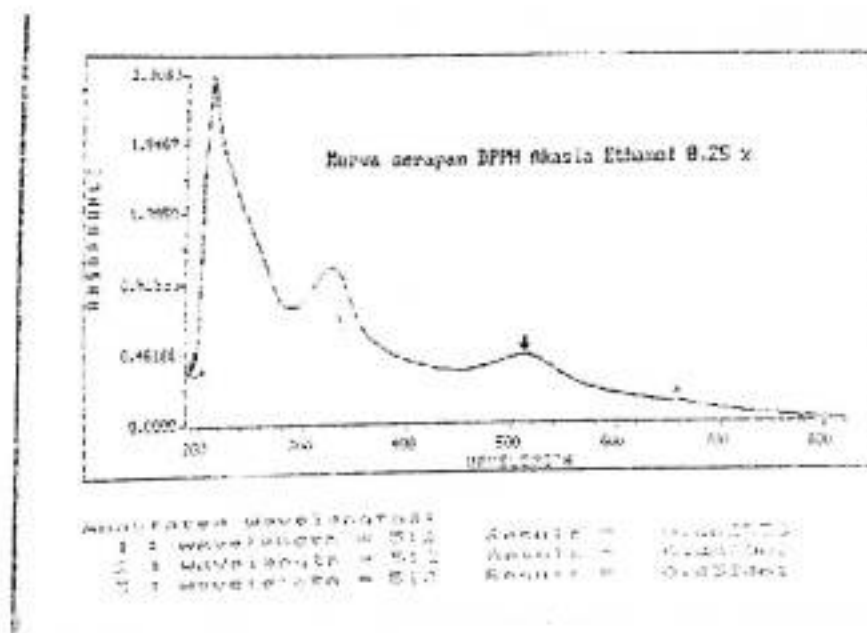
Gambar 15 Daun ANGSANA (*Pterocarpus indica* Willd.)



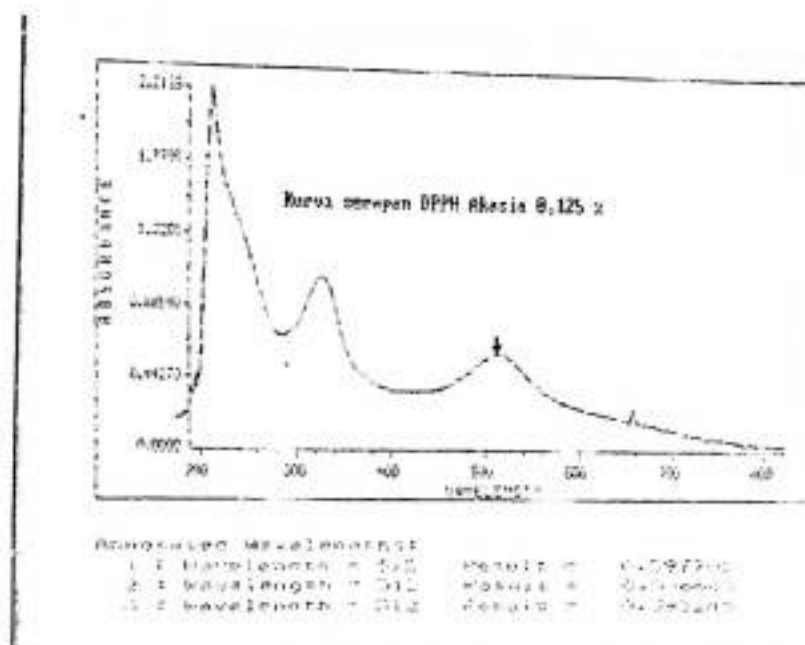
Gambar 16 FLAMBOYAN (*Delonix regia* Raf.)



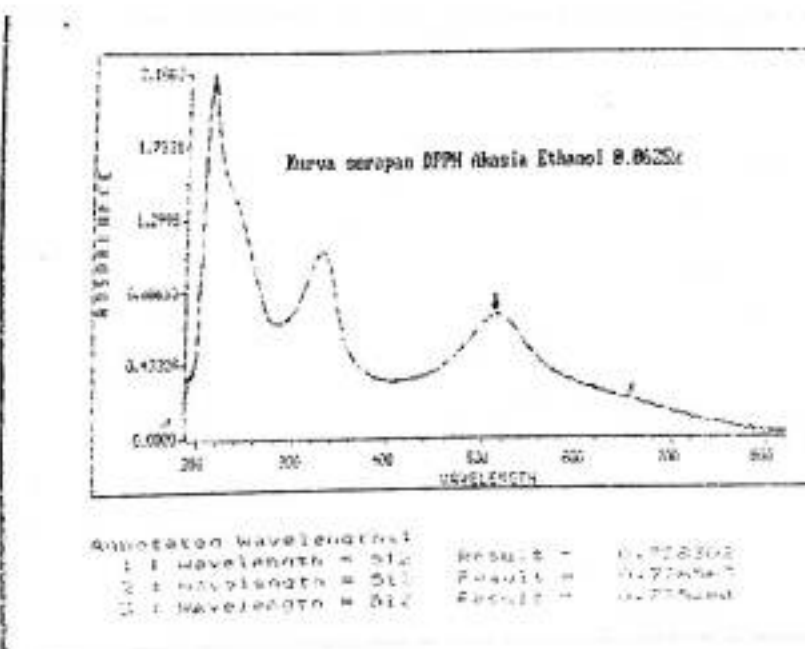
Gambar 17. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Pada Konsentrasi 5 mg/ml



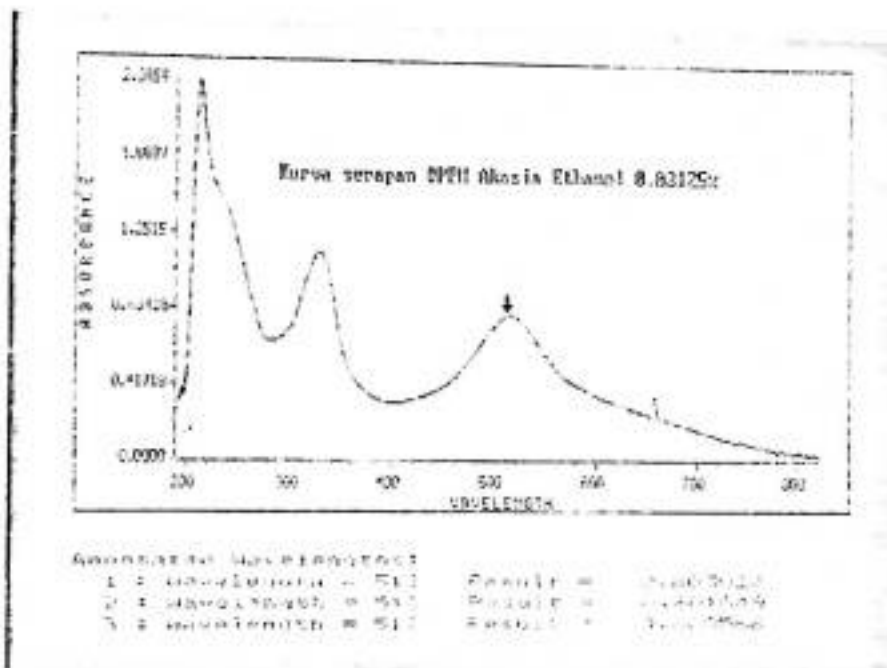
Gambar 18. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Pada Konsentrasi 2,5 mg/ml



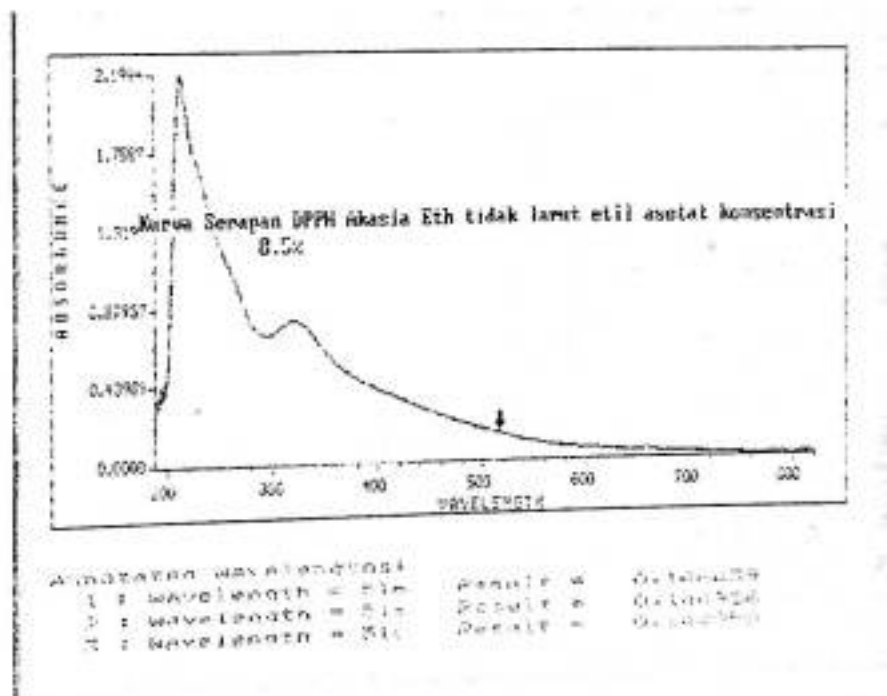
Gambar 19. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Pada Konsentrasi 1,25 mg/ml



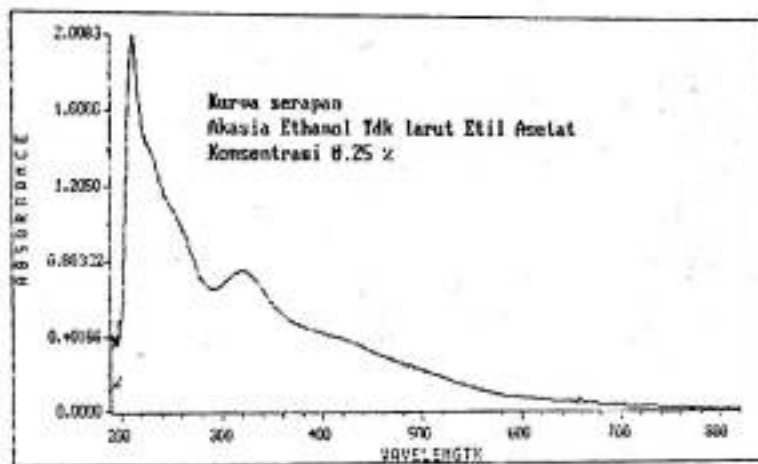
Gambar 20. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Pada Konsentrasi 0,625 mg/ml



Gambar 21. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Pada Konsentrasi 0,3125 mg/ml

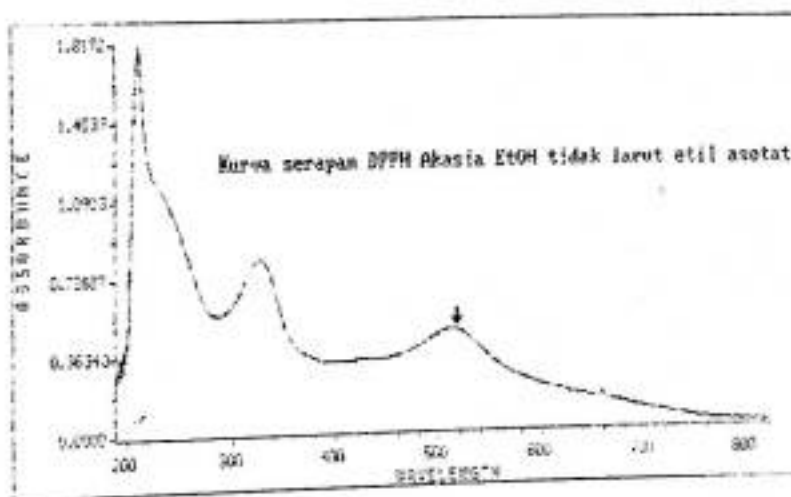


Gambar 22. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Tidak Larut Etil asetat Pada Konsentrasi 5 mg/ml



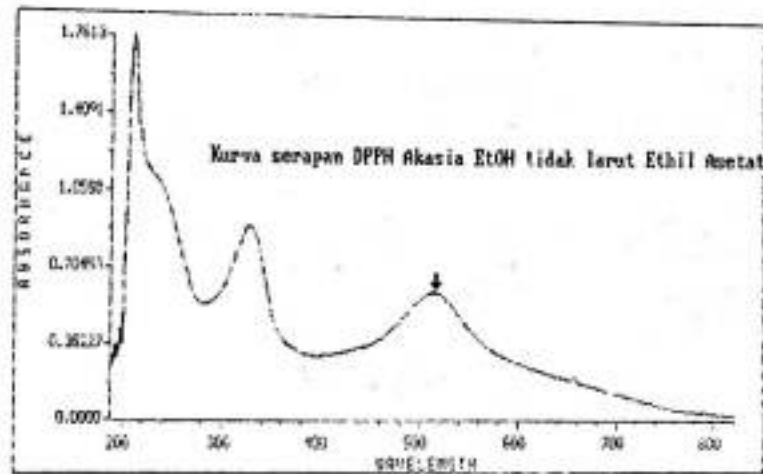
Annotated Wavelengths:
 1 : Wavelength = 516 Result = 0.188734
 2 : Wavelength = 516 Result = 0.198736

Gambar 23. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Tidak Larut Etil asetat Pada Konsentrasi 2,5 mg/ml



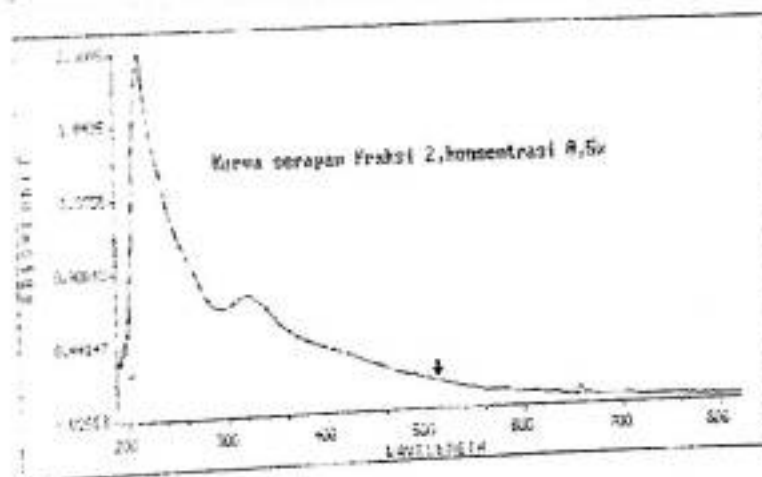
Annotated Wavelengths:
 1 : Wavelength = 516 Result = 0.188734
 2 : Wavelength = 516 Result = 0.198736
 3 : Wavelength = 516 Result = 0.188734

Gambar 24. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Tidak Larut Etil asetat Pada Konsentrasi 0,625 mg/ml



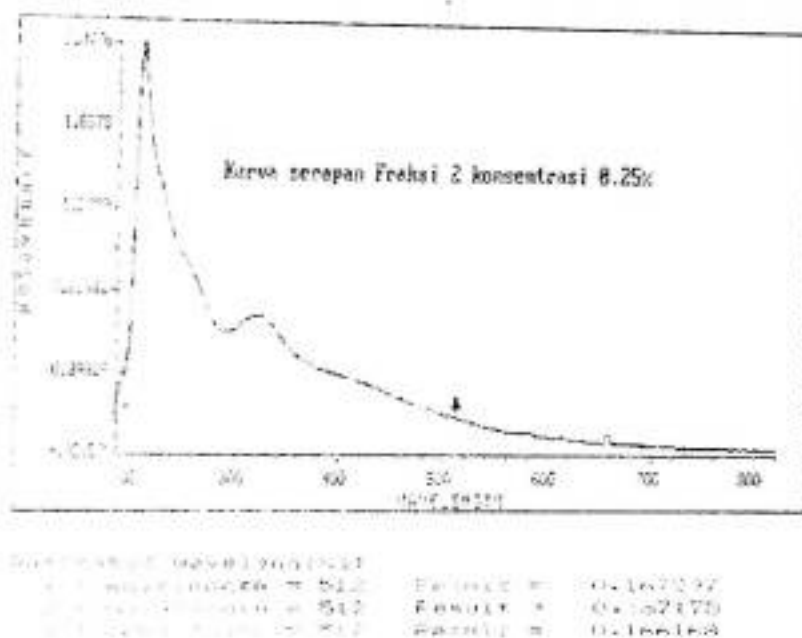
Annotations wavelength:		
1	wavelength = 216	Result = 0.593925
2	wavelength = 516	Result = 0.731504
3	wavelength = 516	Result = 0.590347

Gambar 25. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Ekstrak etanol Akasia Tidak Larut Etil asetat Pada Konsentrasi 0,3125 mg/ml

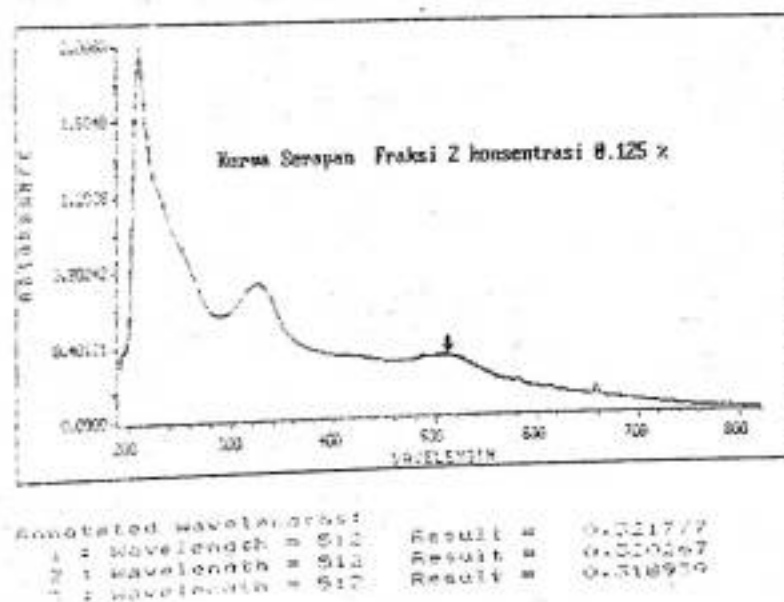


Annotations wavelength:		
1	wavelength = 216	Result = 0.110544
2	wavelength = 516	Result = 0.148375
3	wavelength = 516	Result = 0.142085

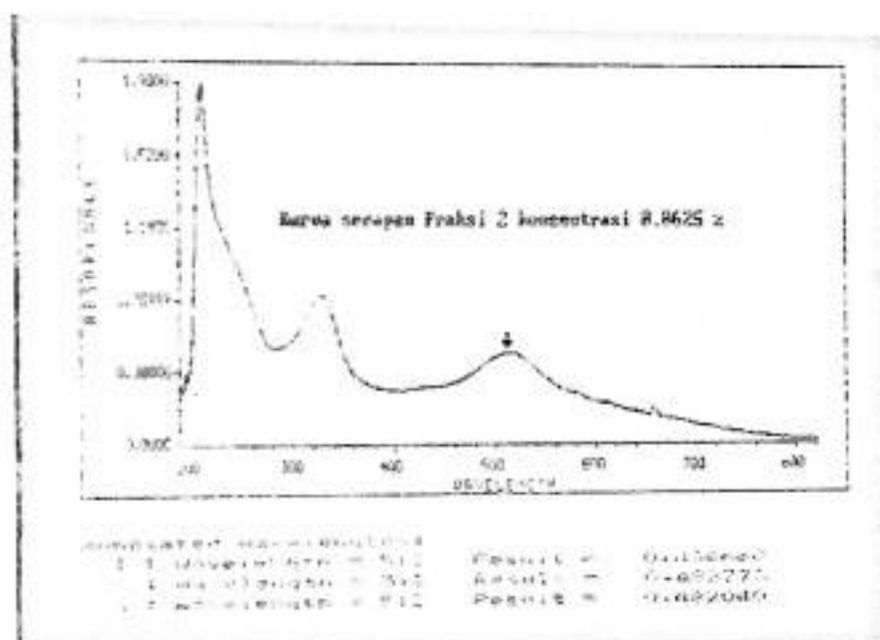
Gambar 26. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Fraksi II Pada Konsentrasi 5 mg/ml



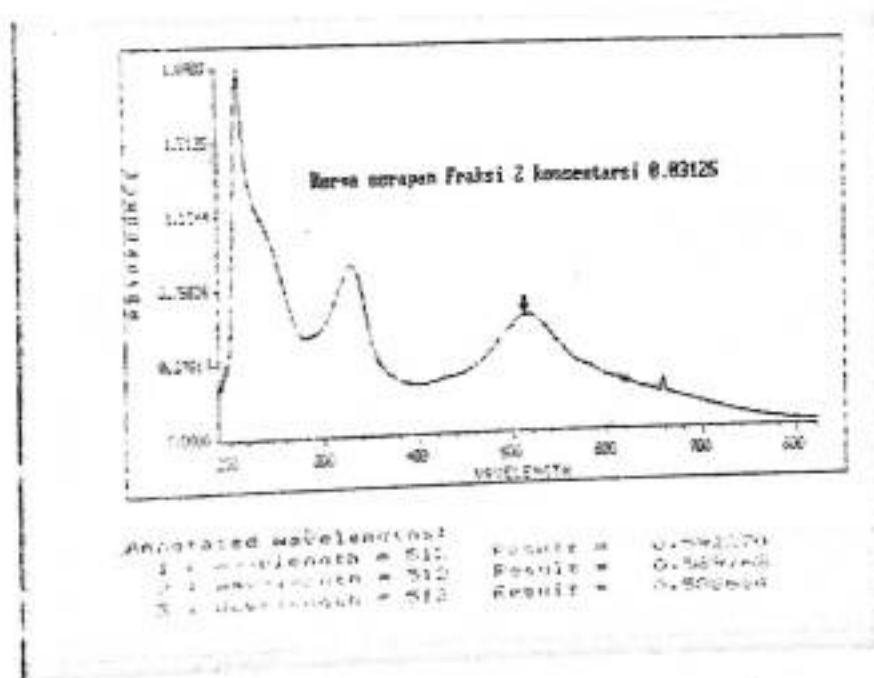
Gambar 27. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Fraksi II Pada Konsentrasi 2,5 mg/ml



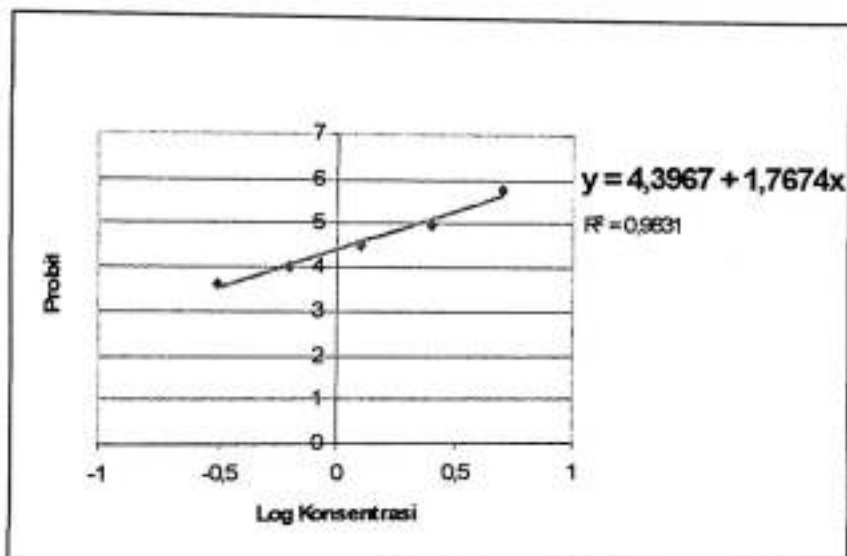
Gambar 28. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Fraksi II Pada Konsentrasi 1,25 mg/ml



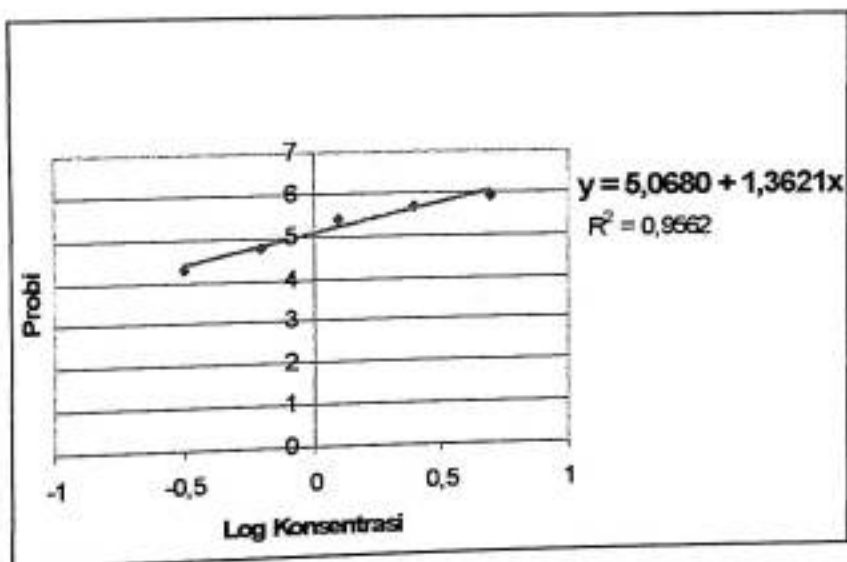
Gambar 29. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Fraksi II Pada Konsentrasi 0,625 mg/ml



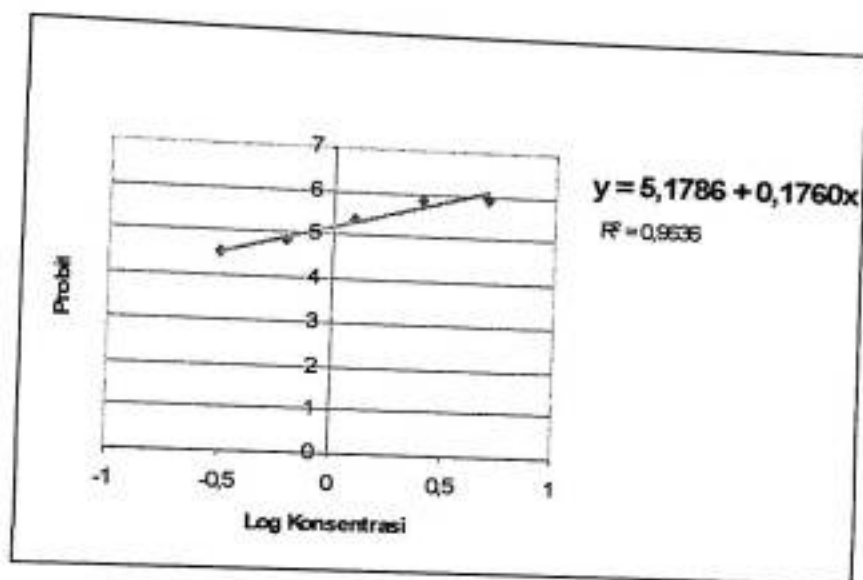
Gambar 30. Kurva Absorbansi DPPH Yang Tidak Terikat Oleh Fraksi II Pada Konsentrasi 0,3125 mg/ml



Gambar 31. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak etanol 70% daun akasia (*Acacia* sp) dengan nilai probit.



Gambar 32. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak tidak larut etil asetat daun akasia (*Acacia* sp) dengan nilai probit.



Gambar 33. Grafik hubungan antara log konsentrasi fraksi II daun akasia (*Acacia sp*) dengan nilai probit.