

**LAPORAN AKHIR**  
**PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL**



**KAJIAN SENYAWA ANTIOKSIDAN DAN ANTIINFLAMASI TUMBUHAN OBAT  
BINAHONG (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ASAL GORONTALO**

**Tahun 2 dari rencana 2 tahun**

**Dr. Yuszda K. Salimi, S.Si., M.Si**  
**NIDN: 0023037106**

**Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si**  
**NIDN: 0029056204**

**JURUSAN PENDIDIKAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO**  
**NOVEMBER 2015**

**LAPORAN AKHIR**  
**PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL**



**KAJIAN SENYAWA ANTIOKSIDAN DAN ANTIINFLAMASI TUMBUHAN**  
**OBAT BINAHONG (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) ASAL**  
**GORONTALO**

**Tahun 2 dari rencana 2 tahun**

**Dr. Yuszda K. Salimi, S.Si.,M.Si**  
**NIDN: 0023037106**

**Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si**  
**NIDN: 0029056204**

**JURUSAN PENDIDIKAN KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO**  
**NOVEMBER 2015**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Kajian Senyawa Antioksidan dan Antiinflamasi Tanaman Obat Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. YUSZDA K SALIMI S.Si, M.Si  
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Gorontalo  
NIDN : 0023037106  
Jabatan Fungsional : Lektor  
Program Studi : Pendidikan Kimia  
Nomor HP : 085219453604  
Alamat surel (e-mail) : mahirakamal@yahoo.co.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dra. NURHAYATI BIALANGI M.Si  
NIDN : 0029056204  
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Gorontalo  
Institusi Mitra (jika ada) : -  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 75.000.000,00  
Biaya Keseluruhan : Rp 105.000.000,00



Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian

(Prof. Dr. Abd. Kadim Masaong, M.Pd)  
NIP/NIK 196111141987031002

Gorontalo, 28 - 7 - 2015  
Ketua,

(Dr. YUSZDA K SALIMI S.Si, M.Si)  
NIP/NIK 197103231998022009

## RINGKASAN

Penelitian ini merupakan upaya eksplorasi/karakterisasi dan mengungkap keunggulan senyawa metabolit sekunder daun binahong yang tumbuh di Gorontalo. Hasil penelitian dapat memberikan tambahan "data base" flavonoid tanaman obat yang berpotensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi.

Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan informasi ilmiah potensi senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun binahong yang tumbuh di Gorontalo sebagai antioksidan dan antiinflamasi, sehingga pemanfaatannya sebagai tumbuhan obat dapat dioptimalkan.

Target khusus terfokus pada hubungan aktivitas biologis dengan senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan binahong yang tumbuh di Gorontalo. Warisan tumbuhan obat yang telah turun temurun di kalangan masyarakat Gorontalo secara ilmiah dapat dibuktikan dari pengujian hayati sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Tujuan jangka panjang untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik pemisahan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi akan menjawab secara ilmiah potensi tumbuhan tersebut.

Tahun pertama penelitian ini telah dilakukan ekstraksi & isolasi komponen bioaktif dari daun binahong dengan metode ekstraksi dan fraksinasi. Ekstrak dan fraksi aktif daun binahong selanjutnya telah diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan toksisitas dengan metode BSLT.

Hasil penelitian tahun pertama, ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi adalah ekstrak etil asetat. Tingginya aktivitas antioksidan pada ekstrak etil asetat didukung oleh uji fitokimia dan kandungan fenolik total. Uji fitokimia pada ekstrak etil asetat positif mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, steroid dan triterpenoid dengan intensitas yang paling tinggi di antara semua fraksi. Hasil analisis kandungan fenolik total tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat memiliki total fenolik yang paling tinggi yaitu  $93,98 \pm 0,30$  mg GAE/g. Ekstrak metanol memiliki total fenolik sebesar  $90,59 \pm 0,75$  mg GAE/g. Sedangkan n-heksan memiliki total fenolik yang paling kecil yaitu  $84,64 \pm 1,59$  mg GAE/g.

Tahun kedua penelitian, identifikasi senyawa aktif flavonoid dihasilkan dari ekstrak metanol setelah dianalisis dengan spektrofotometri infra red (IR). Ekstrak etil asetat daun binahong dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi. Fraksi yang prospektif adalah fraksi dengan no 8, 64, 67, 68, 71, 76, 83, 94, dan 107. Pengujian efek antiinflamasi pra-klinis dilakukan secara *in vivo* pada tikus putih jantan galur wistar. Inflamasi menggunakan karagenan sebagai penginduksi bengkak pada telapak kaki kanan tikus putih jantan. Fraksi-fraksi aktif yang lebih kuat akan dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi. Fraksi etil asetat mampu menghambat inflamasi. Isolat murni yang prospektif ditentukan strukturnya melalui studi spektroskopi. Uji spektroskopi yang dilakukan dengan UV-Vis, dan IR menunjukkan senyawa yang terkandung dalam daun binahong menunjukkan serapan melebar pada daerah bilangan gelombang  $3339,28 \text{ cm}^{-1}$  adalah serapan uluran O-H yang diduga adalah senyawa flavonoid.

## **PRAKATA**

### **Bismillahirrahmanirrahim**

Alhamdulillah atas berkat rahmat Allah Ta'ala laporan kemajuan penelitian kami dengan judul "Kajian senyawa antioksidan dan antiinflamasi tumbuhan obat binahong (*androdera cordifolia* (ten.) Steenis) asal Gorontalo" selesai dilaksanakan berkat kerjasama tim peneliti.

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada anggota peneliti Dra. Nurhayati Bialangi, M.Si atas kerjasama selama penelitian berlangsung. Hal yang sama juga kami sampaikan kepada Hamid Majelis, S.Pd dan Friska Makalungsenge, S.Pd yang telah membantu sejak pengambilan sampel hingga laporan ini selesai.

Terima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini. Hal yang sama kami sampaikan kepada ketua lembaga penelitian dan staf yang telah bekerja sama dengan baik.

Kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas bantuan moril dan kerja sama selama penelitian berlangsung. Semoga Allah Ta'ala membalas segala upaya yang telah diberikan sehingga penelitian ini berjalan lancar dan selesai pada waktunya.

Fastabiqul Khairat.

Wasalamualaikum warahmatulahi wabarakatuh

**Ketua Peneliti**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>ix</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b> .....	<b>7</b>
<b>BAB 4. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>8</b>
<b>BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>13</b>
<b>BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>37</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>39</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
<b>Tabel 1</b> Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi.....	15
<b>Tabel 2</b> Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Binahong ( <i>A. cordifolia</i> ) .....	19

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
<b>Gambar 1</b>	Jalur pencarian senyawa aktif dari tanaman obat ..... 6
<b>Gambar 2</b>	Alur kerja penelitian ekstraksi dan fraksinasi..... 10
<b>Gambar 3</b>	Alur kerja penelitian pemisahan dan pemurnian ..... 11
<b>Gambar 4</b>	Rendemen Tahap 1 dan 2..... 16
<b>Gambar 5</b>	Rendemen Hasil Fraksinasi ..... 16
<b>Gambar 6</b>	Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong Terhadap Kematian Larva <i>Artemia salina</i> Leach ..... 20
<b>Gambar 7</b>	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas ..... 21
<b>Gambar 8</b>	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas ..... 22
<b>Gambar 9</b>	Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas ..... 22
<b>Gambar 10</b>	Kandungan fenolik total masing-masing ekstrak..... 24
<b>Gambar 11</b>	Nilai AEAC pada masing-masing ekstrak ..... 26
<b>Gambar 12</b>	Nilai IC <sub>50</sub> pada masing-masing ekstrak ..... 28

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
<b>Lampiran 1</b> Dokumentasi Penelitian .....	39
<b>Lampiran 2</b> Personalia peneliti .....	43
<b>Lampiran 3</b> Draft publikasi artikel.....	47



## BAB 1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu negara terkaya di dunia dalam cadangan plasma nutfah tanaman obat. Terdapat sekitar 30.000 spesies tanaman, 9600 spesies di antaranya berpotensi untuk dikembangkan menjadi tanaman obat, dan kurang lebih hanya 300 spesies yang telah digunakan sebagai bahan obat tradisional oleh industri obat tradisional (Hidayat 2011).

Berdasarkan warisan turun temurun nenek moyang, para ahli mulai merancang dan mengembangkan metode-metode penelitian untuk mengetahui adanya kandungan senyawa kimia dalam tanaman sehingga dapat digunakan sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit. Beberapa tumbuhan obat telah dimanfaatkan orang untuk mengatasi berbagai penyakit, termasuk peradangan. Radang atau inflamasi merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralkan dan memusnahkan agen-agen yang berbahaya atau bahan infeksi pada tempat cedera serta untuk mempersiapkan keadaan selanjutnya yang dibutuhkan untuk memperbaiki jaringan. Selama proses inflamasi, biasanya akan menimbulkan bengkak, nyeri, kemerahan, dan panas (Kee & Hayes 1996).

Di antara tumbuhan yang biasa dimanfaatkan sebagai obat adalah binahong (*Anredera cordifolia*[Ten.] Steenis) . Daun binahong sering digunakan oleh masyarakat di Gorontalo sebagai obat-obatan tradisional. Tanaman tersebut sengaja ditanam oleh masyarakat agar mudah diambil saat dibutuhkan. Binahong digunakan oleh masyarakat untuk menyembuhkan luka, batuk, dan penambah darah. Tumbuhan tersebut diambil beberapa pucuk untuk direbus dan air rebusannya diminum. Masyarakat mungkin tidak mengetahui pada tanaman tersebut terdapat kandungan senyawa metabolit sekunder sehingga bermanfaat sebagai obat. Masyarakat di Gorontalo menggunakan tanaman tersebut sebagai obat hanya berdasarkan warisan turun temurun yang kemudian dijadikan kebiasaan.

Untuk mengkaji secara ilmiah senyawa penting yang terdapat pada daun binahong dapat bermanfaat terhadap kesehatan dan berfungsi sebagai obat, maka

perlu adanya penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun binahong yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi dalam tubuh. Adanya zat antioksidan dapat melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas yang membahayakan kesehatan tubuh. Pengujian terhadap antiinflamasi perlu dilakukan karena obat-obat sintetis antiinflamasi yang digunakan selama ini masih menimbulkan beberapa efek samping yang tidak diinginkan, contohnya indometasin yang dapat menimbulkan efek samping, seperti keluhan saluran cerna seperti mual, muntah, anoreksia, diare & nyeri abdomen (Mycek 2001). Masyarakat cenderung untuk memakai obat tradisional karena dianggap memiliki keuntungan, antara lain harga yang relatif murah, mudah dalam memperoleh bahan bakunya, dan relatif aman karena adanya anggapan bahwa obat tradisional memberikan efek samping yang lebih kecil dibandingkan dengan obat sintetis.

Hubungan antara fraksi yang prospektif dengan aktivitas biologis perlu dilakukan dengan metode pemisahan untuk mendapatkan isolat murni sehingga terdapat hubungan erat antara hulu dan hilir. Isolat murni yang prospektif ditentukan strukturnya melalui studi spektroskopi (UV-Vis; IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$ ) sehingga komponen aktif yang berperan sebagai antioksidan dan antiinflamasi dapat diketahui.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Deskripsi Tanaman

#### 2.1.1. Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis)

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Ten.] Steenis) merupakan tanaman yang berasal dari dataran Cina dengan nama asalnya adalah Dheng shan chi dan menyebar ke Asia Tenggara, di Inggris disebut *madeira vine*. Tanaman binahong termasuk dalam famili Basellaceae, merupakan salah satu tanaman obat yang berpotensi dapat mengatasi berbagai jenis penyakit. Tanaman ini berupa tumbuhan menjalar, berumur panjang (perennial), bisa mencapai panjang  $\pm$  5 m. Akar berbentuk rimpang, berdaging lunak. Daun tunggal, bertangkai sangat pendek (sessile), tersusun berseling, berwarna hijau, bentuk jantung (cordata), panjang 5-10 cm, lebar 3-7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, permukaan licin, bisa dimakan. Bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul di ketiak daun, mahkota berwarna krem keputih-putihan berjumlah lima helai tidak berlekatan, panjang helai mahkota 0,5-1 cm, berbau harum. Perbanyak generatif (biji), namun lebih sering berkembang atau dikembangbiakan secara vegetatif melalui akar rimpangnya (Mufid Khunaifi, 2010).

Klasifikasi tanaman binahong (*Anredera Cordifolia*) menurut situs adalah:

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Tracheobionta (berpembuluh)
Superdivisio	:	Spermatophyta (menghasilkan biji)
Divisio	:	Magnoliophyta (berbunga)
Kelas	:	Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Subkelas	:	Hamamelidae
Ordo	:	Caryophyllales
Familia	:	Basellaceae
Genus	:	Anredera
Species	:	<i>Anredera cordifolia</i> (Tenore) Steenis

Manfaat tanaman ini sangat besar dalam dunia pengobatan, secara empiris binahong dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Dalam pengobatan, bagian tanaman yang digunakan dapat berasal dari akar, batang, daun, dan bunga maupun umbi yang menempel pada ketiak daun. Tanaman ini dikenal dengan sebutan

*Madeira Vine* dipercaya memiliki kandungan antioksidan tinggi dan antivirus. Beberapa penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke, wasir, reumatik, pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan, menyembuhkan segala luka dalam dan khitanan, radang usus, melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing-pusing, sakit perut, menurunkan panas tinggi, menyuburkan kandungan, maag, asam urat, keputihan, pembengkakan hati, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh.

Laporan Rachmawati (2007) mengungkapkan skrining fitokimia daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten. ) Steenis dengan melakukan maserasi terhadap serbuk kering daun dengan menggunakan pelarut n-heksana dan metanol didapatkan kandungan kimia berupa saponin, triterpenoid, flavanoid dan minyak atsiri. Selain itu, Rochani (2009) melaporkan ekstraksi dengan cara maserasi daun binahong dengan menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat dan etanol, setelah dilakukan uji tabung ditemukan kandungan alkaloid, saponin dan flavanoid, sedangkan pada analisis secara KLT ditemukan senyawa alkaloid, saponin dan flavanoid. Setiaji (2009) telah melakukan ekstraksi pada rhizoma binahong dengan pelarut etil asetat, petroleum eter, dan etanol 70% di dapatkan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan polifenol. Pada ekstrak dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 2 % dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada ekstrak dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 2% dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* (Desi, 2001).

## **2.2. Antioksidan**

Antioksidan adalah senyawa atau bahan yang digunakan pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi. Aktivitas antioksidan merupakan suatu aktivitas senyawa yang bersifat untuk menghambat terjadinya pembentukan radikal bebas di dalam tubuh. Antioksidan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan

elektron yang dimiliki radikal bebas dan dapat menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid (Moein *et al.* 2007).

Antioksidan dalam pengertian kimia, merupakan senyawa pemberi elektron. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa terhambat. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Secara fisiologis senyawa fenolik mempunyai beberapa aktivitas biologis, seperti antialergi, antiinflamasi, antimikroba, antioksidan, antitrombotik dan kardioprotektif (Aberoumand & Deokule 2008).

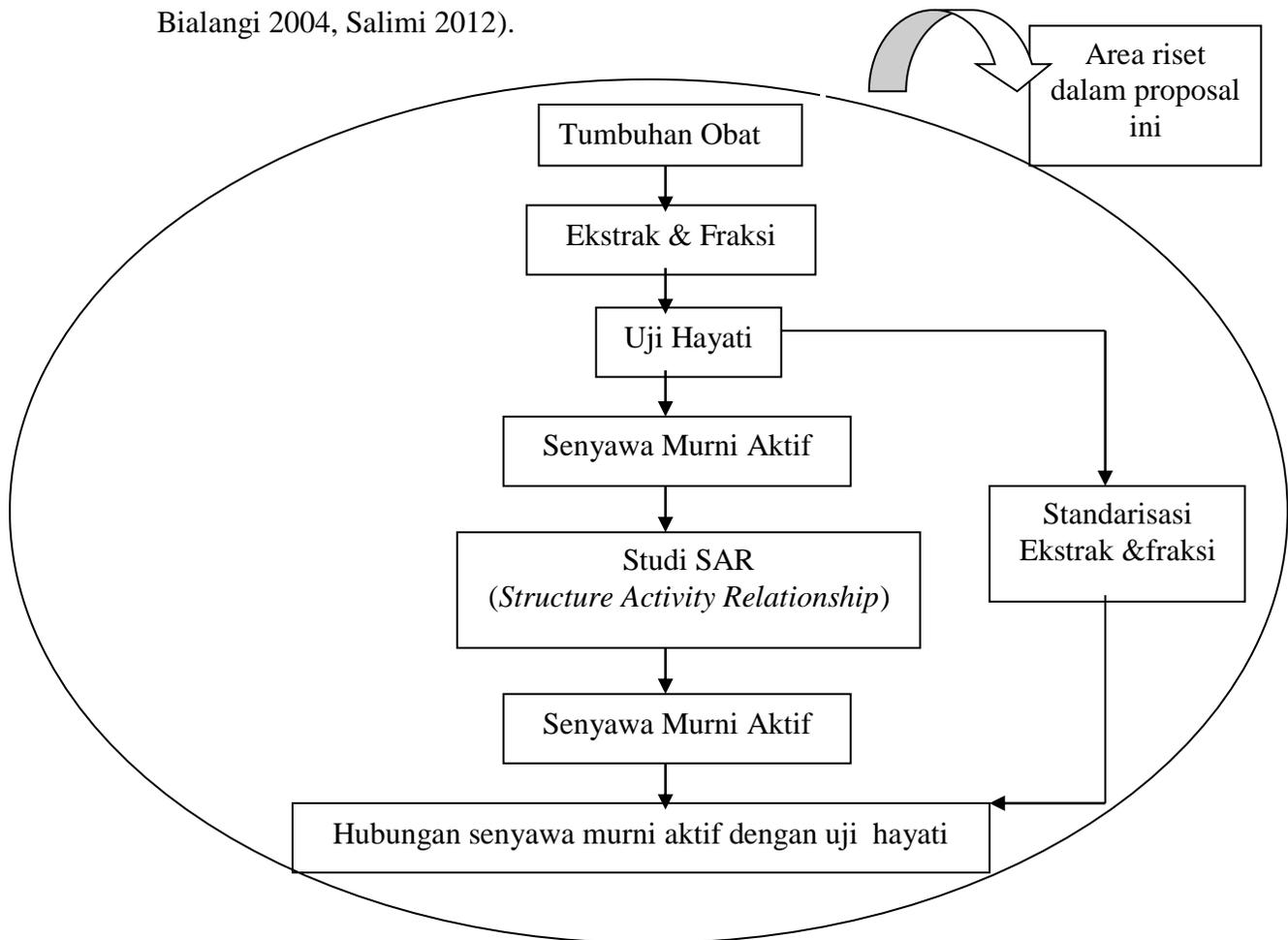
### **2.3. Inflamasi**

Inflamasi atau radang merupakan suatu mekanisme perlindungan tubuh untuk menetralkan dan memusnahkan agen-agen yang berbahaya atau bahan infeksi pada tempat cedera serta untuk mempersiapkan keadaan selanjutnya yang dibutuhkan untuk memperbaiki jaringan. Inflamasi merupakan sebuah respon protektif normal terhadap luka jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia yang merusak, atau zat-zat mikrobiologik yang bersifat patogen. Inflamasi diidentifikasi sebagai suatu reaksi lokal organisme terhadap suatu iritasi atau keadaan non fisiologik. Secara skematis dibedakan 4 fase gejala-gejala inflamasi yaitu: (1) Eritem : vasodilatasi pembuluh darah menyebabkan tertahannya darah oleh perubahan permeabilitas pembuluh sehingga plasma dapat keluar dari dinding pembuluh; (2) Ekstravasasi: keluarnya plasma melalui dinding pembuluh darah dan menyebabkan udem; (3) Suppurasi dan nekrosis: pembentukan nanah dan kematian jaringan yang disebabkan oleh penimbunan leukosit-leukosit di daerah inflasi; (4) Degenerasi jaringan: tidak terdapat pembentukan sel-sel baru untuk pembentukan pembuluh darah dan makin bertambahnya serat-serat kolagen yang tidak berfungsi. Kebanyakan dari gejala

tersebut di atas telah dijadikan sebagai dasar berbagai metode percobaan untuk mengevaluasi obat-obat anti inflamasi (Kee & Hayes 1996).

#### 2.4. Peta Jalan Penelitian

Penelitian tentang tumbuhan yang tumbuh di Gorontalo dan tanaman obat tradisional berupa kandungan senyawa metabolit sekunder dan khasiatnya telah dilaksanakan oleh tim peneliti sejak tahun 2004 di Universitas Negeri Gorontalo namun belum dipublikasikan. Beberapa tumbuhan yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang telah diteliti oleh tim kami seperti daun jarak pagar, tumbuhan *Ocimum sanctum* Linn, brotowali, sorgum (Bialangi, 2008, Bialangi 2002, Bialangi 2004, Salimi 2012).



**Gambar 1. Jalur pencarian senyawa aktif dari tanaman obat**

## **BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

### **3.1. Tujuan Penelitian**

Secara rinci tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Mengekstraksi dan fraksinasi senyawa metabolit sekunder daun tanaman binahong
2. Menguji toksisitas ekstrak dan fraksi secara *in vitro*
3. Menguji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi aktif tanaman binahong secara *in vitro*
4. Mengevaluasi secara *in vivo* (dengan tikus percobaan) aktivitas antiinflamasi fraksi yang prospektif.
5. Mengungkapkan hubungan struktur dan aktivitas biologi flavonoid hasil isolasi dengan metode spektroskopis UV-Vis, IR, dan NMR.

### **3.2. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini dapat memberikan tambahan "data base" metabolit sekunder seperti flavonoid yang berpotensi obat, juga untuk mengeksplorasi sumber senyawa kimia asal tumbuhan Indonesia khususnya yang tumbuh di daerah Gorontalo. Hasil penelitian ini akan diseminarkan dan dipublikasikan di dalam atau luar negeri sehingga karya ilmiah ini bermanfaat.

## BAB 4. METODE PENELITIAN

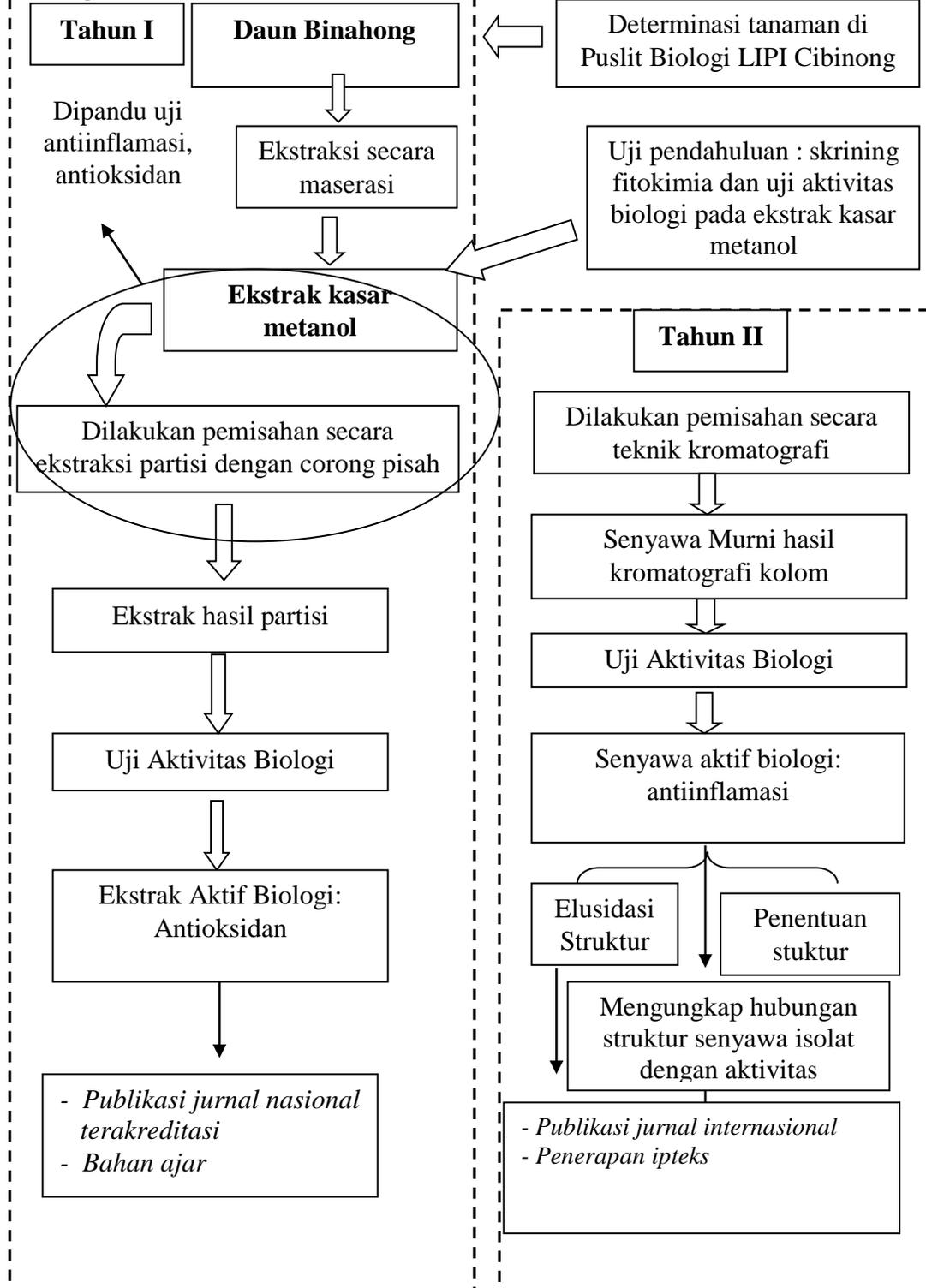
### 3.1 Pentahapan Kegiatan Penelitian

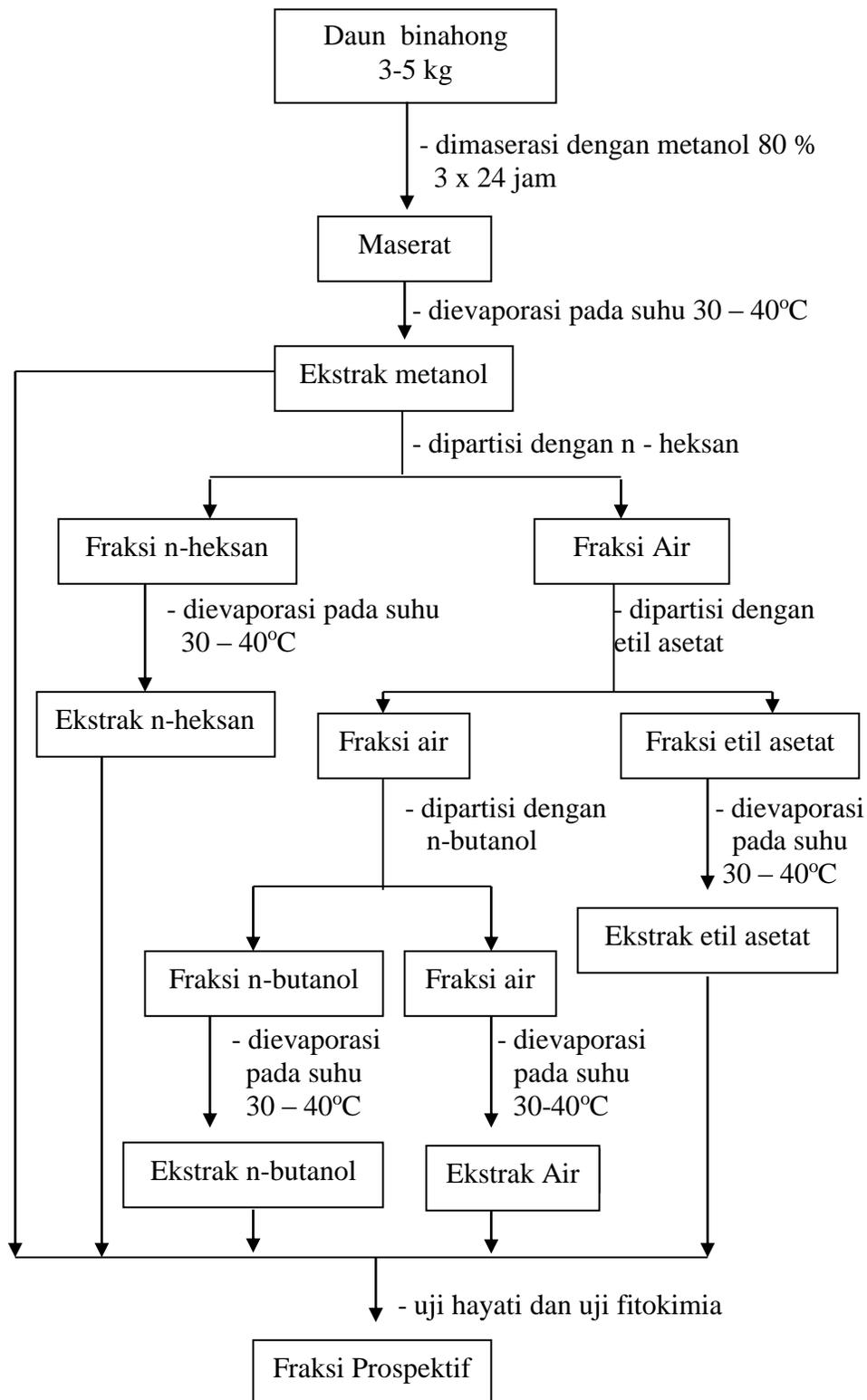
Penelitian ini dirancang dalam delapan tahap percobaan selama periode waktu dua tahun yaitu: **tahap I** penelitian ini diawali dengan pengumpulan dan penyiapan daun tumbuhan binahong yang tumbuh di daerah Gorontalo, dan diikuti dengan ekstraksi dan fraksinasi senyawa bioaktif, **tahap II** pengujian kapasitas antioksidan dengan metode DPPH, **tahap III** uji aktivitas biologi dilakukan uji efek antiinflamasi menggunakan karagenan sebagai penginduksi bengkak pada telapak kaki kanan tikus putih jantan, **tahap V** terhadap fraksi yang prospektif flavonoid dan aktif biologi dilakukan pemisahan untuk mendapatkan isolat murni melalui teknik kromatografi menggunakan variasi adsorben dan sistem pelarut **tahap VI** elusidasi struktur senyawa aktif berdasarkan data spektrum spektroskopi.

Indikator capaian dari setiap tahap sebagai berikut :

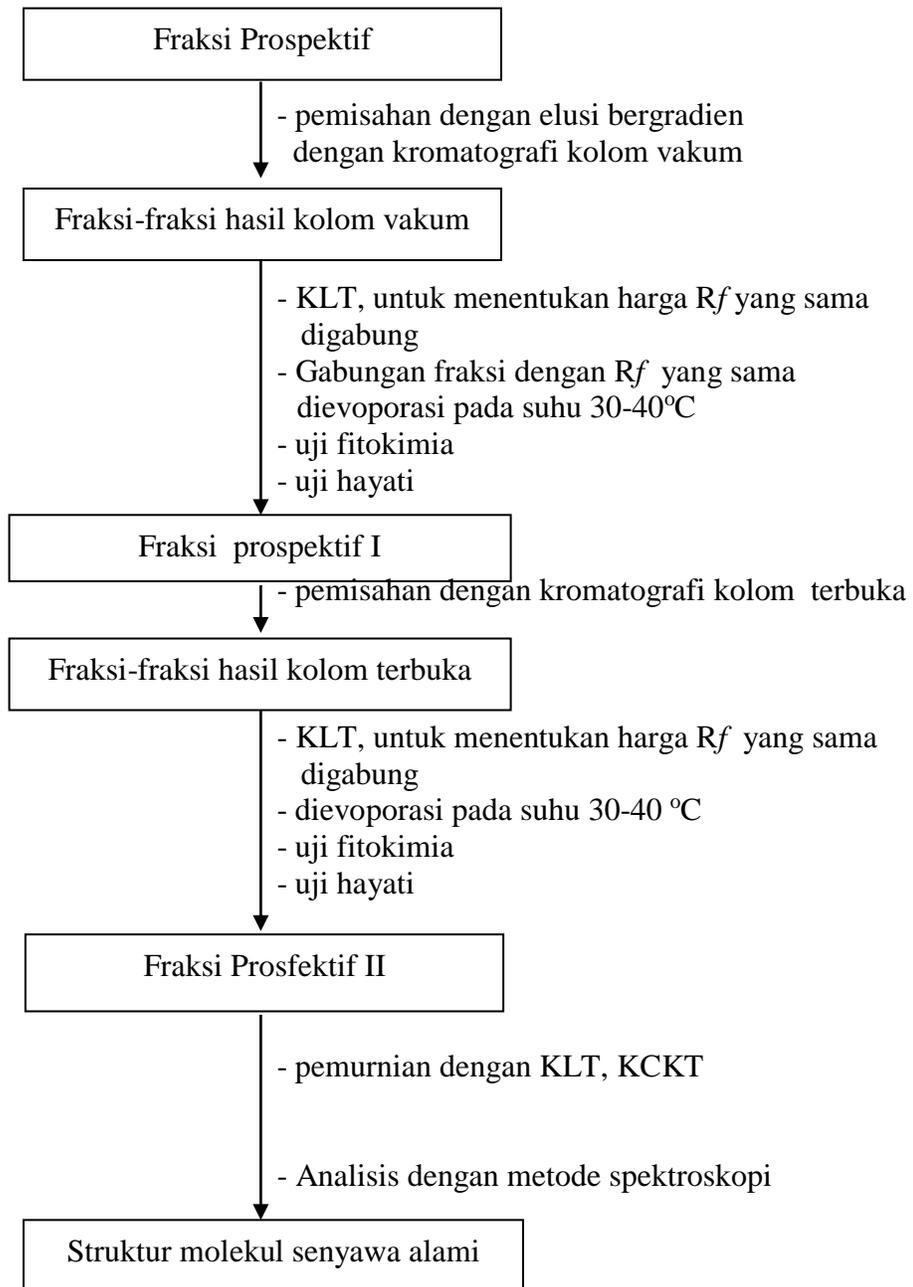
1. Tahap I: Indikator capaian berupa diperolehnya ekstrak dan fraksi-fraksi yang dapat dideteksi secara KLT dan uji fitokimia.
2. Tahap II: Indikator capaian berupa diperolehnya data nilai  $IC_{50}$ , semakin rendah nilai  $IC_{50}$  menunjukkan aktivitasnya semakin tinggi.
3. Tahap IV: Indikator capaian berupa diperolehnya data  $ED_{50}$  dan penurunan efek nyeri pada mencit yang terinduksi asam asetat untuk setiap ekstrak dan fraksi.
4. Tahap V: Indikator capaian berupa diperolehnya isolat yang dapat dideteksi secara KLT
5. Tahap VI : Indikator capaian berupa diperolehnya struktur senyawa yang tepat dan jelas berdasarkan data spektrum dari instrumen spektrometri (UV, IR)

### 3.2.1 Bagan Penelitian





**Gambar 2. Alur kerja penelitian ekstraksi dan fraksinasi**



**Gambar 3. Alur kerja penelitian pemisahan dan pemurnian**

### 3.2. Tempat, Alat, dan Bahan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Kandang Hewan Percobaan FMIPA UNG, bahan dan alat yang digunakan terlampir pada lampiran 1.

### 3.4 Prosedur Kerja dan Metode Analisis

#### 3.4.1 Uji aktivitas

##### a. Pengujian kapasitas antioksidan

Aktifitas antioksidan dianalisa berdasarkan kemampuannya menangkap radikal bebas (*radical scavenging activity*) DPPH. Kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dinyatakan dengan % penghambatan =  $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100\%$ , dimana  $A_0$  adalah absorbansi kontrol saat  $t = 0$  detik dan  $A_t$  adalah absorbansi antioksidan pada saat  $t$ . Nilai  $IC_{50}$  ditentukan dari grafik hubungan antara aktivitas menangkap radikal bebas versus konsentrasi ekstrak atau fraksi-fraksinya.

##### b. Uji Aktivitas Efek Antiinflamasi pada Hewan Percobaan

Uji aktivitas efek antiinflamasi ekstrak metanol dan fraksi daun binahong, menggunakan metode penginduksi bengkak dengan karagenan pada telapak kaki kanan tikus putih jantan. Persentase radang dihitung menggunakan persamaan:

$$\frac{V_t - V_o}{V_o} \times 100\%$$

$V_o$  = volume kaki tikus sebelum penyuntikan karagenan

$V_t$  = volume kaki tikus setelah penyuntikan karagenan pada jam ke-t

Persentase inhibisi dihitung menggunakan persamaan:

$$\frac{\% \text{ radang kontrol} - \% \text{ radang uji}}{\% \text{ radang kontrol}} \times 100\%$$

#### 3.4.5. Metoda Analisis

Identifikasi/elusidasi struktur yang positif sebagai antioksidan dan antiinflamasi dianalisis dengan berbagai instrumen yaitu UV, IR, dan NMR.

Data pengujian dianalisis dengan prosedur sidik ragam (ANOVA) dengan bantuan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versi 17. Apabila hasil analisis sidik ragam menunjukkan ada perbedaan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (Duncan New Multiple Range Test/DMRT) pada taraf 5%.

## **BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **1. Pengambilan dan Preparasi Bahan Baku**

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah daun tanaman binahong (*A. cordifolia*) yang tumbuh di desa Toimadan Luwuk, Batudaa dan Gorontalo sekitarnya. Daun binahong dipilih yang baik dan dipisahkan dari yang rusak atau berwarna kehitaman lalu dicuci bersih agar kotoran yang melekat pada daun hilang. Daun binahong dipotong-potong kasar agar proses pengeringan menjadi lebih cepat. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara diangin-anginkan tanpa paparan sinar matahari secara langsung. Hal ini bertujuan agar senyawa aktif dalam sampel tidak mengalami kerusakan dan kadar air dalam sampel berkurang. Selain sampel lebih awet, pengurangan kadar air akan memudahkan pelarut menarik komponen bioaktif dalam sampel saat maserasi (Sudirman dkk, 2011). Berat sampel segar yang diambil adalah 6,4 kg. Pengeringan daun binahong setelah pengambilan sampel selama  $\pm 60$  hari.

Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan blender untuk mendapatkan serbuk halus. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik, dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan lebih lama (pengawetan) dan tidak mudah rusak sehingga komposisi kimianya tidak mengalami perubahan. Penghalusan dapat mempermudah proses ekstraksi. Semakin kecil bentuknya semakin besar luas permukaannya maka interaksi zat cair ekstraksi akan semakin besar, sehingga proses ekstraksi akan semakin efektif. Serbuk dengan penghalusan yang tinggi kemungkinan sel-sel yang

rusak juga semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh bahan pelarut (Octavia, 2009 dalam Sriwahyuni, 2010). Berat serbuk halus yang diperoleh adalah 400 gr. Sampel diekstraksi dengan metanol dan difraksinasi dengan pelarut yang berbeda kepolarannya.

## **2. Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah pemisahan secara maserasi. Tujuan maserasi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam sampel, dimana pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif. Senyawa aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan di luar sel. Sampel daun binahong yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 250 gr dan dimaserasi dengan metanol 1 x 24 jam. Maserat dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum. Evaporasi dengan menggunakan bantuan pompa vakum akan menurunkan tekanan uap pelarut sehingga pelarut akan menguap di bawah titik didih normalnya. Tujuannya adalah agar komponen fitokimia yang terdapat dalam ekstrak tidak mengalami kerusakan akibat pemanasan yang berlebihan. Adanya tekanan yang diberikan oleh pompa vakum mengakibatkan pelarut menguap dari campuran kemudian terkondensasi dan masuk dalam labu penampung. Ekstrak kental metanol yang diperoleh seluruhnya adalah 24,04 gr .

### 3. Fraksinasi

Tahap selanjutnya, ekstrak kental metanol sebanyak 10 gr disuspensi dengan campuran metanol:air 150 ml dengan perbandingan (1:2). Fraksinasi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar. Pada saat dipartisi dengan pelarut n-heksan terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas pelarut n-heksan dan lapisan bawah adalah air. Hal ini karena massa jenis n-heksan (0,4 g/ml) lebih kecil dibandingkan dengan massa jenis air (1 g/ml). Hal yang sama dilakukan pada pelarut selanjutnya yaitu etil asetat. Setelah dipartisi dengan pelarut n-heksan, bagian air selanjutnya dipartisi dengan etil asetat. Bagian atas merupakan pelarut etil asetat sedangkan bagian bawahnya merupakan pelarut air. Pelarut etil asetat memiliki massa jenis (0,66 g/ml) lebih kecil dibandingkan dengan massa jenis air (1 gr/ml). Hasil dari partisi masing-masing pelarut kemudian dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum sehingga menghasilkan ekstrak kental n-heksan dan etil asetat (Tabel 1).

Tabel 1. Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi

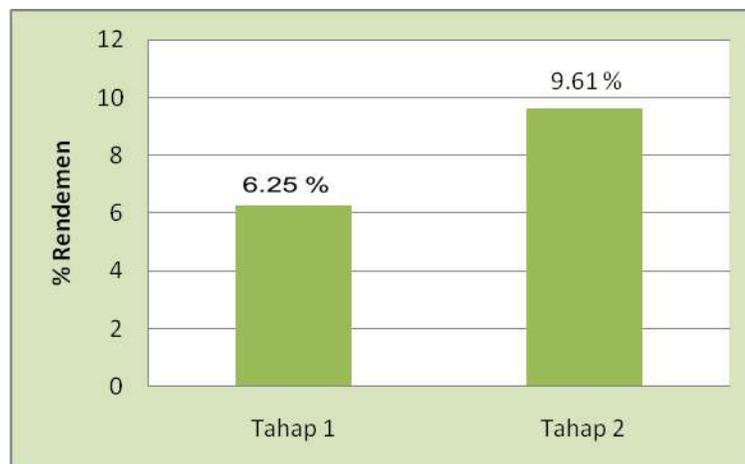
No	Fraksi	Berat (gram)
1	n-Heksan	0,92
2	Etil asetat	3,16

Berdasarkan tabel hasil fraksinasi tersebut dapat dilihat bahwa fraksi etil asetat beratnya lebih besar dari ada fraksi n-heksan. Ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa polar dan semipolar dalam tanaman binahong lebih besar dibandingkan senyawa yang bersifat nonpolar. Etil asetat bersifat semipolar sehingga

dapat melarutkan senyawa aktif semipolar dan polar, berdasarkan prinsip *like dissolve like*.

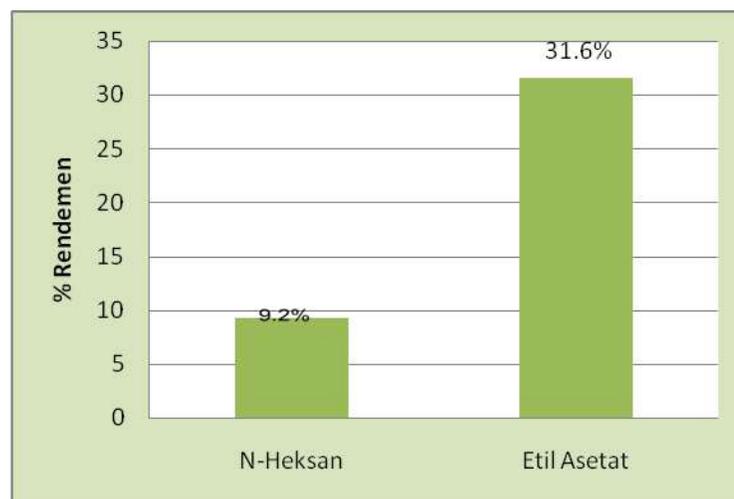
#### 4. Rendemen

Rendemen merupakan persentase bagian bahan baku yang dapat digunakan atau dimanfaatkan dengan total bahan baku. Kusumawati dkk, (2008) dalam Sudirman dkk, (2011) mengatakan bahwa semakin tinggi nilai rendemen menandakan bahwa bahan baku tersebut memiliki peluang untuk dimanfaatkan lebih besar. Rendemen merupakan persentase sampel sebelum dan setelah perlakuan. Rendemen setelah pengeringan 6,4 kg daun binahong adalah sebesar 6,25%. Artinya, setelah melalui proses pengeringan, daun binahong kehilangan berat sebesar 93,75%. Pada tahap kedua (proses ekstraksi), dari 250 gr daun binahong menghasilkan rendemen ekstrak kental metanol sebesar 9,61%. Rendemen yang dihasilkan sangat kecil sehingga untuk menghasilkan ekstrak metanol memerlukan sampel banyak. Persentase rendemen tahap pertama dan kedua terlihat pada Gambar 1.



**Gambar 1. Rendemen Tahap 1 dan 2**

Setelah difraksinasi dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, dihitung persen rendemen dari masing-masing fraksi. Perhitungan persen rendemen terlihat pada Lampiran 2. Hasil fraksinasi yang diperoleh, fraksi etil asetat memiliki rendemen yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksan. Rendemen fraksi etil asetat yaitu 31,6 % dan fraksi n-heksan 9,2% (Gambar 2).



**Gambar 2. Rendemen Hasil Fraksinasi**

Fraksi etil asetat menghasilkan rendemen yang lebih besar, karena sifatnya yang semipolar menyebabkan senyawa yang sifatnya polar lebih terkonsentrasi pada fraksi tersebut. Nur dan Astawan (2011) mengemukakan bahwa tingginya rendemen ekstrak pada pelarut polar dikarenakan makromolekul gula sederhana seperti monosakarida dan oligosakarida ikut terlarut dalam pelarut polar namun tidak larut dalam pelarut nonpolar.

## 5. Uji Fitokimia

Fitokimia bertujuan untuk menguji golongan kimia yang ada dalam sampel (Rahmawati dkk, 2012). Ekstrak kental metanol dan hasil fraksinasi n-heksan dan etil asetat diuji fitokimia yang meliputi uji flavonoid, alkaloid, saponin, steroid dan terpenoid. Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan, senyawa flavonoid terdeteksi pada semua ekstrak yaitu ekstrak metanol, n-heksan dan etil asetat. Senyawa alkaloid tidak terdeteksi pada semua ekstrak, baik pada ekstrak metanol, n-heksan maupun etil asetat. Senyawa steroid positif pada semua ekstrak sedangkan terpenoid hanya terdeteksi pada ekstrak metanol. Senyawa saponin positif pada fraksi etil asetat. Skrining fitokimia terhadap daun binahong telah dilaporkan oleh Astuti (2012), bahwa pada daun binahong memiliki senyawa fitokimia saponin, terpenoid, steroid, fenol, flavonoid dan alkaloid. Ekstrak etanol positif mengandung flavonoid (Rahmawati dkk, 2012). Ekstrak etanol dan n-heksan positif mengandung alkaloid (Titis dkk, 2013). (Murdianto, 2012), ekstrak n-heksan positif mengandung senyawa golongan triterpenoid. Ekstrak etil asetat daun binahong mengandung senyawa polifenol dan saponin (Sulistiyani dkk, 2012).

Senyawa flavonoid positif ditandai dengan perubahan warna, alkaloid positif jika terbentuk endapan ketika ditambahkan pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Hager, Wagner, Mayer dan Dragendrof. Positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa/buih yang bertahan selama 15 menit, terpenoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah, ungu, hingga kecokelatan, dan steroid ditandai dengan perubahan warna dari hijau hingga kebiruan.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Binahong (*A. cordifolia*)

No	Pereaksi	Fraksi			Standar (warna)
		M	N	E	
1	HCl + Serbuk Mg	+++	++	+++	Perubahan warna
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	++	+++	Perubahan warna
3	NaOH	++	+	++	Perubahan warna
4	Dragendroff	-	-	-	Endapan merah-jingga
5	Hager	-	-	-	Endapan putih
6	Mayer	-	-	-	Endapan putih kekuningan
7	Wagner	-	-	-	Endapan coklat
8	Saponin	-	-	+	Terbentuk busa/buih
9	Steroid	+	++	++	Warna hijau
10	Terpenoid	++	-	-	Warna merah - coklat

Keterangan : (M) metanol, (N) n-heksan, (E) etil asetat

(+++) intensitas kuat, (++) sedang, (+) lemah, (-) tidak terdeteksi

## 6. Uji Toksisitas Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan uji pendahuluan yang mengarah pada uji sitotoksik senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji yang bertujuan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang memiliki sifat toksik. Korelasinya adalah jika mortalitas terhadap *A. salina* Leach yang ditimbulkan memiliki harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ .

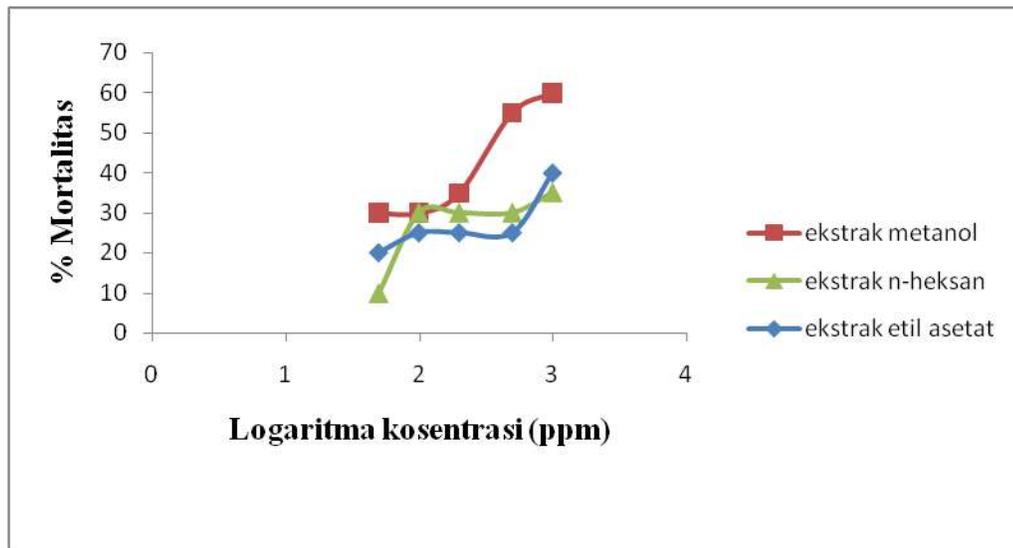
Beberapa kelebihan dari *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ini adalah mudah dan relatif tidak mahal serta tidak membutuhkan suatu spesialisasi tertentu dalam

pelaksanaannya. Metode ini juga merupakan metode yang telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas suatu senyawa di dalam ekstrak tanaman (Lisdawati dkk, 2006).

Toksistas suatu ekstrak dinilai berdasarkan tingkat mortalitas larva udang yang digunakan sebagai bahan uji. Data dianalisis untuk memperoleh nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration 50%*) adalah tingkat konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji. Sehingga, apabila jumlah mortalitas lebih dari 50% dapat dipastikan nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  atau 1000 ppm. ketentuan ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut aktif (Hidayati, 2000). Tingkat toksistas suatu ekstrak mengikuti pedoman nilai berikut:

- $LC_{50} \leq 30 \text{ ppm}$  : sangat toksik
- $31 < LC_{50} \leq 1000 \text{ ppm}$  : toksik
- $LC_{50} > 1000 \text{ ppm}$  : tidak toksik

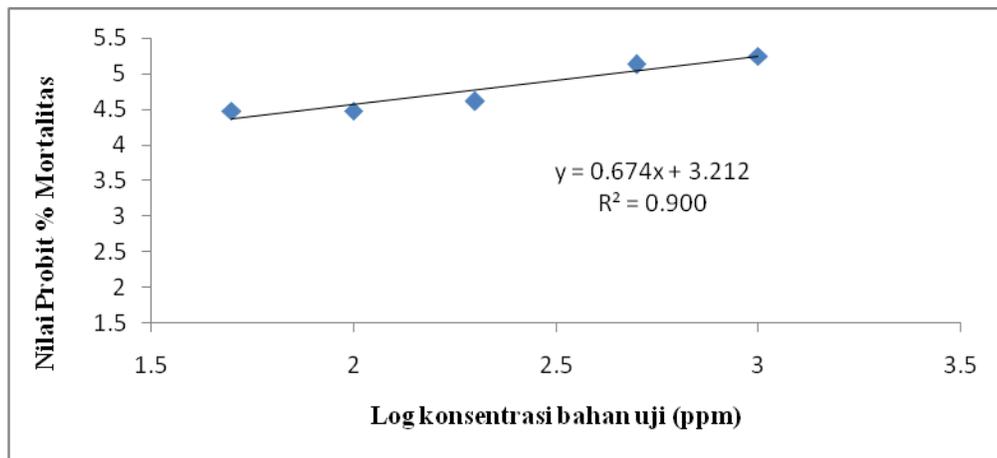
Konsentrasi ekstrak memberikan pengaruh yang berbeda-beda pada kematian larva udang. Pada umumnya, semakin besar konsentrasi suatu larutan uji mengakibatkan naiknya angka kematian larva udang. Hal ini terlihat pada Gambar 6 di bawah ini.



**Gambar 6.** Pengaruh Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Binahong Terhadap Kematian Larva *Artemia salina* Leach

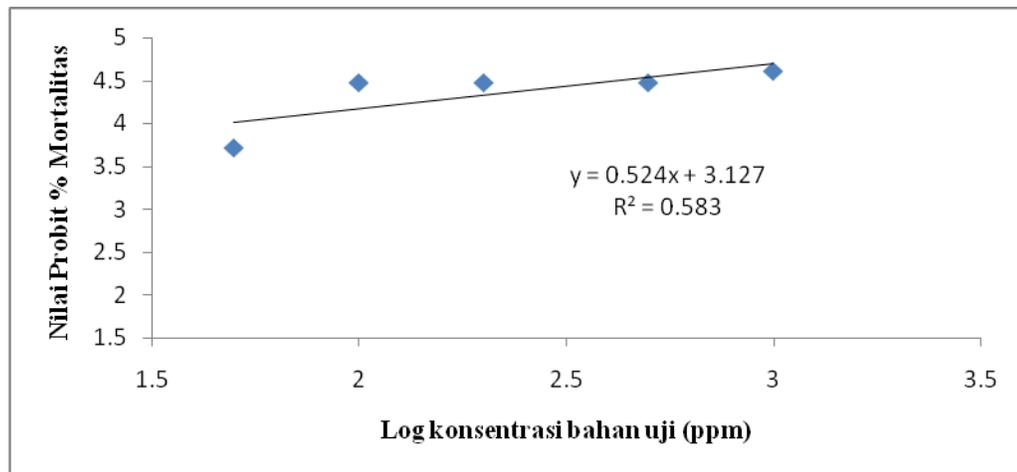
Dari gambar 6 tersebut dapat dilihat bahwa konsentrasi ekstrak memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva udang, dimana kenaikan konsentrasi ekstrak diikuti dengan kenaikan persentase rata-rata kematian larva udang (hewan uji).

Hasil uji toksisitas masing-masing ekstrak daun binahong berdasarkan analisis probit untuk menentukan nilai  $LC_{50}$  dimana hubungan nilai logaritma konsentrasi bahan toksik uji dan nilai probit dari persentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linear  $y = a + bx$ , terlihat pada gambar 7, 8 dan 9 di bawah ini:



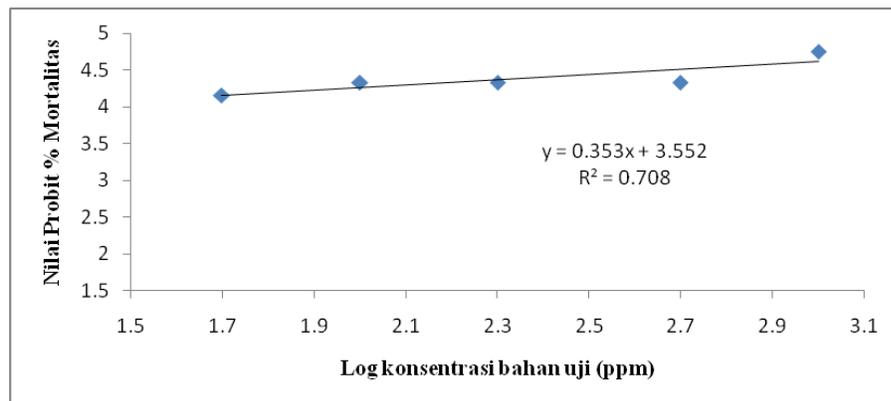
**Gambar 7.** Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 7 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak metanol (x) sebagai berikut:  $y = 3,212 + 0,6744x$ . Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,948, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak metanol berkorelasi positif dan korelasinya erat ( $R^2 = 0,9005$ ) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak metanol sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 90,05 %. Tingkat konsentrasi ekstrak metanol daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji ( $LC_{50}$ ) adalah 447,96 ppm.



**Gambar 8.** Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak n-Heksan Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 8 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan (x) sebagai berikut:  $y = 3,1271 + 0,5244x$ . Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,763, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan berkorelasi positif dan korelasinya erat ( $R^2 = 0,5831$ ) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak n-heksan sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 58,31 %. Tingkat konsentrasi ekstrak n-heksan daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji ( $LC_{50}$ ) adalah 3728,29 ppm.



**Gambar 9.** Pengaruh Log Konsentrasi Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong Terhadap Probit Mortalitas

Berdasarkan gambar 9 diperoleh persamaan linier yang merupakan korelasi antara probit persentase mortalitas (y) dengan logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat (x) sebagai berikut:  $y = 3,5528 + 0,3535x$ . Nilai koefisien korelasinya (R) adalah sebesar 0,41, menunjukkan bahwa antara probit persentase mortalitas dengan logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat berkorelasi positif dan korelasinya erat ( $R^2 = 0,7082$ ) dimana kontribusi logaritma konsentrasi ekstrak etil asetat sebagai larutan uji terhadap probit persentase mortalitas adalah sebesar 76,48 %. Tingkat konsentrasi ekstrak etil asetat daun binahong yang dibutuhkan untuk mematikan 50% dari hewan yang diuji ( $LC_{50}$ ) adalah 12414,15 ppm.

Suatu zat dikatakan aktif atau toksik jika nilai  $LC_{50} \leq 1000$  ppm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun binahong bersifat toksik dengan nilai  $LC_{50} \leq 1000$  ppm (447,96 ppm). Sedangkan ekstrak n-heksan dan etil asetat bersifat tidak toksik dengan nilai  $LC_{50} > 1000$  ppm, yaitu 3728,29 ppm dan 12414,15 ppm.

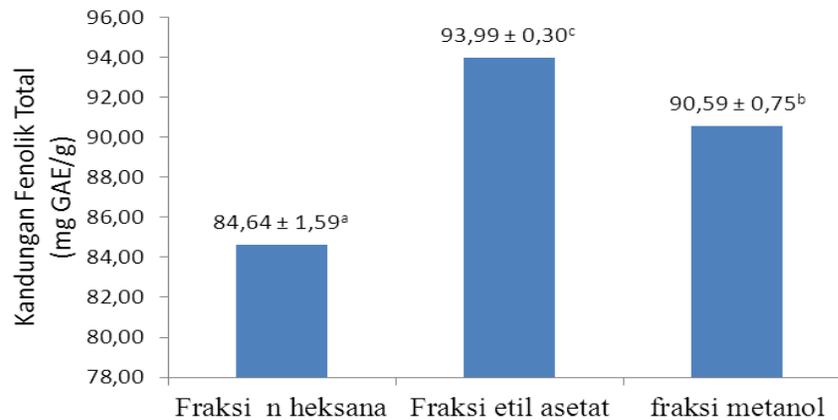
Penelitian Carballo *et al* (2002) menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara sitotoksitas dan letalitas larva *Artemia salina* Leach pada ekstrak tanaman. Apabila harga  $LC_{50}$  suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut metode BSLT, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker (Widianti, 2009).

## **7. Penentuan Kandungan Fenolik Total**

Penentuan kandungan fenolik total pada penelitian ini dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik dapat bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu. Penggunaan asam galat sebagai pembanding dalam analisis kandungan Fenolik total tumbuhan binahong bertujuan agar hasil pengukuran total senyawa fenolik dapat dinyatakan dalam satuan mg asam galat ekuivalen. Kurva standar asam galat beserta persamaan liniernya terlihat pada lampiran 1.

Dari kurva standar tersebut dapat ditentukan kandungan Fenolik total dengan menggunakan persamaan  $\hat{Y} = ax + b$ . diperoleh persamaan regresi linier yang digunakan untuk menentukan kandungan fenolik total pada masing-masing ekstrak

yaitu ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol. Data hasil analisis total fenol terlihat pada Gambar 1.



Ket. : Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan  $\alpha=5\%$ ). \*(rata-rata  $\pm$  SD).

**Gambar 10.** Kandungan fenolik total masing-masing ekstrak

Dari data hasil perhitungan, ekstrak etil asetat memiliki total fenolik yang paling tinggi yaitu  $93,98 \pm 0,30$  mg GAE/g . Hal ini mengindikasikan bahwa setiap gram ekstrak etil asetat setara dengan  $93,98$  mg asam galat. Ekstrak metanol memiliki total fenolik sebesar  $90,59 \pm 0,75$  mg GAE/g. Sedangkan n-heksan memiliki total fenolik yang paling kecil yaitu  $84,64 \pm 1,59$  mg GAE /g.

Pengujian statistik dengan menggunakan anova satu jalur dilakukan untuk melihat perbedaan kandungan fenolik total dari setiap ekstrak. Dari hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan bahwa nilai probabilitas (Sig.  $\leq 0,05$ ), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata pada  $\alpha = 0,05$ , taraf kepercayaan 95%. Hasil uji lanjut Duncan terhadap total fenol masing-masing ekstrak terlihat lampiran 4. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak etil asetat memberikan perbedaan yang nyata terhadap ekstrak methanol dan ekstrak n-heksan. Perbedaan yang nyata yang dimaksud adalah kadar kandungan fenolik total yang terdapat pada masing-masing

ekstrak. Sehingga dapat di urutan kandungan fenolik total dalam ekstrak secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat = ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Senyawa fenolik yang mempunyai gugus fungsi hidroksil yang banyak atau dalam kondisi bebas akan menghasilkan kandungan fenolik total yang tinggi pada ekstrak (Ukieyanna dkk., 2012).

Kandungan fenolik total yang terdapat di dalam ekstrak dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan saat ekstraksi (Jang dkk., 2007). Ekstrak metanol memiliki kandungan fenolik total lebih kecil dibanding dengan ekstrak etil asetat walaupun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Kemungkinannya adalah senyawa fenolik yang terdapat di dalam ekstrak metanol masih memiliki ikatan dengan senyawa lain seperti protein, polisakarida, terpen, klorofil, lemak dan komponen organik lainnya. Dan hal ini membutuhkan penanganan khusus untuk memisahkan ikatan tersebut misalnya dengan menggunakan pelarut yang cocok untuk mengekstrak komponen-komponen tersebut (Koffi dkk., 2010).

Fraksi n-heksan memiliki kandungan fenolik total yang paling rendah di antara semua fraksi. Hal ini dikarenakan senyawa *nonpolar* seperti lemak, lilin, dan minyak terlarut dalam pelarut n-heksan (Nurdyana dkk., 2012). Senyawa-senyawa tersebut bukan merupakan golongan fenolik.

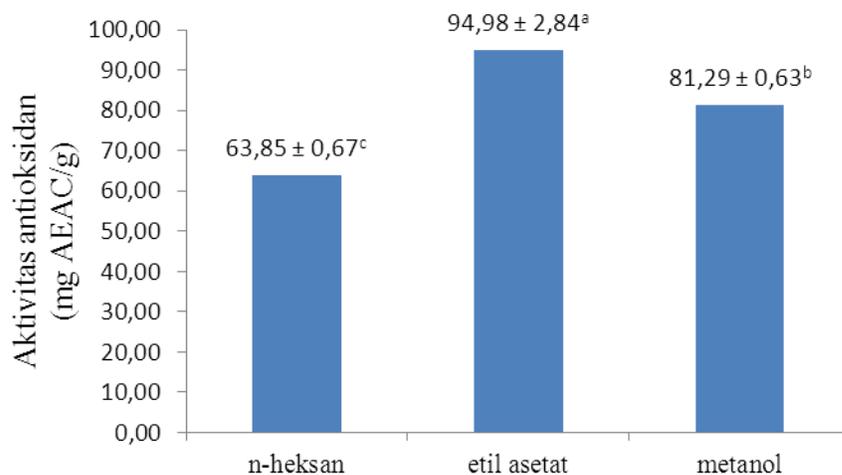
## **8. Uji Aktivitas Antioksidan dengan menggunakan metode DPPH**

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih atom hidrogen pada radikal bebas sehingga aktivitas radikal bebas tersebut dapat diredam. Antioksidan memiliki peranan yang cukup penting bagi kesehatan khususnya dalam mempertahankan tubuh dari kerusakan sel akibat adanya spesies radikal bebas. Berdasarkan sumbernya, terdapat antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh dari kerusakan yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif. Antioksidan alami umumnya memiliki gugus fenolik dalam struktur molekulnya (Sunarni 2005). Antioksidan sintetik seperti butil hidroksi toluena (BHT), butil hidroksi anisol (BHA) dan t-butil hidroksi kuinon (TBHQ) dapat memberikan dampak negatif bagi kesehatan. Selain itu, antioksidan sintetik

mempunyai kelarutan yang rendah dibandingkan dengan antioksidan alami (Barlow 1990).

Dalam penelitian ini, uji aktivitas antioksidan menggunakan asam askorbat (vitamin C) untuk membuat kurva standar. Sehingga satuan pengukuran dinyatakan sebagai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*) (Kurva standar asam askorbat dapat dilihat pada Lampiran 4).

Kurva standar asam askorbat dibuat untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan (mg AEAC/g sampel). Perhitungan aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Lampiran 4. Berikut ini adalah aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak rambut jagung yang dinyatakan dalam AEAC.



Ket. : nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata (Uji Duncan  $\alpha=5\%$ ). \*(Rata-rata  $\pm$  SD).

**Gambar 11.** Nilai AEAC pada masing-masing ekstrak

Aktivitas antioksidan yang paling tinggi terdapat dalam fraksi etil asetat yaitu sebesar 94,98 (mg AEAC/g). Artinya adalah 1 gram ekstrak kering etil asetat setara dengan 47,75 mg vitamin C. Ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan 81,29 (mg AEAC/g), sedangkan aktivitas antioksidan yang paling rendah yaitu pada ekstrak n-heksan sebesar 63,85 (mg AEAC/g).

Hasil uji statistik menggunakan anova satu jalur (Lampiran ), mendapatkan bahwa ada perbedaan yang signifikan (berarti) antara besar aktivitas antioksidan

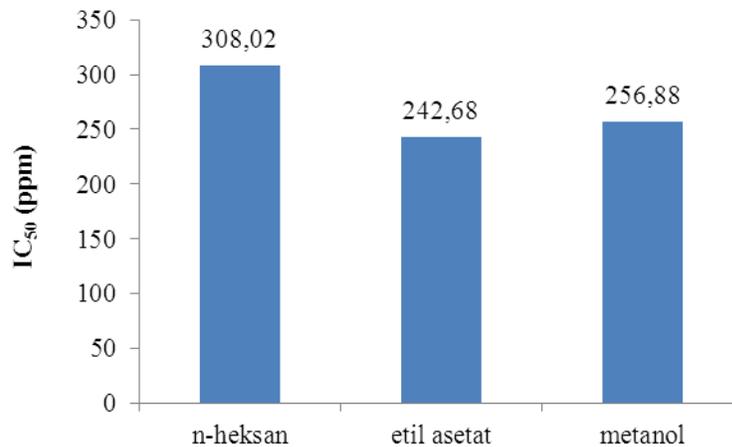
masing-masing fraksi, nilai probabilitas ( $\text{Sig.} \leq 0,05$ ). Untuk melihat perbedaan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Berdasarkan hasil analisis terdapat perbedaan yang nyata antara fraksi n-heksan, etil asetat, dan methanol. Perbedaan yang dimaksud adalah aktivitas antioksidan. Urutan aktivitas antioksidan secara berturut-turut adalah fraksi etil asetat > ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Selain itu, perbedaan jumlah kapasitas antioksidan pada tumbuhan binahong disebabkan komponen antioksidan yang terekstrak pada pelarut n-heksan memiliki jumlah gugus  $-\text{OH}$  yang sedikit untuk mendonorkan atom hidrogen dibandingkan dengan komponen antioksidan yang terekstrak dengan menggunakan pelarut etilasetat dan methanol yang memiliki jumlah gugus  $-\text{OH}$  yang lebih banyak. Senyawa antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya untuk meredam dan menstabilkan radikal bebas.

Salah satu sumber antioksidan alami dari tanaman adalah golongan fenol. Senyawa fenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Oleh karena itu, proses ekstraksi menggunakan berbagai pelarut akan menghasilkan komponen polifenol yang berbeda pula. Setiap tumbuh-tumbuhan memiliki struktur komponen fenolik yang berbeda. Ada komponen fenolik yang memiliki gugus  $-\text{OH}$  banyak dan ada pula komponen fenolik yang memiliki gugus  $-\text{OH}$  yang sedikit. Perbedaan jumlah dan posisi gugus hidroksil pada suatu senyawa antioksidan seperti fenol dan flavonoid, dapat mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Gugus  $-\text{OH}$  berperan dalam proses transfer elektron untuk menstabilkan dan meredam radikal bebas. Semakin banyak gugus  $-\text{OH}$  pada suatu senyawa fenol, maka kemampuan untuk meredam radikal bebas semakin tinggi.

Aktivitas peredaman radikal bebas biasanya dinyatakan sebagai persen inhibisi dari DPPH, tetapi dapat juga dinyatakan sebagai konsentrasi yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ). Nilai  $\text{IC}_{50}$  dianggap sebagai ukuran yang baik dari efisiensi antioksidan senyawa-senyawa murni ataupun ekstrak. Nilai  $\text{IC}_{50}$  dapat didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas, yaitu menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai  $\text{IC}_{50}$  yang semakin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan pada bahan yang diuji semakin

besar (Molyneux, 2003). Nilai  $IC_{50}$  pada masing-masing ekstrak disajikan dalam Gambar 4.



**Gambar 12.** Nilai  $IC_{50}$  pada masing-masing ekstrak

Dari data hasil perhitungan persen inhibisi pada masing-masing ekstrak (Lampiran 5), diketahui bahwa fraksi etil asetat memberikan penghambatan paling besar yang ditandai dengan  $IC_{50}$  yang paling kecil di antara semua fraksi. Fraksi etil asetat memberikan penghambatan sebesar 242,68 ppm, ekstrak metanol memberikan penghambatan sebesar 256,88 ppm dan fraksi n-heksan memberikan penghambatan sebesar 308,2 ppm.

### **Pengujian antiinflamasi**

Pengujian efek antiinflamasi dilakukan dengan menggunakan alat pletismometer (Ugo Basile cat No. 7140) dengan prinsip pengukuran berdasarkan hukum Archimedes. Induksi radang dilakukan secara kimia menggunakan karagenan 1% (b/v), yang disuntikkan secara intraplantar pada telapak kaki tikus sebanyak 0.1 ml.

Pembentukan radang oleh karagenan menghasilkan peradangan akut dan tidak menyebabkan kerusakan jaringan, meskipun radang dapat bertahan selama 360 menit dan berangsur-angsur berkurang selama satu hari. Karagenan sebagai penyebab radang dapat dipengaruhi oleh obat antiradang. Responnya terhadap obat antiinflamasi lebih peka dibandingkan dengan iritan lainnya.

Setelah dilakukan orientasi dengan variasi dosis ekstrak etanol daun binahong 10 mg/kg bb, 50 mg/kg bb, 100 mg/kg bb, 200 mg/kg bb, dan 400 mg/kg bb, diperoleh bahwa dosis yang terkecil memberikan efek antiinflamasi adalah dosis 50 mg/kg bb. Oleh karena itu, dipilih variasi dosis yang diuji adalah 50, 100, 200 mg/kg bb.

Data dianalisis dengan metode anava (analisis variansi) menggunakan program SPSS 16. Analisis dilakukan terhadap hasil perubahan volume kaki tikus dimulai dari 30 menit hingga 360 menit setelah penyuntikan karagenan. Dari perubahan volume kaki tikus, dapat dihitung persen radang pada kaki tikus. Selanjutnya dibuatkan grafik perubahan persen radang rata-rata kaki tikus dan grafik perubahan persen inhibisi radang rata-rata kaki tikus.

Kelompok persen radang pada kaki tikus yang lebih kecil dari kelompok control menunjukkan bahwa bahan uji mampu menekan radang yang disebabkan oleh karagenan. Hasil pengukuran persen radang yang terjadi terlihat pada gambar berikut:

Waktu (menit)	Perlakuan				
	K ± SD	I ± SD	EDB 50 ± SD	EDB 100 ± SD	EDB 200 ± SD
30	15,4±2,02	5,95±2,05	13,67±0,81	10,22±0,55	6,27±3,13
60	22,94±5,35	9,1±2,58	18,73±2,28	15,30±2,12	10,7±2,49
90	30,93±5,62	11,89±4,20	24,83±4,09	19,04±2,92	14,2±2,41
120	39,35±3,39	14,23±4,20	30,05±3,10	23,33±3,91	16,88±2,92
150	45,73±6,21	16,35±3,76	34,96±4,04	24,17±3,84	18,19±2,47
180	54,74±12,70	17,37±3,87	38,08±4,29	24,53±3,04	20,75±3,22
210	59,24±13,22	19,34±6,06	40,43±4,67	24,63±4,78	20,50±4,34
240	60,45±12,85	17,15±5,63	40,45±4,18	24,27±3,92	20,57±6,12
270	60,50±12,93	14,18±3,74	37,76±4,05	22,88±5,11	19,04±6,74
300	60,88±13,08	12,91±3,30	36,64±4,79	21,33±5,65	16,57±6,87
330	59,35±12,45	10,53±3,05	34,78±4,63	19,35±5,03	14,01±6,29
360	55,78±11,19	9,66±1,79	32,73±4,75	16,64±3,61	12,14±4,59

Pada gambar tersebut terlihat bahwa suspensi indometasin 10 mg/kg bb memiliki persen radang yang lebih kecil dari EDB dosis 200, 100, dan 50 mg/kg bb.

Efek antiinflamasi dapat dilihat dari besarnya persen hambatan radang tiap waktu pengukuran yang terlihat pada tabel berikut.

Waktu (menit)	Perlakuan			
	I 10 mg/kg bb	EDB 50 mg/kg bb	EDB 50 mg/kg bb	EDB 50 mg/kg bb
30	61,50	11,45	33,83	55,93
60	60,37	18,79	33,31	53,40
90	61,75	20,14	38,44	54,34
120	61,94	20,44	40,70	55,29
150	64,25	23,55	47,15	59,02
180	68,29	30,45	55,19	62,09
210	67,36	31,76	58,47	65,41
240	71,64	33,08	59,85	65,96
270	76,57	37,59	62,19	68,52
300	78,79	39,81	64,97	72,78
330	82,60	41,40	67,39	76,79
360	82,68	41,31	70,16	78,25

Pada tabel dapat dilihat bahwa EDB 50 mg/kg bb memiliki persen hambatan radang yang lebih kecil daripada EDB 100, 200 mg/kg bb dan dengan suspensi indometasin dosis 10 mg/kg bb, EDB 200 mg/kg memiliki persen hambatan radang yang lebih kecil dari suspensi indometasin dosis 10 mg/kg bb.

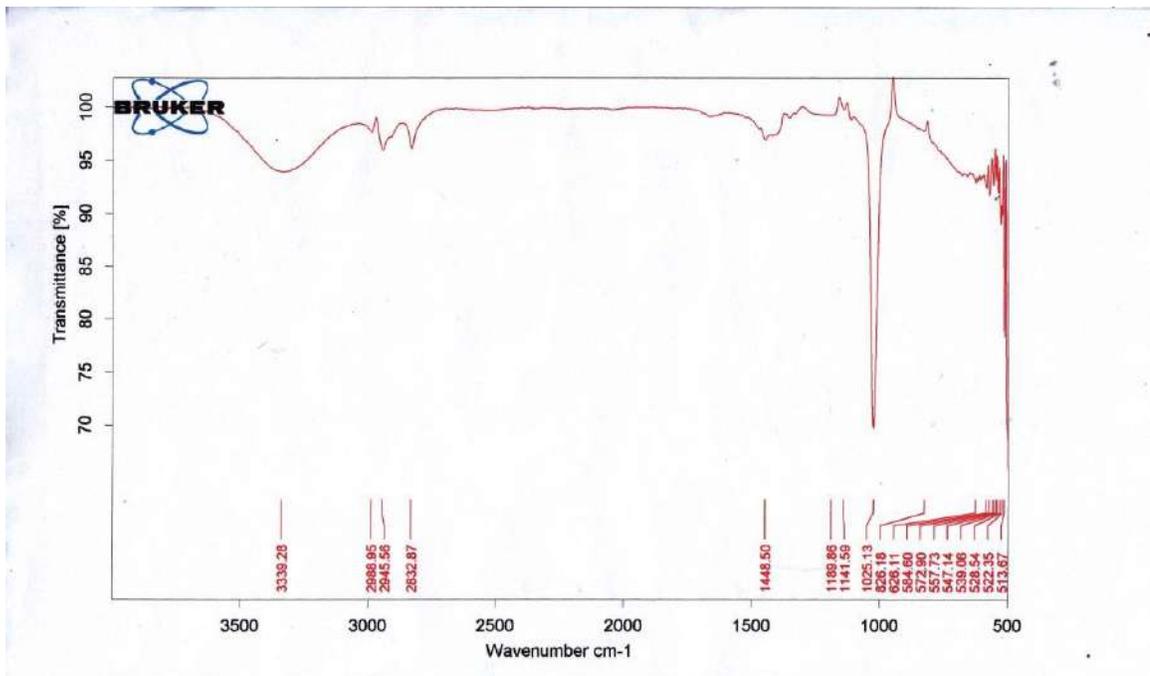
Analisis variansi terhadap perubahan volume radang digunakan untuk melihat ada tidaknya perbedaan pengaruh obat uji yakni suspensi ekstrak daun binahong terhadap suspensi CMC 0,5% sebagai pembanding negatif dan suspensi indometasin sebagai pembanding positif.

Berdasarkan hasil analisis variansi menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $\alpha < 0,05\%$ ) antar kelompok perlakuan pada menit ke-30 sampai menit ke-360 dengan

harga  $F_{hitung} > F_{table}$ . Hal ini berarti semua jenis perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap radang telapak kaki tikus disebabkan oleh karagenan.

## 9. Identifikasi Gugus Fungsi

Gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak daun binahong diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer inframerah, yang merupakan alat untuk mengukur resapan radiasi inframerah pada pelbagai panjang gelombang. Skala pada spektra adalah bilangan gelombang, yang berkurang dari  $4000\text{ cm}^{-1}$  ke sekitar  $670\text{ cm}^{-1}$  atau lebih rendah. Panjang gelombang suatu pita absorpsi digunakan untuk mengidentifikasi tiap pita. Pita-pita inframerah dalam sebuah spektrum dapat dikelompokkan menurut intensitasnya (kuat, medium dan lemah) (Fessenden dan Fessenden, 1982). Spektrum inframerah ekstrak metanol daun binahong ditunjukkan pada gambar di bawah ini:



**Gambar 4.7. Spektrum Inframerah dari Ekstrak Daun Binahong**

Spektrum inframerah pada gambar 4.7 memperlihatkan bahwa senyawa yang terkandung dalam daun binahong menunjukkan serapan melebar pada daerah bilangan gelombang  $3339,28\text{ cm}^{-1}$  yang diduga adalah serapan uluran O-H. Jika spektrum inframerah suatu senyawa menunjukkan serapan dalam daerah  $3000-3700\text{ cm}^{-1}$  dapatlah diduga bahwa senyawa tersebut mengandung gugus OH dalam strukturnya (Fessenden dan Fessenden, 1982). Ikatan hidrogen menyebabkan puncak melebar dan terjadi pergeseran ke arah bilangan gelombang yang lebih pendek (Khopkar, 1990). Menurut Justik bahwa “Daerah puncak serapan yang tinggi dan transmitannya berkisar antara 0-35%, intensitasnya kuat. Sedangkan puncak serapan yang sedang dan transmitannya berkisar pada 75-35% intensitas serapannya sedang. Serta daerah serapan dengan puncak yang pendek dan transmitannya berkisar pada 90-75% intensitasnya lemah” (dalam Abd.Gafur, 2013). Serapan pada bilangan gelombang  $1025,13\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya uluran C-OH siklik dengan pita yang kuat dan tajam ( $990-1100\text{ cm}^{-1}$ ) (Creswell dkk, 1981 dalam Napu, 2011). Pita serapan pada daerah bilangan ini dapat memberikan gambaran bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun binahong merupakan senyawa siklik yang mengandung gugus -OH. Hal ini diperkuat oleh adanya serapan tajam dan lemah tekukan O-H aromatik pada panjang gelombang  $1141,59\text{ cm}^{-1}$ . Serapan uluran C-H alifatik yang tajam dan lemah muncul pada daerah bilangan gelombang  $2988,95\text{ cm}^{-1}$  dan  $2832,87\text{ cm}^{-1}$ . Hal ini diperkuat oleh tekuk C-H aromatik pada serapan  $626,18\text{ cm}^{-1}$ . Serapan tajam dan lemah pada cincin aromatik C=C muncul pada daerah bilangan

gelombang  $1448,50\text{cm}^{-1}$ . Data serapan spektrum spektrofotometer inframerah pada daun binahong selengkapnya dapat dilihat dalam tabel 4.3 di bawah ini.

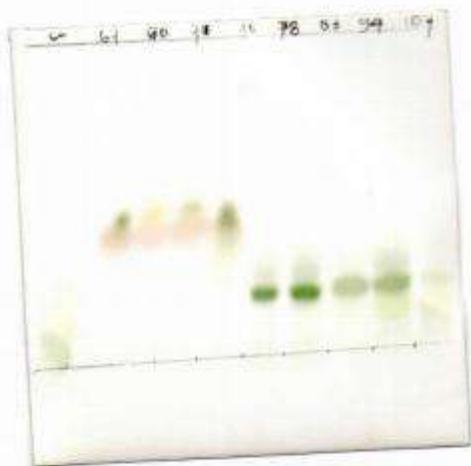
Tabel 4.3 .Data spektrofotometri inframerah (gelombang, bentuk pita, intensitas, dan penempatan gugus terkait) dari ekstrak daun binahong.

<b>Bilangan Gelombang(<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>				<b>Bentuk Pita</b>	<b>Intensitas</b>	<b>Kemungkinan Gugus Fungsi</b>
Ekstrak Metanol	Sukadana (2010)	Creswell, et all (1981)	Arisandy 2010			
339,28	3000-3500	3200-3400	3500-3000	Melebar	Lemah	Uluran O-H
2988.95 2832.87	2800-2950	2700-3000	3000-2700	Tajam Tajam	Lemah Lemah	Uluran C-H alifatik
1448.50	1400-1650	1500-1475	1650-1450	Tajam	Lemah	Uluran C=C aromatik
1141.59	1000-1300	1330-1260	-	Tajam	Lemah	Tekuk OH
1025.13	990-1100	1000-1260	1230-1000	Tajam	Kuat	C-O alkohol
626.18	630-1000	630-1000	900-630	Tajam	Lemah	C-H aromatik

Dari interpretasi data di atas, dapat disimpulkan bahwa senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol daun binahong diduga adalah senyawa aktif flavonoid.

## 10. Pemisahan dan Pemurnian

Terhadap ekstrak metanol 9,027 g dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG) yang berdiameter 3 cm dengan adsorben silika gel 60 sebanyak 46 g dengan tinggi 23 cm, menggunakan pelarut (eluen) *n*-heksan:etil asetat secara bergradien mulai dari *n*-Heksan 100 % sampai etil asetat 100 %, diperoleh 107 fraksi. Dari 107 fraksi dianalisis dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) dengan mengamati pola spot yang terbentuk. Fraksi yang memiliki polat spot yang sama digabung menjadi 6 kelompok fraksi, yang terdiri dari kelompok A (isolat 1-8), B (isolat 9-60), C (isolat 61-70), D (isolat 71-84), E (Isolat 85-94) dan F (isolat 95-107). Hasil analisa kromatografi dapat dilihat pada Gambar 5.1 berikut :

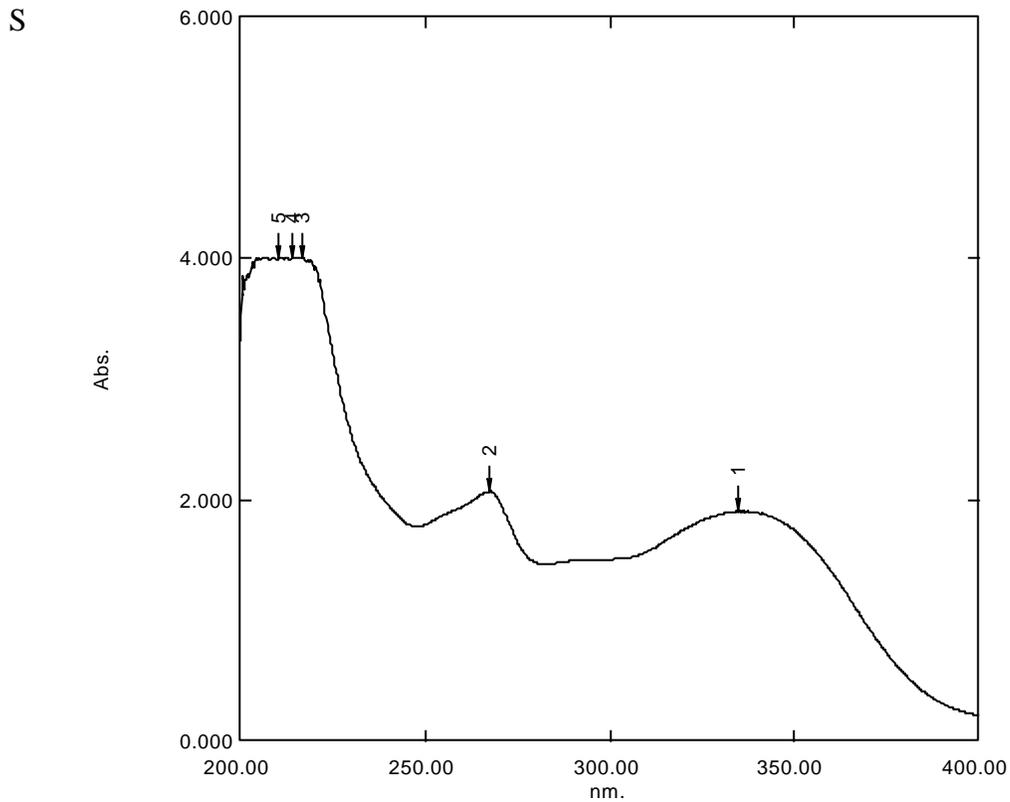


**Gambar 5.1 : Profil Kromatografi Lapis Tipis hasil pemisahan kromatografi kolom, fasa gerak *n*-heksan : etil asetat (7:3)**

Berdasarkan hasil analisis KLT menunjukkan beberapa isolate masih menampakkan lebih dari satu bercak noda. Hal ini berarti bahwa isolat yang diperoleh

belum murni sehingga perlu dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel dan fasa gerak n-heksan : etil asetat dan etil asetat-metanol secara bergradien dari non polar hingga polar dan diperoleh 260 fraksi isolat.

### 11. Analisis spektrofotometri UV-Vis



No.	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
1	335.00	1.906
2	267.60	2.071
3	216.60	4.000
4	214.00	4.000
5	210.20	4.000

Berdasarkan spektrum dari UV-Vis di atas, terbaca beberapa puncak gelombang yaitu puncak 1 dengan panjang gelombang 335.00 nm dan absorbansi 1.906, puncak 2 dengan panjang gelombang 267.60 nm dan absorbansi 2.071. Puncak 3, 4, dan 5 merupakan puncak yang sama karena memiliki absorbansi yang sama dengan panjang gelombang yang hampir sama yaitu absorbansi 4.000 dan panjang gelombang masing-masing 216.60, 214.00 dan 210.20 nm.

Pada spektrum hasil UV-Vis, terdapat dua puncak yang merupakan puncak karakteristik dari senyawa golongan flavonoid yaitu puncak I dengan panjang gelombang 335.00 nm dan puncak II dengan panjang gelombang 267.60 nm.

## **BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan tahapan penelitian hingga laporan kemajuan ini dibuat, maka dapat disimpulkan :

1. Ekstrak daun binahong mengandung senyawa aktif dalam bentuk siklik dengan gugus –OH yang diduga adalah flavonoid
2. Ekstrak daun binahong konsentrasi 200 mg/kg bb memberikan efek yang sama dengan indometasin konsentrasi 10 mg/kg bb

### **6.2 Saran**

Perlu dilanjutkan biassay lainnya untuk memperoleh manfaat terhadap kesehatan seperti antikanker dan antidiabetes.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aberoumand A, Deokule SS. 2008. Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. *Pakistan J of Nutr* 7: 582-585
- Bialangi, N., (2002), *Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Ocimum anctum Linn (Labiatae).*, Laporan Hasil Penelitian dibiayai Dana DIKS tahun Anggaran 2002-2003. FPMIPA, IKIP Negeri Gorontalo
- Bialangi, N., (2004), *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Ocimum sanctum L. Asal Gorontalo.* Laporan Hasil Penelitian Dosen Muda Tahun Anggaran 2003-2004. FMIPA Universitas Negeri Gorontalo
- Bialangi, N., Musa, W.J.A., Subarnas,A., Ischak, N., (2008), *Studi Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologi Flavonoid dari Daun Tumbuhan Jarak Pagar (Jatropha curcas Linn) Asal Gorontalo.* Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Tahun Anggaran 2007-2008. FMIPA Universitas Negeri Gorontalo
- Harborne JB.1996. *Metode Fitokimia.* Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hidayat, (2011), *Prospek Obat Tradisional.* Available at <http://www.Pantonanews.com/418-prospej-obat-tradisional> [diakses tanggal 5 januari].
- Kee JL., Hayes ER. 1996. *Farmakologi.* Jakarta: EGC
- Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L.2003. the role of antioxidant phytonutrients in prevention of diseases. *Acta Biol Szeg* 47: 119-125
- Mufid Khunaifi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak daun binahong terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeroginosa*. Skripsi. UIN Malang
- Muhtadi, A., Subarnas, A., Sumiwi, S.A., (2008), *Penuntun Farmakologi.* Fakultas Farmasi Univ. Padjadjaran. Bandung.
- Mycek. 2001. *Farmakologi Ulasa Bergambar Edisi ke 2.* Jakarta : Widya medika.
- Rachmawati, S. 2007. *Studi Makroskopi, Dan Skrining Fitokimia Daun Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis.* Skripsi Tidak Diterbitkan Surabaya: Fakultas Farmasi UNAIR Surabaya.
- Syamsuhidayat, S.S dan Hutapea, J.R, 1991, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia,* edisi kedua, Departemen Kesehatan RI, Jakarta
- Wahyudin E., (2003). *Analgetika, Kursus Singkat “ Teknik Uji In Vivo Senyawa Bioaktif” untuk Dosen Perguruan Tinggi Negeri Kawasan Timur Indonesia di Makassar,* 16-28 Juni 2003. FMIPA UNHAS.
- Salimi YK., Zakaria FR., Priosoerjanto BP. (2012). Akitvitas Proliferasi Sel Limfosit (splenosit) dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Sorghum. Prosiding Seminar Nasional Aspek Budaya, kebijakan dan Filosofi Sains Jamu. ISSN No. 978-602-17935-0-3

## LAMPIRAN

### *Dokumentasi Penelitian*



Gambar 1. Pengambilan sampel daun binahong



Gambar 2. Tahap ekstraksi sampel dengan pelarut metanol

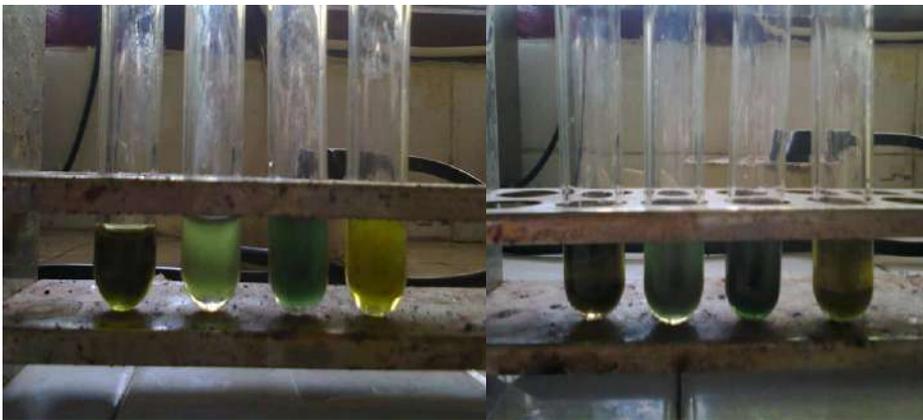


Gambar 3. Tahap fraksinasi dengan pelarut n-heksan (kiri) dan etil asetat (kanan)



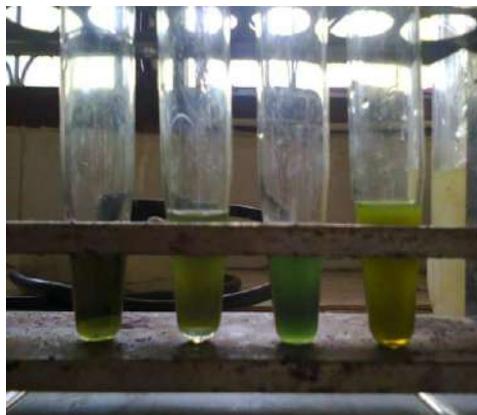
Gambar 4. Ekstrakkentalmetanol

Gambar 5. Hasil fraksinasi-  
heksandanetilasetat



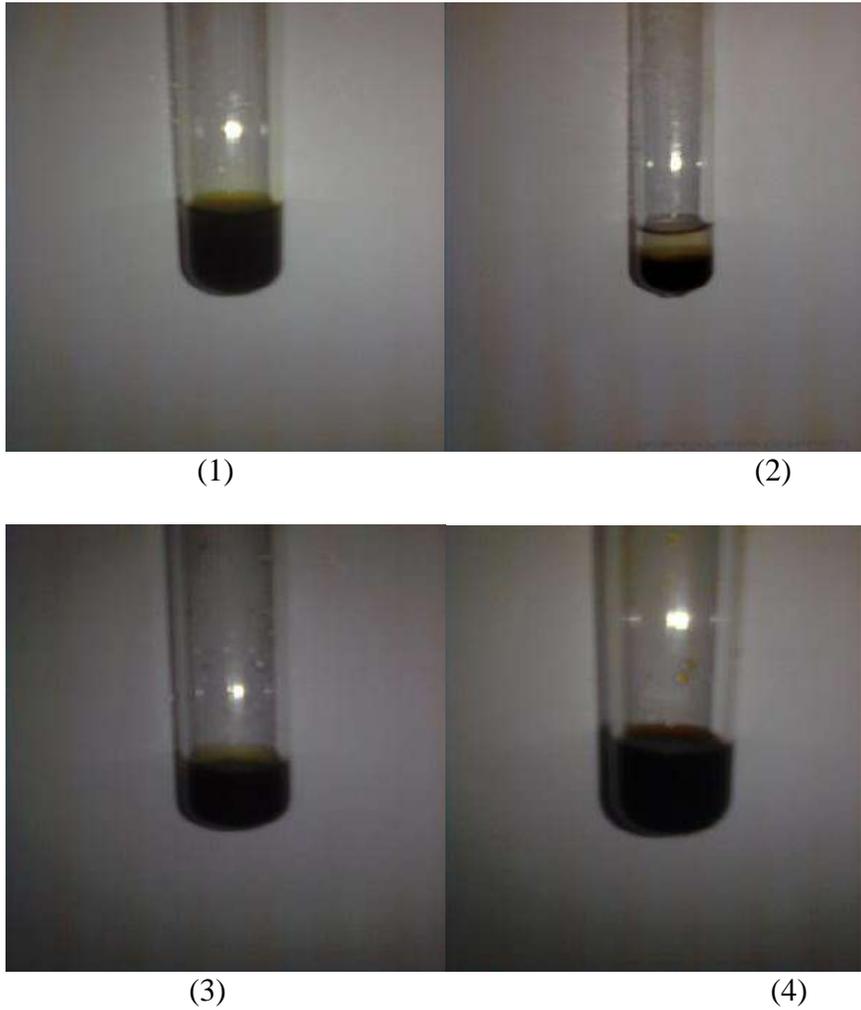
(1)

(2)

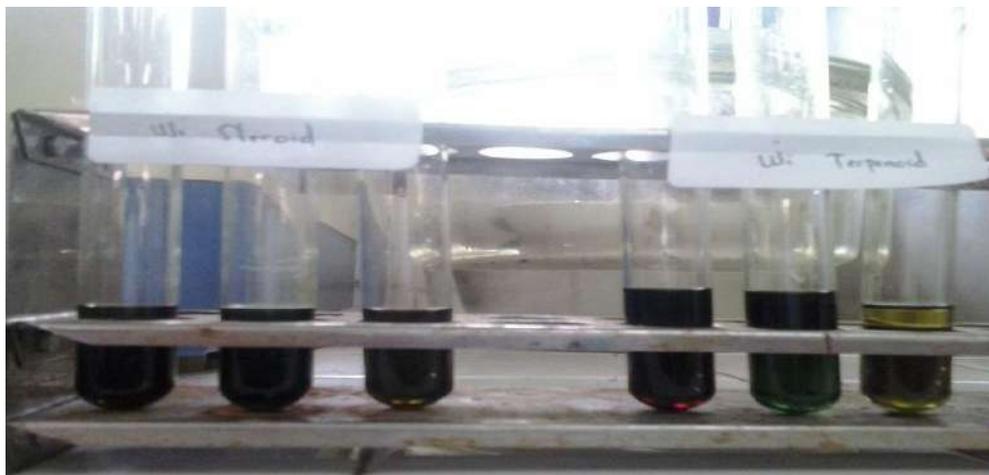


(3)

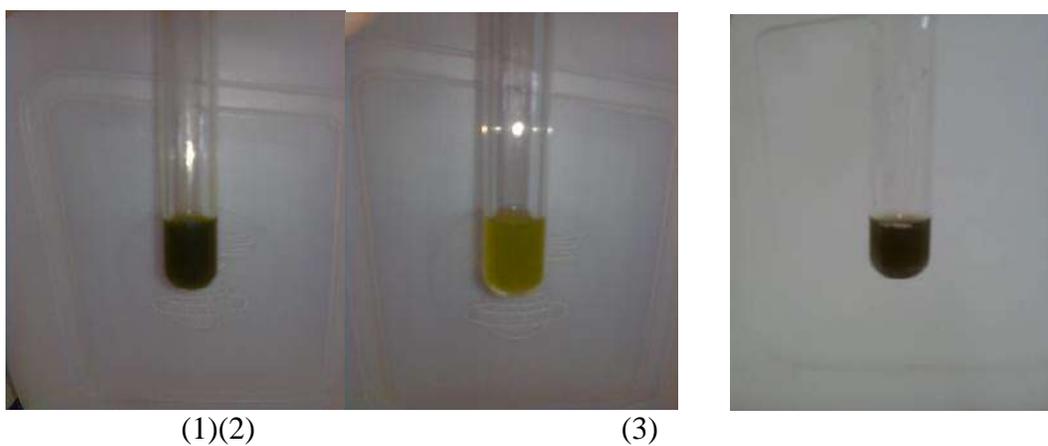
Gambar 6. Hasil uji flavonoid: (1) ekstrak metanol, (2) fraksi heksan, (3) fraksi etilasetat.



Gambar 6. Uji alkaloid : (1) penambahan reagen Hager, (2) penambahan reagen Meyer, (3) penambahan reagen Wagner, (4) penambahan dragendrof.



Gambar 7. Uji fitokimia steroid dan terpenoid: Ekstrak metanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat



Gambar 8. Uji fitokimia Saponin: (1) Ekstrak methanol, (2) fraksi n-heksan, (3) fraksi etil asetat

## Personalia Peneliti

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Yuszda K. Salimi, M.Si
2	Jenis Kelamin	P
3	Jabatan Fungsional	Lektor
4	NIP/NIK/Identitas lainnya	197103231998022009
5	NIDN	0023037106
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Gorontalo, 23 Maret 1971
7	Email	mahirakamal@yahoo.co.id
8	Nomor HP	085219453604
9	Alamat Kantor	Jln.Jnd. Sudirman No.6 Kota Gorontalo
10	Nomor Telepon/Faks	0435-821752
11	Lulusan yang Telah Dihasilkan	S-1= 30 orang; S-2= 0 Orang; S-3= 0 Orang
12	Mata kuliah yang diampu	1. Biokimia 2. Kimia Bahan Makanan 3. Kimia Bahan Alam 4. Kimia Fisik

### A. Riwayat Pendidikan

	S1	S2	S3
Nama Perguruan Tinggi	UNHAS	IPB	IPB
Bidang Ilmu	Kimia	Biokimia	Kimia Pangan
Tahun Masuk-Lulus	1989- 1997	2001-2005	2006-2012
JudulSkripsi/Thesis /Disertasi	Distribusi hidrokarbon n-alkana berdasarkan kedalaman sedimen pantai Ujung Pandang	Aktivitas Antioksidan dan Antihiperkolesterolemia Ekstrak Glukan dari ragi tape dan ragi roti	Peranan Ekstrak Sorgum dalam Penghambatan Kanker secara in vitro dan in vivo pada mencit BALB/c
Nama Pembimbing/Promotor	1. Dr. Jawahir, M.Si 2. Dr. Noor Jalaluddin, MSi	1. Prof. Dr. Maria Bintang, M.S 3. Dr. Sukma Nuswantara,MP hil	1. Prof. Dr. Fransiska Zakaria, MSc 2. Prof.Bambang Pontjo, MSi 3. Dr. Sri Widowaty,MAApp.Sc

### 1. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)

1	2001	Isolasi dan penentuan struktur sedimen hidrokarbon n-alkana.	Biaya DIKS Universitas Negeri Gorontalo	1,5.-
2	2004	Ekstraksi dan Isolasi Beta Glukan dari <i>S. cerevisiae</i>	Penelitian Dosen Muda Biaya DIKTI	6.-
3	2008	Evaluasi Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Glukan dari Serealial Lokal Non Beras	Hibah Bersaing Biaya DIKTI	40.-
4	2009	Evaluasi Aktivitas Antikanker Ekstrak Glukan dari Serealial Lokal Non Beras	Hibah Bersaing Biaya DIKTI	45.-
5	2010	Kapasitas Antioksidan dari Ekstrak Sorgum berdasarkan derajat penyosohan	Mandiri	10.,
6	2011	Potensi Sorgum sebagai Pangan Fungsional Anti Kanker pada mencit BALB/c yang diinduksi AOM dan DSS	Hibah Doktor	20.-
7	2013	Kajian Senyawa Antioksidan Dan Antiinflamasi Tumbuhan Obat Binahong ( <i>Androdera Cordifolia</i> (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo	Hibah Fundamental (DP2M Dikti)	30.-
8	2013	Aktivitas Antioksidan Dan Antikanker Tumbuhan Obat Miana ( <i>Coleus Atropurpureus</i> [L] Benth) Asal Gorontalo	Hibah Bersaing (DP2M Dikti)	30.-
9	2014	Kajian Senyawa Antioksidan Dan Antiinflamasi Tumbuhan Obat Binahong ( <i>Androdera Cordifolia</i> (Ten.) Steenis) Asal Gorontalo	Hibah Fundamental (thn 2)	75.-
10	2014	Aktivitas Antioksidan Dan Antikanker Tumbuhan Obat Miana ( <i>Coleus Atropurpureus</i> [L] Benth) Asal Gorontalo	Hibah Bersaing (thn 2)	75.-
11	2015	onversi plastik jenis PET (Polyethylene terephthalate) menjadi biodiesel	Mandiri	1.5

## 2. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat Dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian kepada masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml(Juta Rp)
1	2012	Pelatihan Pemanfaatan Limbah Kulit Pisang Melalui Teknologi Fermentasi untuk Pembuatan Nata de Skin Banana	Dana PNBP UNG	3.0.-
2	2014	Pelatihan Identifikasi Kandungan Kimia pada Makanan dan Implementasinya dalam Kegiatan Pembelajaran bagi Guru IPA SD di Kabupaten Boalemo Gorontalo	Dana PNBP UNG	1.5.-
3	2014	Pelatihan pengolahan pangan berbasis makanan tradisional pada alumni 2014	Mandiri	1.0.-

### 3. Pengalaman Penulisan Artikel Ilmiah Dalam Jurnal Dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	Distribusi Hidrokarbon Normal Alkana Pada Sedimen Perairan Laut Makassar	Jurnal Entropi	Vol 1. No1.2006
2	Ekstraksi dan Isolasi Beta Glukan dari <i>S. cerevisiae</i> asal ragi roti	Mat Sains	Vol 5, Nomor 1 2010
3	Pengaruh Penyosohan Serealia Sorgum terhadap Kandungan Gizi dan Ekstrak Beta Glukan	Jurnal Saintek	Vol VI. No.3. 2011
4	Penghambatan Ekstrak Sorgum ( <i>sorghum bicolor</i> ) terhadap proliferasi Sel Kanker Limfoma	Jurnal Saintek	Vol VI. No. 5, 2012
5	Aktivitas Ekstrak Sorgum ( <i>Sorghum Bicolor</i> ) terhadap Penghambatan Proliferasi Sel Kanker Kolon HCT 116	Jurnal Keperawatan	Vol I. No. 1, 2013
6	Penentuan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari Rambut Jagung ( <i>Zea Masy L.</i> ) Yang Tumbuh di Daerah Gorontalo	Jurnal Saintek	Vol.VII. No.3, 2013
7	The Sorgum Serealia Functional Foods Utilization to Prevent Cancer in Foods Diversification Efforts	Proceedings	ISBN : 978-979-1159-59-3 Penerbit : Badan Penelitian dan Pengembangan

			Pertanian
8	Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Binahong ( <i>Anrederacordifolia Ten. Steenis</i> ) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test	Saintek	Vol VII, No. 6, 2014

#### 4. Pemakalah Seminar Ilmiah Dalam 5 Tahun Terakhir

No	Nama Pertemuan Ilmiah / Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Pemakalah pada International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Funcional Foods	In vitro Study of Sorghum Seeds Extract Inhibitory Activity to Cancer Cell Proliferation	Bali, Tahun 2010
2	Pemakalah pada International Maize Conference	The role sorghum powder in Cancer Inhibition in BALB/c mice	Gorontalo , 2012
3	Pemakalah pada Seminar Nasional Aspek Budaya, Kebijakan dan Filosofi Sains Jamu	Aktivitas Proliferasi Sel Limfosit (Splensit) dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Sorghum ( <i>Sorghum Bicolor L.</i> )	Bogor, 2012
4			

#### 5. Pengalaman Penulisan Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1	Bahan Ajar Biokimia	2012	259	Jur.Kimia UNG

#### 6. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1	Satya lencana karya 10 tahun	Presiden Republik Indonesia	2012

## PHYTOCHEMICAL CONSTITUENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF BINAHONG (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis) LEAVES

**Yusзда K. Salimi<sup>1\*</sup>, Nurhayati Bialangi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of  
Gorontalo, Gorontalo, Indonesia

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, State University of  
Gorontalo, Gorontalo, Indonesia

\*corresponding: yuszdasalimi@gmail.com

### **Abstract**

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) can heal burns, wounds like after the surgery, rheumatoid arthritis, gout, heart swelling, thypoid, and stroke. Binahong leaves contain flavonoid compound that has an antioxidant activity. Total phenolic content and antioxidant activity of methanol extract, ethyl acetat and hexane fractions derived from binahong leaves were evaluated. The aims of this research are isolation[1], identification, total phenolic content were determined as gallic acid equivalents and antioxidant activity test use DPPH method, which brings in the value of IC<sub>50</sub>. Identification of flavonoid structure was conducted using shift reagent on Infra Red spechtofotometer. For each of 3 extraction solvents, etyl acetat fraction always had highest total phenolic content. Ethyl acetat fraction of methanol extract contained the highest total phenolic content in samples (93,98 mg gallic acid equivalent g<sup>-1</sup> dry extract, respectively). Ethyl acetat fraction of binahong leaves had highest antioxidants activity (94,98 g ascorbic acid 100g<sup>-1</sup> dry extract. The result of phytochemical test in binahong leaves showed that positive binahong contained flavonoid compound, steroid, terpenoid and saponin. Infrared analysis showed spechtofotometer -OH functional group, C-H aromatic, C=C aromatic and C-OH of suspected flavonoid compounds.

**Keywords:** binahong, total phenolic, antioxidant.

### **1. Introduction**

Oxygen free radicals or reactive oxygen species, the by product of the cell metabolism, are also produced in the body on exposure to sunlight, X-rays, ozone, tobacco smoke, and auto-exhaust and other environmental pollutants. There is increase evidence to show the involvement of free radicals and reactive oxygen species in a variety of diseases. They can cause damage to cellular bio-molecules such-as nucleic acid, proteins, lipid and carbohydrates, and consequently may adversely affect immune functions (Halliwell, 1995). Antioxidants interfere with the production of free radicals and also play a key role to inactivate them (Dusinska et al. 1999). Phytochemicals like carotenoids, tocopherols, ascorbates, and phenol present

in plants are strong natural antioxidant and have an important role in health care system.

Binahong (*Anredera cordifolia*) is one species of the Basellaceae which empirically has many benefits in health, especially for treating various disease . Potential as a medicinal plant because of the bioactive compounds from these plants. Binahong have been reported contain alkaloids, polyphenols, saponins, terpenoids, flavonoids, and volatile oils. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity and estimate the phenolic content of binahong leaves extract. The antioxidants activities of methanolic crude extract and its two different solvent sub fractions (namely, hexane extract (HE), ethyl acetat extract (EAE)) from Binahong using DPPH test method. The use of 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical as a reagent for screening the antioxidant phytochemicals has been greatly reported. The Folin-Ciocalteu's reagent is sensitive to reducing compounds including polyphenols, thereby producing a blue color upon reaction.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Plant material**

The leaves of *Andredera cordifolia* were collected from Gorontalo. The plant material was identified in Department of Biology, State University of Gorontalo.

### **2.2. Chemicals**

Absolute methanol (min.99.8 %), ethyl acetate (min. 99%), n-hexane (min. 99%). Folin-Ciocalteu's reagent and 1.1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) were purchased Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). All other chemicals used were of analytical grade and were obtained from Merck and Sigma-Aldrich.

### **2.1. Extraction and fractinations**

Fresh edible parts (6.4 kg) of binahong leaves were washed and rinsed with tap water and shade-dried. The plant material were dried under shade and ground to coarse powder was extracted exhaustively with methanol at room temperature. Maceration was used as a method of extraction. The combined extract was evaporated to dryness on a rotary evaporator. The dried methanolic extract further successively partitioned with n-hexane and ethyl acetate. Resultant filtrate was concentrated under reduced pressure by rotary evaporator.

### **2.2. Qualitative phytochemical analysis**

The leaves of binahong was subjected to preliminary phycochemical analysis for detection of major chemicals groups. Extract of Binahong was analysed for the presence of flavonoids, alkaloids, glycosides, steroids, phenols, saponins, terpenoids, and tannins according to standard method (Harborne, 1973)

### **2.3. Determinations of total phenolic compounds**

The amount of total phenolic contents in binahong extract was determined with Folin-Ciocalteu's reagent according to the method of Slinkard and Singleton (1977). Folin-Ciocalteu's is a method used for the determinations of total phenolic compounds. Gallic acid was used as a standard and the results were calculated as gallic acid equivalent (mg/g) of binahong extract through the calibration curve of gallic acid.

#### 2.4. Evaluations of Antioxidant Activity

The DPPH Radical-scavenging activities of methanol extract of Binahong and its fractions were determined according to the previously described method (Yen and Duh, 1994). The DPPH radical scavenging activity was calculated by the following formula: scavenging ability =  $A_{\text{sample}}/A_{\text{blank}} \times 100\%$ , where  $A_{\text{blank}}$  is the absorbance of the blank reaction (using 2 mL of methanol instead of the tested sample). For each sample, its concentration with 50% scavenging ability on the DPPH radicals (IC50) were determined by interpolation of linear regression analysis. Ascorbic acid was used positive control.

#### 2.5. Statistical Analysis

All the experiments were conducted in triplicates, the data were presented as mean  $\pm$  SD. SPSS were used to process the results, which were analyzed by one-way ANOVA and Duncan at  $p < 0.05$  to detect significant differences among groups.

### 3. Result and Discussion

The qualitative phytochemical screening of Binahong extract showed presence of flavonoids, steroids, saponins, and terpenoids. Presence of alkaloids, was not noticed (Table 1).

**Table 1. Phytochemical screenings of Binahong leaf extracts**

Phytochemical constituents	Test Performed	Methanol	Ethyl acetate	n-hexane
Flavonoids	Shinoda's test	+++	+++	++
Alkaloids	Dragendorf test	-	-	-
Steroids	Liebermann Burchard test	++	++	++
Terpenoids	Liebermann Burchard test	++	-	-
Saponins	Frothing test	-	+	-

- = absent, + = present, ++ = moderately present, +++ = appreciable amount

These findings are in agreement with the studies of Murdiyanto *et al.* (2012) and Khunaifi (2010). Flavonoids have been referred to as nature's biological response modifiers because of strong experimental evidence of their inherent ability to modify the body's reactions to allergen, virus, and carcinogens. They show anti-allergic, anti-inflammatory, and anticancer activity (<http://en.wikipedia.org/wiki/flavonoids>).

Plant steroids are known to be important for their cardiotoxic activities, possess insecticidal and anti-microbial properties. They are also used in nutrition, herbal medicine and cosmetics (Callow, 1936).

Plant derived natural products such as flavonoids, terpenoids and steroids etc have received considerable attention in recent years due to their diverse pharmacological properties including antioxidant and antitumor activity (Takeoka and Dao, 2003)

### Total Phenolic compound

**Table 1. Contents of total phenolics of Binahong leaves**

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g)*
Methanol extract	90.59±0.75 <sup>b</sup>
Ethyl acetate extract	93.99±0.30 <sup>c</sup>
Hexane extract	84.64±1.59 <sup>a</sup>

\*All results were presented in mean ±SD, n=3, p<0.05; different letters beside values indicates significant difference between the sample

The amounts of total phenolic in methanolic crude extract and its sub fractions of Binahong were determined, ranging from 84.64 – 93.99 mg/g of extract. As shown in table 1, the total phenolic content of crude extract and its fractions decreases in following order : ethyl acetate extract > methanol crude extract > hexane extract.

The total phenolics contained in the extract influenced by the type of solvent used during the extraction. Methanol extract has a total phenolic content is smaller than the ethyl acetate extract, although statistically not showed the significant difference. The chances are the phenolic compounds contained in the methanol extract still has ties with other compounds such as proteins, polysaccharides, terpenes, chlorophyll, fats and other organic components. Fraction of n-hexane has a total phenolic content of the lowest among all fractions. This is because the non-polar compounds such as fats, waxes, and the oil dissolved in the n-hexane solvent. Such compounds are not in the phenolic group.

### Identifications of functional groups

Infrared radiation is that part of the electromagnetic spectrum between the visible and microwave regions. Infrared radiation is absorbed by organic molecules and converted into energy of molecular vibration, either stretching or bending. Different types of bonds, and thus different functional groups, absorb infrared radiation of different wavelengths.

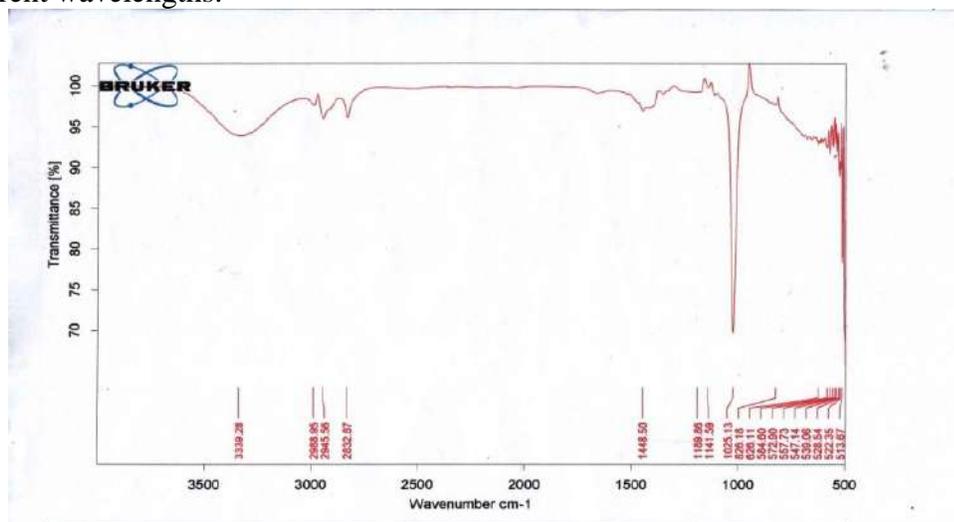


Figure 1. Spectra methanolic extract from binahong leaf

The IR spectrum was performed to identify the functional groups present in methanolic extract base on the peak values in the region of IR radiation. The major bands were observed at  $3339,28\text{ cm}^{-1}$ ,  $2988,95\text{ cm}^{-1}$ ,  $2832,87\text{ cm}^{-1}$ ,  $1448,50\text{ cm}^{-1}$ ,  $1025,13\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 2). The peak at  $3339,28\text{ cm}^{-1}$  indicates the O-H stretch that might be due to the presence of phenols and alcohols. The band at  $2988,95\text{ cm}^{-1}$  and  $2832,87\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the C-H stretch, confirming the presence aliphatic compounds. The peak  $1448,50\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the C-C stretch, confirming the presence aromatic compounds. The peak  $1025,13\text{ cm}^{-1}$  represents C-O stretch which shows the presence of alcohols, carboxylic acid, esters and eters. In addition, some weak absorption bands were also recorder in spectra. Result is that might be due to the presence of flavonoid compounds.

### Antioxidant activity

Antioxidant activities of metanolic extract and its fractions of Binahong were evaluated using the methods of DPPH radical scavenging activity assay.

Table 2. Antioxidant activity of Binahong leaves

Sample	Antioxidant activity (g AEAC/100g)*
Methanol extract	$63.85 \pm 0.67^c$
Ethyl acetat extract	$94.98 \pm 2.84^a$

Hexane extract

81.29±0.63<sup>b</sup>

\*

In this study, antioxidant activity test is using ascorbic acid to create a standard curve. So that units of measurement declared as AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity).

Ascorbic acid standard curve were made to obtain the linear regression equation which will be used to determine the antioxidant activity (mg AEAC / g of sample). Here is the antioxidant activity of each extract of *binahong* expressed in AEAC.

The highest antioxidant activity contained in the ethyl acetate fraction in the amount of 94.98 (mg AEAC / g). Meaning that every gram of dried extract of ethyl acetate equivalent to 47.75 mg of vitamin C. Statistical test results using one-way of ANOVA, found that there were significant differences between the major antioxidant activity of each fraction, the probability value (Sig. ≤ 0.05). Based on Duncan test analysis results have significant differences between fractions of n-hexane, ethyl acetate, and methanol. The list of antioxidant activity in a row is ethyl acetate fraction > methanol extract > fraction of n-hexane.

Differences in the amount of antioxidant capacity in *binahong* plants caused by antioxidant components extracted in the n-hexane solvent which has a slight number group of -OH to donate hydrogen atoms compared to the antioxidant components extracted by using ethylacetate and methanol solvent that has more number group of -OH. Antioxidant compounds will donate hydrogen atoms to reduce and stabilize free radicals.

One source of natural antioxidants from plants are phenols. Phenolic compounds have a broad spectrum with a solubility at different solvents. Therefore, using a variety of solvent extraction processes will produce different polyphenol components. Each plant has a different structure of phenolic components. There are components that possess phenolic group of -OH and there are also a lot of phenolic components which have slight group of -OH. Differences in the number and position of hydroxyl groups in a compound of antioxidants such as phenols and flavonoids, can affect antioxidant activity. Group of -OH plays as role in the electron transfer process to stabilize and reduce free radicals. The more group of -OH on a compound phenol, the ability to reduce free radicals are higher.

Reduction of free radical activity is expressed as the percent inhibition of DPPH, but can also be expressed as the concentration which caused a loss of 50% the activity of DPPH (IC<sub>50</sub>). Values of IC<sub>50</sub> are considered as a good measurement of the efficiency of antioxidant pure compounds or extracts (table 3).

**Table 3. IC<sub>50</sub> of Binahong leaves**

Sample	Antioxidant activity*
Methanol extract	63.85±0.67 <sup>c</sup>
Ethyl acetat extract	94.98±2.84 <sup>a</sup>
Hexane extract	81.29±0.63 <sup>b</sup>

\*mg gallic acid equivalent g<sup>-1</sup> dry extract

#### 4. Conclusion

- The active compounds contained in extracts of *binahong* leaves (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis) are flavonoids, steroids, terpenoids.
- Fraction of ethyl acetate that giving the greatest inhibition marked with IC50 which the smallest among all factions. Ethyl acetate fraction gives the inhibition of 242.68 ppm, methanol extract provides inhibition of 256.88 ppm and n-hexane fraction gives the inhibition of 308.2 ppm.

#### Acknowledgements

The Financial support of DP2M KEMENRISTEK DIKTI by Hibah Fundamental entitle “Kajian Antioksidan dan Antiinflamasi Tanaman Binahong asal Gorontalo” is gratefully acknowledged.

#### References

- Anonim. 2014. *Flavonoids* [Online] Accesed on 2014 December 15 from (<http://en.wikipedia.org/wiki/flavonoids>).
- Dusinska, M., Lietava, J., Olmedilla, B., Raslova, K., Southon, S., Collins A.R. 1999. *Indicators of antioxidative stress in antioxidants and human health*. In: Basu TK, Temple NJ, Garg ML, eds. *Antioxidants in Human Health*. New York: CAB International. pp.411-422.
- Halliwell, B. 1995. Oxygen radical, nitric oxide and human inflammatory joints disease. *Annals Rheum Dis*, 54, pp. 505-510.
- Harborne, J.B., 1973. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and hall, London.
- Khunaifi, M. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *pseudomonas aeruginosa*. *Skripsi*, Malang. Fakultas Sains dan Teknologi; Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim.
- Murdianto, Agus, R., Enny, F. Dewi, K. 2012. Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid dari Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia*, Universitas Diponegoro.
- Yen, G. C., & Duh, P. D. 1994. Scavenging effect of methanolic extract of peanuts hulls on free radical and active oxygen . *J Agric Food Chem*. 42: 629-632.