

DAUN MIANA

Sebagai ANTIOKSIDAN
& ANTIKANKER

Tentang Penulis



Yuszda K Salimi. NIDN 0023037106. Dilahirkan di Gorontalo pada tanggal 23 Maret 1971. Anak pertama dari keluarga Drs. Kasiru Salimi (Alm) dan Fatmah Buluati (Alm). Pada tanggal 23 Januari 1999 menikah dengan Masrin M. Ali dan Allah SWT memberikan karunia tiga anak: Nurul Zakiah Ali (Alm), Mahirah

Salsabila Ali dan Ahmad Kamaluddin Ali. Menyelesaikan sekolah di SDN 53 (1983), SMPN 2 (1986), SMAN 3 (1989) di Kota Gorontalo. Meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) di jurusan Kimia FMIPA di Universitas Hasanuddin (1997). Sejak 1998, bekerja sebagai dosen tetap di jurusan Kimia Universitas Negeri Gorontalo (UNG). Meraih gelar Magister Sains (M.Si) di program studi Biokimia Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB) pada tahun 2005. Gelar Doktor (Dr) diraih di Ilmu Pangan IPB pada tahun 2012. Mengampu mata kuliah Kimia Dasar, Biokimia, Kimia Bahan Makanan, Biokimia Pangan, Toksikologi dan Bioteknologi. Aktif menulis artikel di beberapa jurnal ilmiah Nasional dan Internasional. Sejak tahun 2011 melakukan penelitian yang didanai oleh hibah DRPM Kemenristekdikti seperti Hibah Doktor, Hibah Bersaing, Hibah Fundamental dan hibah PTUPT. Tak hanya meneliti, penulis juga aktif melakukan pengabdian pada masyarakat. Pernah menjabat sebagai Dekan Fakultas Sains dan Teknologi (2013-2016) dan Ketua LPPM (2016-2020) Universitas Muhammadiyah Gorontalo. Sejak tahun 2015, dipercaya sebagai tenaga ahli bidang pangan dan auditor pada Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan, dan Kosmetika (LPPOM) Majelis Ulama Indonesia Provinsi Gorontalo.

Yuszda K. Salimi

DAUN MIANA Sebagai ANTIOKSIDAN & ANTIKANKER

Yuszda K. Salimi

DAUN MIANA

Sebagai ANTIOKSIDAN
& ANTIKANKER

Penerbit YPSM +62 8159 5168 18
ypsimbanten@gmail.com
Ypsim Banten
www.ypsimbanten.com
Kavling Mersi Blok A. 12, Citraas
Kota Serang Provinsi Banten



DAUN MIANA SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER

**Penulis:
YUSZDA K. SALIMI**



DAUN MIANA SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIKANKER

2021 | 00319

Penulis

Yuszda K. Salimi

Editor

Abdul Rosid, S.E

ISBN: 978-623-6356-79-1

Desain Sampul

Lukas Liani, S.Psi.

Layout

Asep Nugraha, S.Hum.

Cetakan Pertama Desember 2021

x + 86 hlm ; 14.8 x 21 cm

Penerbit

Yayasan Pendidikan dan Sosial

Indonesia Maju (YPSIM) Banten

Kavling Aji Said – Muntil Permai

Blok A.12 Lingkungan Muntil

Kota Serang Provinsi Banten

E-mail: Ypsimbanten@gmail.com

Website : www.ypsimbanten.com

WhatsApp: 0815 9516 818

ANGGOTA IKAPI No. 039/BANTEN/2020

(IKATAN PENERBIT INDONESIA)

*Hak Cipta Dilindungi oleh Undang-undang Dilarang mengutip
atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam
bentuk apapun juga tanpa izin tertulis dari Penulis dan Penerbit*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah atas berkat rahmat Allah Ta'ala sehingga buku yang berjudul "daun miana sebagai antioksidan dan antikanker" dapat diterbitkan.

Pengetahuan tentang tumbuhan obat merupakan warisan budaya bangsa berdasarkan pengalaman beradaptasi dengan lingkungan alam, dan atau diwariskan secara turun-temurun. Umumnya masyarakat memakai tumbuhan miana untuk pengobatan tradisional radang tenggorokan dan demam. Secara empiris tumbuhan obat sudah diketahui manfaatnya terhadap kesehatan namun belum banyak publikasi ilmiah tentang potensi tumbuhan miana sebagai antioksidan dan antikanker. Buku ini akan mengungkap keunggulan senyawa metabolit sekunder daun miana sebagai antioksidan dan antikanker. Pengujian aktivitas antioksidan dan antikanker daun miana dilakukan dengan metode *in vitro* dan menghubungkan aktivitas biologis dengan senyawa bioaktif berupa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan miana.

Buku ini diharapkan dapat menambah ilmu tentang "data base" metabolit sekunder seperti flavonoid yang berpotensi sebagai suplemen antioksidan dan atau obat, juga untuk mengeksplorasi sumber senyawa kimia dari tumbuhan miana di Indonesia khususnya yang tumbuh di Gorontalo.

Penulis menyadari bahwa kajian dalam buku ini belumlah sempurna. Oleh karena itu masukan, saran, dan kritik sangat diharapkan. Kepada semua pihak yang telah membantu dan memungkinkan diterbitkannya buku ini, penulis sampaikan terima kasih yang tak terhingga,

khususnya kepada Jurusan Kimia UNG, Suleman Duengo, M.Si., Adi Ahmad Samin, S.Pd dan Ramdan Podungge, S.Pd yang telah membantu dalam pengumpulan dan analisis data. Semoga Allah Ta'ala membalas segala upaya yang telah diberikan dan semoga buku ini dapat bermanfaat.

Wassalamualaikum warahmatullahi
wabarakatuh

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	4
1.3. Tujuan	5
BAB 2. LANDASAN TEORI	6
2.1. Tumbuhan Miana	6
2.2. Antioksidan	11
2.2.1. Pengujian aktivitas antioksidan	16
2.3. Kanker	17
2.3.1. Pengujian aktivitas antikanker	19
2.4. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder	22
2.4.1. Ekstraksi	26
2.4.2. Fraksinasi	27
2.4.3. Skrining fitokimia	28
2.4.4. Kromatografi	29
2.4.5. Kromatografi lapis tipis	30
2.4.6. Kromatografi Kolom	31
2.5. Spektrofotometri	31
2.5.1. Spektrofotometri UV-Vis	31
2.5.2. Spektrofotometri inframerah (IR)	33
BAB 3. METODOLOGI	34
3.1. Pendekatan Metode	34
3.2. Alat dan Bahan	34
3.3. Tahap-tahap Penelitian	35
3.3.1. Pengambilan dan preparasi sampel daun miana	35

3.3.2. Ekstraksi dan fraksinasi	36
3.3.3. Uji fitokimia flavonoid	36
3.3.4. Isolasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom	36
3.3.5. Uji kemurnian	37
3.3.6. Identifikasi senyawa metabolit sekunder	37
3.3.7. Penentuan total fenol	37
3.3.8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH	38
3.3.9. Persiapan suspensi sel dan pemeliharaan kultur sel kanker	40
3.4. Analisis Statistik	42
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	43
4.1. Preparasi Sampel atau Bahan Baku	43
4.2. Ekstraksi	44
4.3. Fraksinasi	44
4.4. Uji Fitokimia	46
4.5. Pemisahan dan Pemurnian	48
4.6. Uji Kemurnian	50
4.7. Uji Fitokimia Isolat	52
4.8. Penentuan Kandungan Total Fenol	53
4.9. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	55
4.10. Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode Kultur Sel	58
4.11. Identifikasi Senyawa Flavonoid	63
BAB 5. KESIMPULAN	67
5.1. Kesimpulan	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Sifat fisik beberapa jenis pelarut	29
Tabel 4.1. Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi	46
Tabel 4.2. Hasil uji fitokimia ekstrak daun miana (<i>Coleus scutellaroides Benth.</i>) dan fraksi-fraksinya	47
Tabel 4.3. Nilai Rf isolat pada dua variasi eluen	78
Tabel 4.4. Nilai Rf isolat pada KLT dua dimensi	52
Tabel 4.5. Data spektrum spektrofotometri inframerah dari isolate daun miana	53
Tabel 4.6. Data spektrum spektrofotometri inframerah dari isolate daun miana	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Tumbuhan miana	7
Gambar 2.2. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida	16
Gambar 2.3. Reaksi penangkapan radikal oleh DPPH	17
Gambar 2.4. Reaksi MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	21
Gambar 2.5. Struktur umum senyawa alkaloid	22
Gambar 2.6. Struktur senyawa terpenoid	23
Gambar 2.7. Struktur umum senyawa steroid	23
Gambar 2.8. Struktur inti senyawa saponin	24
Gambar 2.9. Struktur umum senyawa tannin	25
Gambar 2.10. Struktur dasar senyawa flavonoid	25
Gambar 2.11. Pemisahan noda pada KLT	29
Gambar 4.1. Perkiraan reaksi antara senyawa flavonoid dengan HCl + serbuk Mg	48
Gambar 4.2. Perkiraan reaksi golongan senyawa flavonoid dengan NaOH	48
Gambar 4.3. Profil kromatogram KLT isolasi hasil kolom gravitasi (isolasi pertama) fraksi etil asetat daun miana dengan eluen n-heksan : etil asetat (3:7)	49
Gambar 4.4. Profil kromatografi lapis tipis hasil kolom gravitasi (isolasi kedua) isolate 100-172 menggunakan eluen n-heksan : etil asetat 3:7	50
Gambar 4.5. Profil kromatografi lapis tipis isolate 102 dengan berbagai eluen, n-heksan : etil asetat 8:2 (1) dan kloroform : methanol 9:1 (2)	51
Gambar 4.6. Profil kromatografi lapis tipis dua dimensi isolate 102 menggunakan eluen n-heksan : etil asetat 8:2 (1) dan kloroform : methanol 9:1 (2)	52

Gambar 4.7. Total fenol pada ekstrak berbagai fraksi dan isolate flavonoid daun miana	54
Gambar 4.8. Aktivitas antioksidan pada ekstrak berbagai fraksi dan isolate flavonoid daun miana	56
Gambar 4.9. Aktivitas antioksidan (IC_{50}) pada ekstrak berbagai fraksi dan isolate flavonoid daun miana	58
Gambar 4.10. Mikrograf penghambatan sel kanker oleh ekstrak daun miana (A. control negative yaitu sel kanker WiDr tanpa ekstrak (control), B. WiDr + perlakuan ekstrak heksana 125 ,ml)	60
Gambar 4.11. Pengaruh ekstrak miana ungu terhadap penghambatan proliferasi sel kanker A549 dan WiDr. (MxA549 = ekstrak methanol, HxA549 = fraksi heksana, ExA549 = ekstrak etil asetat, konsentrasi C1 = 125 ppm, C2 = 62.5 ppm, C3 = 31.25 ppm)	61
Gambar 4.12. Hasil spectra UV-Vis isolate daun miana	65

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Data Hasil Analisis Pengujian Kandungan Total Fenol.....	79
Lampiran 2	Hasil Pengolahan data Aktivitas Antioksidan.....	82

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia adalah negara yang kaya akan potensi keanekaragaman hayati yang terdiri atas tumbuhan tropis dan biota laut. Berbagai jenis tumbuhan yang hidup di Indonesia dengan keelokkan dan ciri masing-masing. Diantara sekian banyaknya tumbuhan tersebut, banyak yang dimanfaatkan sebagai obat oleh nenek moyang kita. Berdasarkan warisan turun temurun nenek moyang, para ahli mulai merancang dan mengembangkan metode-metode penelitian untuk mengetahui adanya kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan sehingga dapat digunakan sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit.

Sebagai salah satu negara terkaya di dunia dalam cadangan plasma nutfah tumbuhan obat, Indonesia memiliki sekitar 30.000 – 50.000 spesies tumbuhan, 9600 spesies di antaranya berpotensi untuk dikembangkan menjadi tumbuhan obat, dan kurang lebih hanya 300 spesies yang telah digunakan sebagai bahan obat tradisional oleh industri obat. Tumbuhan obat sangat populer digunakan sebagai bahan baku obat tradisional dan jamu, yang jika dikonsumsi akan meningkatkan sistem kekebalan tubuh (*immune system*), karena tumbuhan ini mempunyai sifat spesifik sebagai tumbuhan obat yang bersifat pencegahan (preventif) dan promotif melalui kandungan metabolit sekunder seperti ginkgrol pada jahe dan santoriso pada temulawak yang mampu meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Mengonsumsi jamu tidak mempunyai sifat kuratif yang berarti menyembuhkan, namun lebih ke arah pencegahan dengan meningkatkan sistem kekebalan tubuh, sehingga lebih bermanfaat untuk sehat dan bukan untuk sembuh. Hal itu karena tumbuhan

obat yang ada saat ini masih belum dikembangkan menjadi obat herbal, tetapi masih lebih untuk jamu. Namun, jika tumbuhan obat ini mampu diproduksi sebagai Obat Herbal Terstandar (OHT) dan fitofarmaka yang sudah diuji klinis pada manusia bisa meningkatkan levelnya menjadi kuratif atau bisa menyembuhkan.

Bertambah pesatnya ilmu pengetahuan dan teknologi di dunia mendorong terjadinya perubahan pada pola hidup masyarakat yang kurang sehat. Menurut Legards *et al.* (2002), hal tersebut berdampak pada munculnya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker. Penyakit kanker merupakan salah satu penyakit tidak menular yang menjadi beban kesehatan diseluruh dunia. Kanker merupakan penyakit yang ditandai dengan adanya sel yang abnormal yang bisa berkembang tanpa terkendali dan memiliki kemampuan untuk menyerang dan berpindah antar sel dan jaringan tubuh. Badan kesehatan dunia/*World Health Organization* menyebutkan kanker sebagai salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia.

Prevalensi penyakit kanker di Indonesia diperkirakan akan meningkat terus seiring dengan meningkatnya perubahan pola konsumsi pangan dan gaya hidup. Kanker merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar di Indonesia dan menjadi penyebab kematian tertinggi kedua setelah penyakit kardiovaskuler. Global Burden of Cancer Study (Globocan) dari World Health Organization (WHO) mencatat, total kasus kanker di Indonesia pada 2020 mencapai 396.914 kasus dan total kematian sebesar 234.511 kasus.

Tumbuhan obat menunjang peningkatan respon kekebalan terhadap penyakit tubuh. Zat aktif yang terkandung dalam tumbuhan seperti flavonoid merupakan komponen penting dalam menunjang imunitas tubuh

karena dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Antioksidan yang berasal dari tumbuhan dapat mencegah kerusakan oksidatif melalui reduksi dengan radikal bebas dan membentuk kelat dengan senyawa logam katalitik.

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan adalah daun miana (*Coleus atropurpureus* [L] Benth). Secara tradisional masyarakat memanfaatkan daun miana sebagai pereda radang tenggorokan, penambah darah dan penurun demam.

Tumbuhan tersebut secara empiris digunakan oleh masyarakat dengan mengambil beberapa pucuk untuk direbus dan air rebusannya diminum. Masyarakat mungkin tidak mengetahui pada tumbuhan tersebut terdapat kandungan senyawa metabolit sekunder sehingga bermanfaat sebagai obat. Masyarakat umumnya menggunakan tumbuhan tersebut sebagai obat hanya berdasarkan warisan turun temurun yang kemudian dijadikan kebiasaan. Penelitian tentang khasiat daun miana sebagai antibakteri telah dilakukan oleh Mpila D.A (2012) yaitu ekstrak etanol daun Miana. Tumbuhan miana ungu (*Coleus scutellarioides* (L) Benth (L) Benth) ini dapat pula digunakan untuk pengobatan kanker, leukemia dan semua jenis infeksi, seperti infeksi Mikoplasma dan mikobakteria, serta beberapa penyakit kulit (dermatitis, psoriasis, infeksi kulit, scleroderma) dan semua jenis penyakit infeksi oleh virus. Fungsi lain dari daun Miana Ungu (*Coleus scutellarioides* (L) Benth (L) Benth) adalah mengurangi nyeri, mengurangi spasme, mengatasi peradangan dan dapat mencegah luka serta menurunkan demam (Permadi 2008).

Buku sederhana ini mengkaji tentang ekstrak daun miana hijau dan miana ungu sebagai antioksidan dan antikanker.

1.2. Permasalahan

Prevalensi kanker selama 5 tahun terakhir sekitar 946.088 kasus. Kanker payudara memiliki jumlah kasus baru tertinggi di Indonesia sebesar 65.858 kasus atau 16,6% dari total 396.914 kasus kanker. Kanker serviks (leher rahim) menempati urutan kedua dengan jumlah 36.633 kasus atau 9,2% dari total kasus kanker.

Untuk mengkaji secara ilmiah tumbuhan obat miana dapat bermanfaat terhadap kesehatan dan berfungsi sebagai obat, maka perlu adanya penelitian tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun miana yang berfungsi sebagai antioksidan dan antikanker. 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 antikanker perlu dilakukan karena obat-obat sintesis antikanker yang digunakan selama ini masih menimbulkan beberapa efek samping yang tidak diinginkan (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 sintesis.

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 sehingga komponen aktif yang berperan sebagai produk antioksidan dan antikanker dapat diketahui.

1.3. Tujuan

Secara rinci tujuan khusus yang ingin disampaikan pada buku ini adalah:

1. Mengekstraksi dan fraksinasi senyawa metabolit sekunder daun tumbuhan miana
2. Menguji toksisitas ekstrak dan fraksi secara *in vitro*
3. Menguji aktivitas antioksidan dan antikanker ekstrak dan fraksi aktif tumbuhan miana secara *in vitro*
4. Mengisolasi fraksi yang prospektif.
5. Mengungkapkan hubungan struktur dan aktivitas biologi flavonoid hasil isolasi dengan metode spektroskopis UV-Vis (ultra violet-visible) dan IR (infra red).

BAB 2. LANDASAN TEORITIS

2.1. Tumbuhan Miana

Tumbuhan miana secara ilmiah memiliki sinonim (*Coleus scutellarioides* (L) Benth (L) Benth, *Coleus atropurpureus* (L) Benth, *Plectranthus* (L) Benth, *Coleus blumei* (L) Benth, *Coleus ingrotus* (L) Benth, *Coleus laciniatus* (L) Benth, *Coleus hybridus* (L) Hort). Secara makroskopik daunnya berupa daun tunggal berwarna ungu kecoklatan sampai ungu kehitaman. Nama tumbuhan miana di beberapa daerah memiliki nama yang berbeda-beda seperti si gresing (batak), adang-adang (Palembang), miana, plado (sumbar), jawer kotok (sunda), iler, kentangan (Jawa), ati-ati, saru-saru (bugis), majana (Madura), (Sentra informasi IPTEK, 2012). Penggunaan secara empiris sebagai obat wasir, peluruh haid, dan penambah nafsu makan (Lisdawati dkk, 2008).

Miana merupakan salah satu tumbuhan yang termasuk ke dalam daftar 66 komoditas tumbuhan biofarmaka berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Nomor: 511/Kpts/PD.310/9/2006 (Promosiana dkk, 2007).

Klasifikasi tumbuhan miana berdasarkan Buku Flora of Java C.A and Van Den Brink R.B.C, 1963 adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Sub kingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super divisi	: Spermatophyta (menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua)
Sub kelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: Coleus

Spesies : *Coleus scutellarioides* (L) Benth
Sinonim : *Coleus atropurpureus* (L) Benth

Pada tahun 1896, Siebert dan Voss menempatkan *coleus* Blume, *Coleus scutellarioides* (L) Benth, *Coleus bicolor*, *Coleus vershaffelti* dan *Coleus hybridus* sebagai sub species dari *Coleus scutellarioides*. Oleh karena itu legitimasi nama tumbuhan ini adalah *Coleus scutellarioides* (L) Bentham (Lebowitz, 1985).



Gambar 2.1. Tumbuhan miana

Tumbuhan ini ditemukan hampir di seluruh pelosok Nusantara. Miana dapat tumbuh di daerah rendah sampai ketinggian 1500 meter di atas permukaan laut. Miana juga dapat ditemukan di sekitar sungai atau pematang sawah atau di tepi-tepi jalan pedesaan sebagai tumbuhan liar. Bagian yang menyentuh tanah biasanya keluar akar dan apabila diremas akan mengeluarkan bau yang harum. Batang persegi empat dengan alur yang agak dalam pada masing-masing sisinya, berambut, percabangan banyak, berwarna ungu kemerahan. Berdaun tunggal, panjang tangkai 3-4 cm. Helai daun berbentuk bulat telur, pangkal

membulat atau melekok menyerupai bentuk jantung, ujung meruncing, tepi bergerigi, tulang daun menyirip jelas (berupa alur) berbentuk gambaran seperti jala, permukaan daun agak mengkilap, berambut halus, panjang 7-11 cm, lebar 3,5-6 cm berwarna merah kecoklatan hingga merah kehitaman (Haswira, 2006).

Daun miana adalah daun dari tumbuhan miana, merupakan daun tunggal, panjang tangkai 3–4 cm. Helai daun berbentuk bulat telur, pangkal membulat atau melekok menyerupai bentuk jantung, ujung meruncing, tepi beringgit, tulang daun menyirip jelas (berupa alur) berbentuk gambaran seperti jala, permukaan daun agak mengkilap, berambut halus, panjang 7–11 cm, lebar 3,5–6 cm, berwarna ungu kecoklatan sampai ungu kehitaman (Kinho dkk, 2011).

Daun miana memiliki manfaat untuk pengobatan baik secara tradisional maupun secara medis. Menurut Winarto (2007) daun miana dapat dimanfaatkan sebagai obat bisul, abses, broko luka bernanah, radang telinga, terlambat datang bulan, keputihan, cacingan, dan gangguan pencernaan (dispepsi).

Cara tradisional untuk meramu daun miana ada bermacam-macam sesuai dengan penyakit yang diderita. Untuk mengobati bisul, cara meramu daun miana adalah sebagai berikut : daun segar dicuci sampai bersih. Setelah kering, daun diolesi dengan minyak kelapa. Daun dipanaskan di atas api dan ditempelkan pada bisul selagi hangat. Pengobatan dilakukan 3 kali sehari. Untuk terlambat haid, cara meramu daun adalah sebagai berikut : 7 lembar daun miana merah segar dan kunyit sebesar satu jari dicuci sampai bersih. Ditambahkan garam seujung sendok teh, lalu ditumbuk. Setelah halus, dimasukkan satu sendok makan air jeruk nipis dan tiga sendok makan air

masak. Campuran diaduk rata, lalu diperas dan disaring. Air saringannya diminum sekaligus. Pengobatan dilakukan dua kali sehari, pagi dan sore hari (Kinho dkk, 2011).

Di daerah Gorontalo, daun miana biasanya dimanfaatkan sebagai obat batuk dengan cara meminum air perasannya dengan madu. Selain itu, daun miana juga dipercaya dapat menurunkan kadar gula darah dengan cara direbus bersama daun salam, dan daun sambiloto dan air rebusannya diminum $\frac{1}{2}$ jam sebelum makan (Dalimartha, 2000).

Daun miana memiliki khasiat antimalaria. Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Lisdawati dkk (2008) daun miana memiliki kandungan senyawa kimia yang terbukti secara literatur mempunyai khasiat antimalaria dengan cara diramu dengan daun sirih.

Berdasarkan penelitian oleh Ridwan dkk (2009) Ekstrak etanol daun miana memiliki aktivitas anticestoda terhadap cacing *H. microstoma in vivo*. Aktivitas tersebut meningkat seiring dengan peningkatan dosis ekstrak. Dosis efektif menengah (ED_{50}) ekstrak etanol terhadap cacing adalah 802 (618–997) mg/kg bb. Dosis efektif 99% (ED_{99}) ekstrak etanol adalah 4896 (4008–6414) mg/kg berat badan untuk cacing *H. microstoma* dewasa.

Daun miana juga bermanfaat sebagai antibakteri. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (2008) ekstrak daun miana memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri seperti *S. aurelius* dan *S. epidermidis*. Marpaung dkk (2014) juga menemukan bahwa ekstrak daun miana dapat digunakan sebagai salep untuk pengobatan luka yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Salep miana berhasil dibuat menggunakan bahan dasar salep berlemak, salep ekstrak daun miana dengan

konsentrasi 20%, 40% dan 80% memberikan efek penyembuhan luka terinfeksi pada kulit kelinci.

Tangkeallo dan Widyaningsih (2014) dalam penelitiannya berhasil membuat serbuk minuman instan berbasis daun miana, serbuk minuman ini bermanfaat sebagai sumber antioksidan karena mengandung senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas antioksidan.

Menurut Dalimartha (2000) daun miana mengandung minyak atsiri, fenol, tanin, lemak, fitosterol, kalsium oksalat, dan senyawa *peptic*. Dalam daun miana juga terkandung antosianin yang telah banyak digunakan sebagai pewarna khususnya minuman. Karena senyawa ini merupakan sekelompok zat warna kemerahan yang larut dalam air dan tersebar luas pada tumbuhan. Oleh karena itu dapat digunakan sebagai pewarna alami. Menurut JEFCA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) ekstrak yang mengandung antosianin mempunyai efek toksisitas yang rendah, dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, aktivitas antikarsinogen, efek anti-inflammatorry, memperbaiki ketajaman mata dan memperbaiki perilaku kognitif (Hardiyanti dkk, 2013).

Daun miana juga dilaporkan mengandung saponin dan alkaloid yang memiliki sifat antibiotik seperti anti fungi dan anti mikroba (Seigler DS, 1998). Selain itu daun miana juga mengandung beberapa senyawa yang berfungsi sebagai obat seperti *thymol* yang memiliki sifat antelmintik (mematikan cacing) dan antiseptik, karvakrol yang memiliki sifat disinfektan, eugenol yang bersifat analgesik (peredaa rasa nyeri), dan etil salisilat yang mampu meredakan iritasi (Rahmawati, 2008).

2.2. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas dan berfungsi sebagai agen pereduksi sehingga dapat mengelat ion logam serta mengurangi potensi radikal bebas dalam tubuh (Molyneux 2004).

Antioksidan terdapat dalam membran sel maupun di luar membran dan mempunyai sifat menghambat atau mencegah kerusakan, atau kehancuran sel akibat reaksi oksidasi. Antioksidan mampu mengubah oksidan menjadi molekul yang tidak dapat mempengaruhi jaringan vital lagi. Selain itu, antioksidan dapat menangkap berbagai jenis oksigen yang secara biologis bersifat reaktif (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot HOCl$, dsb), dengan cara mengubah pembentukan molekul radikal bebas atau dengan memperbaiki kerusakan-kerusakan yang diakibatkannya (Widjaja, 1997).

Senyawa antioksidan memiliki peran untuk menangkal tubuh dari radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas sehingga menghambat terjadinya reaksi berantai (Droge, 2002).

Menurut Juniarti dan Yuhernita (2009) peranan antioksidan sangat penting dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif seperti tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes dan kanker yang didasari oleh proses biokimiawi dalam tubuh.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Hal tersebut dapat menghambat kerusakan sel. Berkaitan dengan reaksinya di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter

penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara berlanjut dibentuk sendiri oleh tubuh. Jika jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut dengan stress oksidatif (Winarsi, 2007).

Antioksidan sangat berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Berbagai kerusakan, yaitu ketengikan, perubahan gizi, perubahan warna dan aroma serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena oksidasi. Proses oksidasi tersebut dapat dihambat oleh antioksidan (Hernani, 2005).

Antioksidan mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan senyawa oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif seperti diabetes, kanker, inflamasi jaringan, kelainan imunitas, infark jantung dan penuaan dini (Erawati, 2012 ; Jacob dan Burri, 1996 ; Middleton dkk, 2000). Oksidan, dalam pengertian ilmu kimia, adalah senyawa penerima elektron, (*electron acceptor*), yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron (Suryohudoyo, 2008). Ion ferri (Fe^{3+}), adalah suatu contoh oksidan.



Sementara itu, dalam pengertian ilmu kimia radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron yang tak berpasangan (*unpaired electron*).

Bila terdapat sumber energi yang cukup besar, misalnya radiasi, molekul air dapat mengalami pembelahan

homolitik (*homolytical cleavage*) membentuk atom H dan radikal hidroksil.

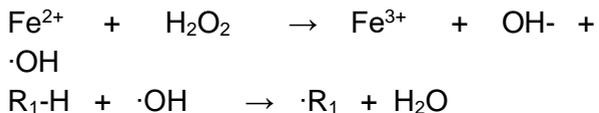
Radikal bebas memiliki jumlah elektron yang ganjil, karena itu tidak semua elektronnya berpasangan. Meskipun suatu radikal bebas tidak bermuatan positif atau negatif, spesi semacam ini sangat reaktif karena adanya elektron yang tak berpasangan. Suatu radikal bebas biasanya dijumpai sebagai zat antara yang tak dapat diisolasi, usia pendek, sangat reaktif, dan berenergi tinggi (Fessenden & Fessenden, 1982).

Radikal bebas dianggap berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya, dapat pula terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Oleh karena sifatnya yang sangat reaktif dan gerakannya yang tidak beraturan, maka apabila terjadi di dalam tubuh makhluk hidup akan menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel (Auroma, 1994). Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain kerusakan membran sel, protein, DNA, dan lipid. Kerusakan tersebut dapat menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif seperti katarak, kanker, atherosklerosis, dan proses ketuaan (Atun, 2007).

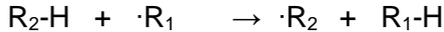
Menurut Winarti (2007), tahapan reaksi pembentukan radikal bebas mirip dengan *rancidity oxidative*, yaitu melalui 3 tahapan reaksi berikut.

➤ Tahapan inisiasi, yaitu awal pembukaan radikal bebas.

Misalnya :



- Tahap propagasi, yaitu pemanjangan rantai radikal



- Tahap terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkal radikal, sehingga potensi propagasinya rendah.



Menurut Sunarni (2005) antioksidan dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E, β -karoten, dan senyawa fenolik.

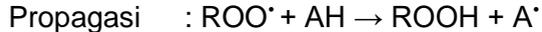
Antioksidan dapat bersumber dari zat-zat sintesis maupun zat-zat alami hasil isolasi. Adanya antioksidan alami maupun sintesis dapat menghambat oksidasi lipid, mencegah kerusakan, perubahan degradasi komponen organik dalam bahan makanan. Beberapa senyawa antioksidan sintesis yang umum digunakan adalah *butylate hydroxytoluen* (BHT) *butylated hydroxyanisole* (BHA) *tertbutylhydroxyquinone* (TBHQ). Antioksidan alami dapat diperoleh dari makanan sehari-hari seperti sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan dan tumbuhan lainnya yang mengandung antioksidan (asam fenolat, senyawa flavonoid) & vitamin seperti vitamin, A, C & E (Erawati, 2012 ; Rohdiana, 2001 ; Pokorny dkk, 2001).

Kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami berasal dari tumbuhan. Kingdom tumbuhan *angiospermae* memiliki kira-kira 250.000 sampai 300.000 spesies, dari jumlah ini kurang lebih 400 spesies yang telah dikenal dapat menjadi bahan pangan manusia. Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang

dapat dimakan. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tumbuhan, yaitu pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari. Bahan-bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami yaitu : rempah-rempah, dedaunan, teh, biji coklat, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan (alga laut). Bahan pangan ini mengandung jenis senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, yaitu asam-asam amino, asam askorbat, golongan flavonoid, tokoferol, karotenoid, tanin, peptida, melanoidin, produk-produk reduksi dan asam-asam organik lain (Sudirman dkk, 2011).

Berdasarkan mekanismenya, antioksidan ada dua yaitu antioksidan inhibitor inisiasi dan antioksidan inhibitor propagasi (Frankel, 2007), sesuai dengan namanya antioksidan tersebut bekerja pada tahap inisiasi dan propagasi pada reaksi radikal bebas.

Gordon (1990) menjelaskan bahwa antioksidan mempunyai dua fungsi, pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan mengandung Hidrogen (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^{\cdot} , ROO^{\cdot}) atau mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^{\cdot}) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

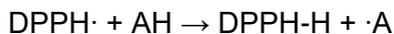


Gambar 2.2 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida (Gordon, 1990)

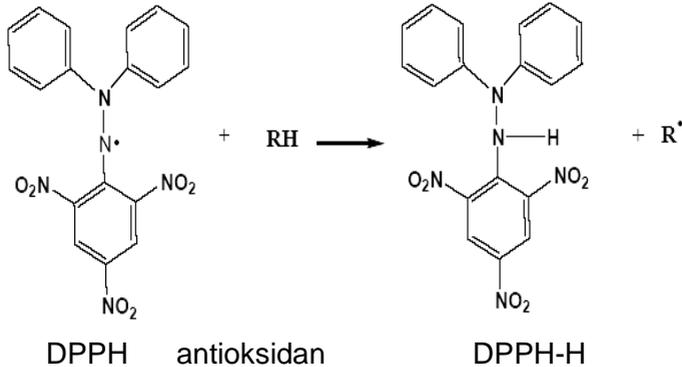
2.2.1. Pengujian aktivitas antioksidan

Berbagai macam metode untuk pengukuran aktivitas antioksidan telah banyak digunakan untuk melihat dan membandingkan aktivitas antioksidan pada berbagai macam sumber antioksidan. Beberapa metode pengukuran aktivitas antioksidan yang dapat digunakan antara lain metode beta karoten, metode linoleat, metode terkonjugasi, metode tiosianat, metode rancimat dan metode DPPH (Nur dan Astawan, 2011).

Menurut Frankel (2007) 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) radikal adalah radikal bebas sintesis yang digunakan dalam metode tanpa substrat untuk mempelajari efek struktur dari aktivitas antioksidan fenolik. Secara komersial, DPPH mengubah radikal pengoksidasi ke keadaan tereduksi oleh antioksidan dan warna adalah indikator dari reaksi.



Metode DPPH merupakan metode yang sering digunakan untuk penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH yang stabil (Sudirman *dkk*, 2011). DPPH adalah radikal bebas yang stabil dalam larutan berair atau metanol serta memiliki serapan yang kuat pada panjang gelombang sekitar 517 nm. Radikal bebas DPPH bersifat peka terhadap cahaya, oksigen dan pH, tetapi bersifat stabil dalam bentuk radikal sehingga memungkinkan untuk dilakukan pengukuran antioksidan (Molyneux, 2003).



Gambar 2.3. Reaksi Penangkapan Radikal oleh DPPH (Molyneux, 2004)

Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dapat dinyatakan dalam AEAC (Ascorbic acid antioxidant capacity) dan IC_{50} (Inhibitor concentration). Menurut Jun dkk, (2003) tingkat kekuatan antioksidan adalah kuat ($IC_{50} < 50$ ppm), aktif (IC_{50} 50-100 ppm), sedang (IC_{50} 101-250 ppm), Lemah (IC_{50} 250-500 ppm), dan tidak aktif ($IC_{50} > 500$ ppm).

2.3. Kanker

Kanker berasal dari kata *carcinoma* (Yunani), *cancer* (Inggris) atau *kanker* (Belanda). Jaringan kanker atau neoplasma adalah suatu gangguan pertumbuhan dengan karakteristik sel yang berlebihan, abnormal dan merupakan proliferasi yang tidak terkontrol dari jaringan yang mengalami transformasi atau perubahan pada satu atau lebih tempat utama dalam tubuh inang dan umumnya disertai dengan metastasis atau penyebaran pada bagian lain tubuh inang (Priosoeryanto, 1994).

Proliferasi sel yang sangat cepat menimbulkan benjolan pada organ atau disebut tumor. Tumor tidak mempunyai fungsi fisiologis, namun sebaliknya dapat menimbulkan gangguan dan bahkan bersifat patologis. Tumor dapat bersifat benign (benigna) artinya tumor yang tidak berkembang menjadi kanker dan ada juga yang bersifat malignant (maligna) yang berarti dapat menyebar, seperti kanker paru-paru yang dapat menyebar ke jaringan atau organ disekitarnya (Cotran et al. 1994). Kanker berawal dari kerusakan materi genetika atau DNA(deoxyribonucleic acid) sel. Satu saja sel mengalami kerusakan genetik, sudah cukup untuk menghasilkan neoplasma atau tumor. Komponen genetik berperan dalam perkembangan berbagai kanker. Mutasi genetik penyebab kanker dapat terjadi karena faktor dalam (endogen) sekitar 5 - 10%, yaitu melalui kesalahan replikasi pada saat sel-sel aus digantikan oleh sel baru, atau kesalahan genetika karena diturunkan oleh orang tua. Sebagian besar kanker terjadi karena faktor luar atau eksternal (sekitar 90 - 95%) melalui pola makan yang salah, polusi udara, infeksi, radiasi dan bahan-bahan kimia asing yang masuk ke dalam tubuh.

Kematian yang terkait dengan kanker sekitar 30 - 35% disebabkan oleh pola makan yang salah, 25 - 30% disebabkan oleh bahan kimia yang terdapat dalam rokok dan sisanya adalah karena faktor lainnya seperti radiasi, stres, obesitas dan polutan (Anand et al. 2008).

Sel normal menjadi jaringan kanker terjadi melalui beberapa rangkaian tahapan karsinogenesis yaitu inisiasi, promosi dan progresi, yang dilanjutkan tahap metastasis tumor.

2.3.1 Pengujian aktivitas antikanker

Kultur sel merupakan teknik mengembangbiakkan sel di luar tubuh (*in vitro*) dimana sel dari suatu jaringan tertentu diambil dan ditumbuhkan pada kondisi yang terkontrol dan aseptik. Sel yang digunakan sebagai kultur sel dapat berasal dari jaringan manusia, hewan atau tumbuhan.

Limfosit adalah sel darah putih atau leukosit yang berbentuk bulat dengan diameter 7-15 μm . Sel limfosit selain terdapat di dalam darah perifer, terdapat juga pada organ limfoid seperti limfa, kelenjar limfe dan timus. Limfosit manusia berjumlah sekitar 30% dari persentasi normal sel darah putih. Sel limfosit memiliki fungsi yang kompleks dengan fungsi utama adalah memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor khusus dalam menanggapi antigen yang terikat oleh makrofag, merupakan sel kunci dalam proses respon imun spesifik, dapat mengenali antigen melalui reseptor antigen dan mampu membedakannya dari komponen tubuhnya sendiri (Kuby, 1992).

Kultur sel dari jaringan sel kanker diperbanyak dibawah kondisi yang sesuai sampai sel dapat menggunakan semua substrat, menjadi sangat padat (terlihat dekat satu sama lain) atau mencapai konfluen. Setelah mencapai konfluen, sel harus dipindahkan ke dalam wadah yang baru dengan medium yang baru untuk mendukung pertumbuhannya kembali, istilah ini disebut subkultur (*passage*). *Cell lines* adalah sel yang berasal dari kultur primer yang telah dibiakkan secara berkala, ditumbuhkembangkan, dipelihara, dan disimpan dalam nitrogen cair. *Cell lines* yang telah disubkultur umumnya mempunyai fraksi pertumbuhan yang cukup tinggi (lebih dari 80%). Salah satu keistimewaan dari *cell lines* ini adalah

bersifat abadi (*immortal*), sel ini masih dapat hidup dalam kondisi media seminimal mungkin. *Cell line* tertentu dapat mengalami transformasi sehingga dapat berkembang secara immortal seperti sel tumor, ini disebut *continuous cell line*. *Continuous cell line* yang diklon dan dikarakterisasi akan menurunkan *continuous cell strain* (Freshney 1994).

Sel yang telah dikultur akan tumbuh dan bertambah banyak dalam kondisi *in vitro* dan tidak akan memiliki fungsi *in vivo*-nya lagi. Sel yang berasal dari jaringan atau organ yang diuraikan secara mekanis ataupun enzimatik menjadi suspensi sel dibiakkan diatas permukaan yang keras seperti botol, tabung, cawan ataupun *multiwell*, atau menjadi suspensi sel dalam media pertumbuhan. Untuk pertumbuhan sel dalam kultur dibutuhkan lingkungan yang kompleks seperti di dalam tubuh. Sel memerlukan media penumbuh yang dapat membuat sel tetap bertahan hidup, berkembang dan berdiferensiasi (Cartwright & Shah, 1994).

Jumlah dan kualitas media menentukan jumlah sel yang dapat ditumbuhkan dalam kultur. Pemilihan media harus didasarkan pada kebutuhan sel yang ditumbuhkan dan disesuaikan dengan tujuan studi yang menggunakan sel tersebut. Teknik kultur sel memiliki kelebihan karena lingkungan tempat hidup sel seperti pH, tekanan osmosis, tekanan CO₂ dan O₂ dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan (Freshney, 1994).

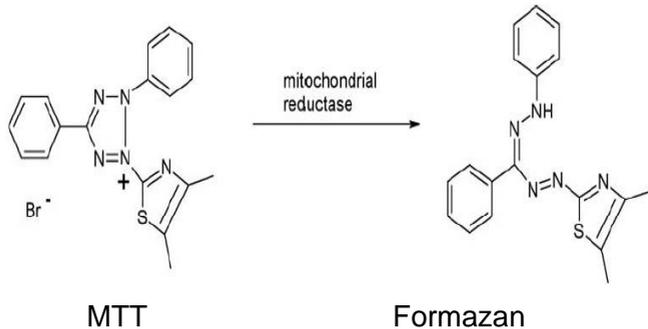
Fungsi utama media pada teknik kultur sel adalah untuk mempertahankan pH dan osmolalitas esensial untuk viabilitas sel serta penyedia nutrisi dan energi yang dibutuhkan untuk multiplikasi dan pertumbuhan sel (Cartwright & Shah, 1994). Media untuk pertumbuhan sel harus mengandung asam amino, vitamin, glukosa, garam berbagai suplemen organik seperti protein, peptide,

nukleosida dan lipid serta hormon dan faktor pertumbuhan. Media *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) dan *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) adalah media kultur sel terbaik untuk menumbuhkan sel limfosit dan alur sel kanker manusia untuk jangka pendek.

Ada dua jenis kultur sel kanker, yaitu kultur dalam bentuk suspensi dan kultur dalam bentuk selapis atau monolayer. Kultur sel dalam bentuk suspensi diturunkan dari sel yang dapat bertahan hidup atau mampu berproliferasi dalam media tanpa memerlukan *support* atau faktor pembantu untuk menempel. Kultur sel dalam bentuk selapis memerlukan *support* untuk menempel pada permukaan tempat kultur. Dalam perkembangbiakannya, sel akan memenuhi permukaan tempat tumbuhnya. Sel-sel yang dibiakkan dalam bentuk monolayer ini biasanya untuk sel-sel yang berasal dari jaringan (Freshney 1994).

Alur sel A549 diisolasi pertama kali oleh Giard *et al.* (1973) berasal dari sel karsinoma paru-paru dari pria berumur 58 tahun dengan morfologi menyerupai epitelial. Sel ini memiliki sifat dapat mengekspresikan enzim metabolik xenobiotik.

MTT assay merupakan metode yang penggunaannya sudah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang. Metode ini berdasarkan pada perubahan garam tetrazolium (MTT) menjadi formazan dalam mitokondria sel hidup (Gambar 2.4).



Gambar 2.4. Reaksi MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide).

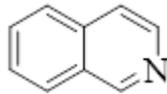
Konsentrasi dari formazan yang berwarna ungu dapat ditentukan secara spektrofotometri visibel dan berbanding lurus dengan jumlah sel hidup. Kristal formazan berwarna ungu yang terbentuk terlarut dengan adanya penambahan isopropanol asam (100 μ l 0,04 N HCl dalam isopropanol) atau SDS 10% dalam HCl 0,01N. Selanjutnya dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 550 - 595 nm. Intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang aktif melakukan metabolisme (Mosmann, 1983).

2.4 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa yang berperan dalam menentukan khasiat dari tumbuhan terhadap kesehatan. Senyawa-senyawa metabolit sekunder terdapat di dalam tumbuhan adalah sebagai berikut:

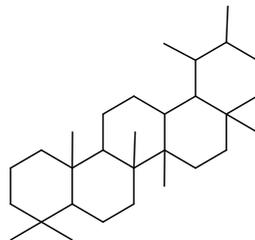
a. Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid bersal dari tumbu-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Ciri khas alkaloid adalah bahwa

semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom N yang bersifat basa dan umumnya merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Alkaloid dapat dipisahkan dari sebagian besar komponen tumbuhan yang lain berdasarkan sifat basanya. Oleh karena itu, senyawa golongan ini sering diisolasi dalam bentuk garamnya dengan HCl atau H₂SO₄. Alkaloid bebasnya berbentuk padat membentuk kristal yang tidak berwarna.



Gambar 2.5. Struktur Umum Senyawa Alkaloid

b. Triterpenoid adalah kelompok senyawa metabolit sekunder yang terbesar, dilihat dari jumlah senyawa maupun variasi kerangka dasar strukturnya. Terpenoid ditemukan berlimpah dalam tumbuhan tingkat tinggi. Terpenoid di alam dijumpai dalam bentuk glikosida, glikosil ester dan iridoid, terpenoid juga merupakan komponen utama penyusun minyak atsiri.

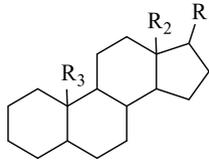


Gambar 2.6. Struktur Senyawa Terpenoid

Senyawa-senyawa yang termasuk dalam kelompok terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah atom karbon penyusunnya. Senyawa terpenoid tersusun atas karbon-karbon dengan jumlah kelipatan lima. Diketahui bahwa sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon

yang dibangun oleh dua atau lebih unit C₅. Yang disebut unit isopren (Salimi YK, et al., 2019).

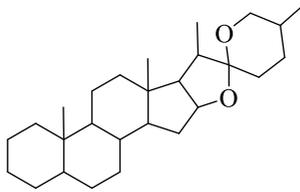
c. Steroid adalah kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren.



Gambar 2.7. Struktur Umum Senyawa Steroid

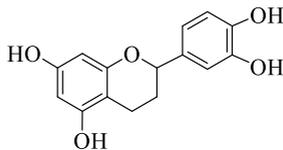
Ditinjau dari segi struktur, perbedaan antara berbagai kelompok ini ditentukan oleh jenis substituen R₁, R₂, dan R₃ yang terikat pada kerangka dasar sedangkan perbedaan antara senyawa yang satu dengan yang lain dari satu kelompok ditentukan oleh panjang rantai karbon substituen, fungsi gugus yang terdapat pada substituen, jumlah dan posisi gugus fungsi dan oksigen dan ikatan rangkap pada kerangka dasar serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar. Kelompok-kelompok tersebut adalah sterol, asam empedu, hormon kelamin, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak dan sapogenin.

d. Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks yaitu terdiri dari senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan suatu senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non-gula (aglikon). Struktur saponin tersebut menyebabkan saponin bersifat seperti sabun atau deterjen sehingga saponin disebut sebagai surfaktan alami (nama saponin diambil dari sifat utama ini yaitu “sapo” dalam bahasa latin yaitu sabun (Hawley, 2004 dan Calabria, 2008) dalam jurnal (Bintoro et al., 2017).



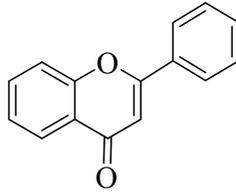
Gambar 2.8. Struktur Inti Senyawa Saponin

e. Tanin merupakan senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul. Tanin menyebabkan beberapa tumbuhan dan buah-buahan memiliki rasa sepat dan asa pahit dalam suatu jenis buah-buahan yang pahit disebabkan oleh tanin. Secara kimia, terdapat dua jenis utama tanin yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisiskan. Fungsi Tanin pada tumbuhan salah satunya untuk melindungi tumbuhan tersebut dari gangguan hewan lain (Harborne, 1987).



Gambar 2.9. Struktur Umum Senyawa Tanin

f. Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagai zat warna kuning yang terdapat dalam tumbuhan. Sebagai pigmen bunga, flavonoid berperan dalam menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan. Beberapa fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat antimikroba, dan antiinsektida.



Gambar 2.10. Struktur Dasar Senyawa Flavonoid

Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri atas 15 atom karbon yang membentuk susunan C6-C3-C6. Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid (Salimi YK, et al., 2017).

2.4.1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu cara untuk mengambil atau menarik komponen kimia yang terkandung dalam sampel menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi yang benar dan tepat tergantung pada jenis senyawa yang diekstrak. Ekstraksi serbuk kering jaringan tumbuhan dapat dilakukan secara maserasi (Kristanti, dkk., 2008).

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokkan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Depkes RI, 2000). Hasil dari ekstraksi berupa ekstrak yang berbentuk sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (Depkes RI, 1979).

2.4.2. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan kandungan utama golongan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar dan senyawa non polar akan masuk ke dalam pelarut non polar. Bila kita menelaah profil fitokimia lengkap dari suatu jenis tumbuhan maka sebelum dikromatografi ekstrak kasar perlu difraksinasi untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lainnya (Harborne, 1987).

Fraksinasi terdiri dari dua jenis yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat. Ekstraksi cair-padat dapat dilakukan dengan alat sokhlet, pada fraksi ini terjadi keseimbangan diantara fasa padat dan fasa cair (pelarut). Fraksinasi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Senyawa yang bersifat polar akan tertarik pada pelarut yang polar, senyawa yang bersifat semipolar akan tertarik pada pelarut yang bersifat semipolar, dan senyawa yang bersifat nonpolar akan tertarik pada senyawa yang nonpolar. Ekstraksi cair-cair bertahap merupakan teknik ekstraksi yang paling sederhana, cukup dengan menambahkan pelarut pengestraksi yang tidak saling bercampur kemudian dilakukan pengocokan sehingga terjadi distribusi zat terlarut diantara kedua pelarut. Dalam hal ini, pemisahan zat yang paling polar dan non polar dapat dilakukan dengan ekstraksi cair-cair (partisi) dalam corong pisah. Pengocokan bertujuan memperluas area permukaan kontak diantara kedua pelarut singga

pendistribusian zat terlarut diantara keduanya dapat terlangsung dengan baik (Khopkar, 2002).

2.4.3 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder. Suatu ekstrak dari bahan alam terdiri atas berbagai macam metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas biologinya. Senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit sekunder (Harborne,1987).

Senyawa Fitokimia (fito = tumbuhan) adalah zat kimia alami yang terdapat di dalam tumbuhan yang memberikan cita rasa, aroma, ataupun warna khas pada tumbuhan tersebut. Beberapa khasiat senyawa fitokimia adalah sebagai antikanker, antimikroba, antioksidan, antitrombotik, meningkatkan sistem kekebalan, antiinflamasi, mengatur tekanan darah, menurunkan kolesterol, serta mengatur kadar gula darah (Astawan dkk, 2008).

Menurut Howard dkk (2012) Senyawa antioksidan biasanya memiliki satu atau lebih cincin terhidroksilasi atau fenolik yang memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidannya. Senyawa antioksidan tersebut biasanya terdistribusi pada tumbuhan dan terbentuk dari biosintesis shikimat dan chorismat dari prekursor alami L-fenilalanin.

Sebagian besar senyawa antioksidan menyebabkan warna-warna pada tumbuhan. Sebagai contoh antosianin, salah satu senyawa fenolik berwarna ungu, hitam atau merah. Pada tumbuhan yang dapat dimakan seperti buah-buahan dan sayur-sayuran. Senyawa fitokimia juga

memberikan kontribusi terhadap rasa seperti pahit, pekat, dan pedas (Howard dkk, 2012).

2.4.4 Kromatografi

Prinsip dari metode kromatografi adalah distribusi komponen-komponen sampel antara dua fase, yakni fase diam dan fase gerak. Setiap campuran akan mempunyai cara mendistribusi diri di dalam fase diam dan fase gerak dalam sistem yang sudah ditentukan. Campuran lain akan memiliki mekanisme distribusi sendiri-sendiri dalam paduan fase diam dan fase gerak. Pada perkembangannya fase diam dan fase gerak dapat diubah-ubah dan diberi perlakuan tertentu untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi pemisahan. Selain itu dalam sistem modern, senyawa-senyawa yang terpisah ini dapat juga diidentifikasi (Wonorahardjo, 2013).

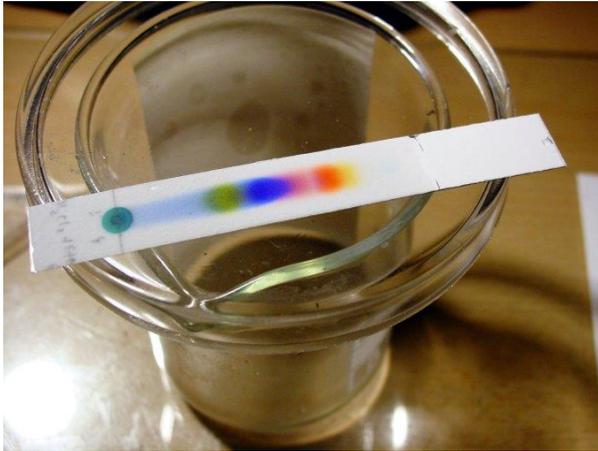
Pada kromatografi, fasa gerak yang digunakan dapat berupa eluen tunggal maupun sistem eluen yang terdiri dari campuran pelarut dengan perbandingan tertentu. Pemilihan pelarut dalam sistem eluen merupakan faktor penting untuk memperoleh sasaran komponen yang diinginkan.

Tabel 2.1. Sifat Fisik Beberapa Jenis Pelarut

Pelarut	Titik didih (°C)	Konstanta dielektrik (Debye)
Heksana	69	1.89
Etil asetat	77	6.0
Metanol	65	32.6
Air	100	78.5

2.4.5 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis atau KLT merupakan jenis kromatografi yang menggunakan aluminium oksida, serbuk selulosa atau silika gel sebagai adsorben yang berupa lapis tipis yang diletakkan di atas selembar kaca. Pada kromatografi ini larutan sampel diteteskan di atas adsorben dan dibiarkan bergerak (Poedjadi dkk, 2009).



Gambar 2.11. Pemisahan Noda pada KLT (Natrij, 2004)

KLT merupakan metode yang sederhana dan efisien karena proses pemisahannya memerlukan waktu yang cukup singkat. KLT sangat terkenal dan digunakan secara rutin dalam banyak penelitian di laboratorium (R.A.DAY dkk, 1981).

2.4.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah jenis kromatografi yang menggunakan kolom atau tabung dengan rongga di tengahnya sebagai tempat untuk meletakkan fase diam, kromatografi jenis ini mempunyai banyak kemungkinan untuk kombinasi fase diam dan fase gerak (Wonorahardjo, 2013).

Pada kromatografi kolom fase diam dipacking dalam bentuk suspensi adsorben seperti alumina atau silika gel. Pada bagian bawah kolom terdapat keran sebagai tempat keluarnya fase gerak, laju aliran fase gerak dipengaruhi oleh gravitasi (R.A.DAY dkk, 1981).

2.5 Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah studi mengenai pemeriksaan secara visual terhadap interaksi antara materi dengan energi radiasi cahaya. Dalam spektrofotometri diukur seberapa jauh sebuah energi radiasi diserap oleh suatu sistem dalam panjang gelombang (R.A.DAY dkk, 1981).

2.5.1. Spektrofotometri UV-Vis

Dasar spektroskopi UV-Vis adalah serapan cahaya. Bila cahaya jatuh pada senyawa, maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul-molekul sesuai dengan struktur dari molekul senyawa tersebut. Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum UV-Vis tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra UV-Vis dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat dengan transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Oleh sebab itu, serapan radiasi UV-Vis sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Keuntungan dari serapan ultraviolet yaitu gugus-gugus karakteristik dapat dikenal dalam molekul-molekul yang sangat kompleks (Sastrohamidjojo,1991). Panjang gelombang cahaya UV-Vis jauh lebih pendek daripada panjang gelombang radiasi inframerah. Spektrum sinar tampak terentang dari sekitar 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah), sedangkan spektrum ultraviolet terentang dari 100 nm sampai 400 nm.

Kuantitas energi yang diserap oleh suatu senyawa berbanding terbalik dengan panjang gelombang.

Spektrum ultraviolet adalah suatu gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmitasi atau absorptansi). Spektroskopi UV-Vis digunakan untuk menentukan gugus kromofor yang terdapat dalam sampel. Istilah kromofor digunakan untuk menyatakan gugus tak jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah UV-Vis (Sastrohamidjojo, 1991). Daerah UV yang paling banyak penggunaannya secara analitik mempunyai panjang gelombang 200 - 380 nm dan disebut sebagai UV pendek (dekat). Sedangkan panjang gelombang daerah tampak (visible) berkisar antara 380 - 780 nm (Sastrohamidjojo, 1991).

Spektrofotometer serapan sinar tampak dan ultraviolet memanfaatkan sinar dengan panjang gelombang 400-700 nm untuk daerah sinar tampak dan 100-400 nm untuk daerah sinar ultraviolet (Sastrohamidjojo, 1991).

2.5.2. Spektrofotometri Inframerah (IR)

Spektrofotometri Inframerah merupakan hal yang sangat penting dalam kimia modern khususnya dalam bidang organik. Spektrofotometri ini merupakan alat penting dalam penemuan gugus fungsi, pengenalan senyawa, dan analisis campuran.

Panjang gelombang eksak dari absorpsi oleh suatu tipe ikatan bergantung pada jenis getaran dari ikatan tersebut, oleh karena itu tipe ikatan yang berbeda seperti C-H, C-C, O-H dan sebagainya menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang karakteristik yang berlainan (Fessenden dan Fessenden, 1986).

BAB 3. METODOLOGI

3.1. Pendekatan metode

Penelitian yang dilaporkan dalam buku ini merupakan penelitian kualitatif dan kuantitatif.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam untuk adalah seperangkat alat untuk isolasi senyawa seperti *rotary evaporator*, pipet tetes, pipet mikro, corong pisah, pengaduk, tabung kolom, statif dan klem, spatula, lampu UV, seperangkat alat gelas, aluminium foil, kertas saring, corong, kaca arloji, neraca analitik, blender, pompa vakum, botol fial, dan seperangkat tabung reaksi, Elisa reader, *spektrofotometri UV-Vis* dan IR.

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah miana (*Coleus scutellarioides* Benth.) ungu dan miana hijau yang tumbuh di Kelurahan Liluwo Kota Gorontalo serta Kelurahan Longalo Kabupaten Bone Bolango dan telah dideterminasi di laboratorium biologi UNG. Bagian tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun segar pilihan.

Bahan kimia yang digunakan antara lain : metanol (CH₃OH), akuades (H₂O), plat KLT, silika gel, natrium hidroksida (NaOH), Kalium Iodida (KI), asam asetat (CH₃COOH) glasial, n-heksan, etil asetat, kloroform, HCl pekat, logam Magnesium (Mg), FeCl₃, H₂SO₄ pekat, pereaksi Meyer, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), asam galat, dan Vitamin C (asam askorbat), MTT, Cell line A549, WiDR.

3.3. Tahap-Tahap Penelitian

Adapun tahapan yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengambilan dan preparasi sampel daun miana
2. Tahap ekstraksi dan fraksinasi
3. Uji fitokimia
4. Isolasi senyawa flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan kromatografi kolom
5. Uji Kemurnian Senyawa
6. Penentuan total fenol
7. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
8. Uji aktivitas antikanker
9. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

3.3.1. Pengambilan dan Preparasi Sampel Daun Miana

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tumbuhan miana (*Coleus scutellarioides* Benth.) yang tumbuh di Gorontalo. Daun miana dipilih yang masih segar dan dimasukkan ke dalam kantong plastik. Setelah itu daun miana ditimbang, dicuci serta dikering anginkan untuk menghilangkan kadar airnya. Selanjutnya daun miana dipotong-potong kasar dan dikeringkan kembali di udara terbuka yang terlindung dari sinar matahari langsung. Setelah kering, daun miana rajang kembali hingga menjadi serbuk untuk memperkecil luas permukaan dan mengoptimalkan proses maserasi. Setelah itu dihitung rendemen tahap awal dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen \%} = \frac{W_2 \text{ (g)}}{W_1 \text{ (g)}} \times 100 \%$$

Keterangan :

W2 = Berat contoh / berat setelah perlakuan

W1 = Berat total / berat sebelum perlakuan

Serbuk daun miana yang diperoleh selanjutnya dimasukkan kedalam wadah dan ditambahkan metanol untuk proses maserasi.

3.3.2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi secara maserasi yang bertujuan untuk mengekstrak komponen aktif yang terdapat di dalam sampel. Serbuk daun miana (*Coleus scutellarioides* Benth.) yang telah di haluskan ditimbang sebanyak 500 g dan dimaserasi dengan metanol 3 x 24 jam dan setiap 1 x 24 jam pelarut metanol diganti dengan yang baru. Maserat dievaporasi pada suhu 30-40°C dengan bantuan alat pompa vakum.

Tahap selanjutnya, ekstrak kental metanol disuspensi dengan campuran metanol : air dengan perbandingan (1:2). Setelah itu campuran dipartisi dengan pelarut n-heksan sehingga diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi air. Fraksi n-heksan dievaporasi pada suhu 45°C dan menghasilkan ekstrak kental n-heksan. Fraksi air dipartisi kembali dengan pelarut etil asetat ml sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Hasil partisi dievaporasi pada suhu 45°C sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat dan air, setelah itu dihitung rendemen dari masing-masing fraksi.

3.3.3. Uji Fitokimia Flavonoid

Ekstrak kental dari berbagai fraksi diambil sebanyak 0,1 g dilarutkan dalam 10 ml metanol kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Tabung pertama digunakan sebagai tabung kontrol, tabung ke dua, ke tiga dan ke empat berturut-turut ditambahkan NaOH, H₂SO₄ pekat dan serbuk Mg-HCl pekat. Warna pada masing-masing tabung dibandingkan dengan tabung kontrol, jika terjadi perubahan warna dari tabung kontrol maka positif mengandung flavonoid. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid (Harborne, 1987).

3.3.4. Isolasi Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom

Ekstrak etil asetat daun miana diambil sebagian dan dilarutkan dalam pelarut dan dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis menggunakan beberapa variasi fase gerak hingga diperoleh noda yang terpisah sempurna untuk melihat pola noda dan komposisi pelarut yang optimal. Setelah diperoleh komposisi pelarut yang optimal dengan pola noda yang terpisah sempurna, ekstrak kemudian di isolasi menggunakan kromatografi kolom.

Isolasi daun miana dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan tabung kolom sepanjang 50 cm dan diameter 2,5 cm. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60 sebanyak 46 g dan tinggi 23 cm dan fase gerak n-heksan + etil asetat dengan komposisi bergradien mulai dari n-heksan 100% hingga etil asetat 100%. Mula-mula kolom diisi dengan silika gel yang telah dicampurkan dengan eluen. Setelah itu eluen ditambahkan dan perlahan-lahan dimasukkan ekstrak kental secara merata. Selanjutnya perlahan-lahan keran pada kolom dibuka untuk memulai proses elusi dan eluen yang semakin berkurang

ditambahkan kembali sedikit demi sedikit agar fase diam tidak mengering dan proses elusi tetap berlangsung. Isolat hasil elusi yang keluar dari keran ditampung menggunakan botol fial sehingga diperoleh beberapa fraksi isolat. Hasil isolasi ini kemudian di analisis kembali menggunakan KLT untuk digabungkan kembali jika diperoleh pola noda tunggal dan faktor retensi (R_f) yang sama. Setelah digabungkan, dilakukan uji flavonoid untuk mengetahui fraksi yang mengandung flavonoid. Setelah itu isolat yang telah mengandung senyawa murni flavonoid diidentifikasi dan di uji aktivitas antioksidannya.

3.3.5. Uji Kemurnian

Isolat dari daun miana hasil kromatografi kolom diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi dengan menggunakan beberapa eluen. Jika isolat tetap menunjukkan pola noda tunggal, maka hal tersebut menunjukkan bahwa isolat telah murni.

3.3.6. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Isolat hasil pemisahan dan pemurnian dari ekstrak metanol yang telah diuji fitokimia dan telah di KLT, selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan IR .

3.3.7. Penentuan Total Fenol

Standar asam galat dibuat dengan variasi konsentrasi 10-50 ppm dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 765 nm dan dibuat kurva standar untuk menentukan konsentrasi isolat yang akan diuji. Prosedur pengukuran sampel dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak kurang lebih 12 mg untuk isolat lalu ditambahkan dengan 0,5 ml metanol, 2,5 ml aquadest dan

2,5 ml reagent Folin-Ciocalteu 50%. Campuran didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan dengan 2 ml Na_2CO_3 7,5% dan divorteks lalu diinkubasi selama 2 jam di ruang gelap pada suhu 45°C . Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 765 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Nilai absorbansi yang diperoleh akan dipakai untuk menentukan konsentrasi sampel dengan menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh dari kurva standar ($y = ax + b$).

Perhitungan *Total Phenolic Content (TPC)* adalah sebagai berikut :

$$\text{TPC} = \frac{C.V.f}{g}$$

Keterangan :

TPC = *total phenolic content* (mg asam/g sampel)

C = konsentrasi Fenolik (nilai x)

V = volume ekstrak yang digunakan (ml)

f = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

3.3.8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode DPPH atau dikenal dengan perendaman radikal bebas 1,1-diphenil-2-pikrihidrazil. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan mudah untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat, efektif dan praktis (Molyneux, 2013).

Larutan DPPH dibuat dengan cara melarutkan kristal DPPH dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 1 mM yang dilakukan pada suhu rendah serta terlindung dari cahaya. Antioksidan standar asam askorbat digunakan sebagai pembanding dibuat dengan konsentrasi 25, 50, 100, 200 dan 400 ppm.

Sampel isolat sebanyak kurang lebih 12 mg diencerkan dengan metanol hingga 10 ml. larutan ekstrak dan antioksidan pembanding asam askorbat (vitamin C) yang telah dibuat, masing-masing sebanyak 2,5 ml direaksikan dengan 2,5 ml larutan DPPH 1 mM dalam tabung reaksi dan diberi penanda (label). Sedangkan untuk larutan blanko dibuat dengan mencampurkan 2,5 ml metanol dengan 2,5 ml larutan DPPH 1 mM. Semua campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan terlindungi dari cahaya matahari. Kemudian, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm (Kubo dkk, 2002).

Nilai absorbansi yang diperoleh akan dipakai untuk menentukan aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*). Penentuan nilai AEAC (mg/L) menggunakan persamaan regresi yang telah diperoleh dari kurva standar asam askorbat ($y = ax + b$).

Perhitungan AEAC adalah sebagai berikut :

$$\text{AEAC (mg asam askorbat/g sampel)} = \frac{C.V}{g}$$

AEAC = *Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*
(μg asam askorbat/g sampel)

C = Nilai AEAC (mg/L) = nilai x

V = Volume larutan ekstrak (ml)

g = Berat sampel yang digunakan (g)

Aktivitas antioksidan juga dinyatakan dalam IC₅₀ (Inhibitor Concentration), yaitu konsentrasi sampel yang dapat menurunkan/menangkap setengah radikal bebas. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidan sampel. Sampel dari masing-masing ekstrak dibuat dalam konsentrasi 25, 50, 100, 200, 400 ppm. Larutan ekstrak sebanyak 2,5 ml dicampurkan dengan 2,5 ml DPPH 1 mM. Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan terlindungi dari cahaya matahari, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Absorbansi blanko yang telah diperoleh sebelumnya dan absorbansi yang diperoleh dari pengukuran tersebut akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan persentase penghambatan radikal bebas (persen inhibisi) yang dapat dihitung dengan formulasi sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Persen inhibisi yang diperoleh digunakan dalam persamaan regresi sederhana untuk mencari persamaan $y = b(x) + a$. Persamaan ini akan digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ (inhibitor concentration 50%) masing-masing sampel, dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50% (Bhaigyabati, 2011., Sudirman dkk, 2011).

3.3.9. Persiapan suspensi sel dan pemeliharaan kultur sel kanker

Sel A549, dan WiDr dipelihara dalam media kultur yaitu DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) yang dilengkapi 10% *fetal bovine serum* (FBS), 100U/ml penisilin

dan 100ug/ml streptomisin 1%. Sel diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO₂.

Untuk pemeliharaan sel, dilakukan pergantian media setiap 3 hari sekali atau bila suspensi sel telah berubah warna dari merah menjadi kuning yang menandakan terjadinya penurunan pH. Suspensi sel disentrifugasi pada 228 x g selama 10 menit, supernatan dibuang dan pelet ditambah media kultur, kemudian disentrifugasi kembali. Pelet sel ditambahkan media kultur dan dihomogenisasi, selanjutnya suspensi sel diinkubasi pada inkubator dengan 5% CO₂ pada suhu 37°C.

Pemeliharaan sel selapis dalam pencucian atau pergantian media didalam *flask* diperlukan larutan enzim tripsin-EDTA (tripsin 0,25%) untuk pengangkatan sel yang melekat pada dinding *flask*. media kultur ± 5 ml ditambahkan untuk menginaktifkan tripsin. sel diresuspensi dengan pipet sampai sel terlepas satu-satu. Keadaan sel diamati di mikroskop. Sel diresuspensi kembali jika masih ada sel yang menggerombol. Sel yang telah lepas ditransfer ke dalam *flask* steril baru. Media penumbuh ditambahkan 3 - 5 ml. Viabilitas sel dihitung (suspensi sel dan tripan blue 1:1) dengan alat haemocytometer. Viabilitas sel dihitung dengan persamaan seperti perhitungan jumlah sel limfosit.

Kultur sel ditransfer ke dalam sumuran (96 *well plate*), masing-masing 100 µl dan disisakan 3 sumuran kosong (jangan diisi sel) sebagai kontrol media. Keadaan sel diamati menggunakan alat mikroskop *inverted* untuk melihat distribusi sel. Inkubasi sel di dalam inkubator selama semalam. Ekstrak sorgum dengan konsentrasi 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm untuk perlakuan dan tanpa perlakuan (kontrol sel). Plate yang telah berisi sel

dikeluarkan dari inkubator CO₂. Untuk sel selapis media sel dibuang (plat dibalikkan 180°). PBS 100 µl dimasukkan ke dalam semua sumuran yang terisi sel, kemudian PBS dibuang dengan cara membalikkan plat. Sampel dengan beberapa seri konsentrasi dimasukkan ke dalam sumuran (triplo) dan diinkubasi di dalam inkubator CO₂ selama 48 jam. Kontrol sel hanya diisi oleh media kultur lengkap. Kelompok perlakuan diisi oleh sampel (ekstrak 20 µl yang ditambahkan dalam sumur. Sebagai kontrol positif anti kanker adalah senyawa doxorubisin. Kultur diinkubasi pada inkubator dengan kondisi 5% CO₂, 37°C, dan RH 90%.

Menjelang akhir waktu inkubasi dilakukan pengujian dengan metode MTT untuk mengukur aktivitas penghambatan proliferasinya. Pereaksi garam tetrazolium (MTT) ditambahkan pada tiap sumur mikroplate, selanjutnya diinkubasi selama 4 (empat) jam. HCl-isopropanol 0,04 N ditambahkan 80 µl setelah masa inkubasi berakhir. Pengujian aktivitas penghambatan sel kanker diukur dengan elisa reader pada serapan λ 595 nm dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Data absorbansi perlakuan dihitung dan dikonversi ke rumus :

$$\% \text{ Penghambatan} = (1 - \text{OD}_{\text{sampel}} / \text{OD}_{\text{kontrol}}) \times 100\%$$

595 nm.

3.4. Analisis Statistik

Analisis statistik yang dilakukan dalam penelitian ini adalah analisis statistic dengan program SPSS 19. Metode yang dipakai adalah metode ANOVA *Oneway* dengan dua kali ulangan dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan pada selang kepercayaan 95%.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 . Preparasi Sampel atau Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah daun miana (*Coleus scutellaroides* Benth.) yang tumbuh di daerah Gorontalo. Tumbuhan miana terlebih dahulu dideterminasi di laboratorium biologi Universitas Negeri Gorontalo untuk menghindari kesalahan pengambilan sampel. Daun miana dipilih yang berwarna ungu dan hijau, masih segar dan baik serta dipisahkan dari yang rusak. Daun miana kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Setelah itu daun miana ditimbang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka. Pengeringan daun miana berlangsung selama kurang lebih 3 hari.

Proses pengeringan sampel daun miana dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar tanpa paparan cahaya matahari langsung. Hal ini bertujuan agar kadar air pada daun miana berkurang dan senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya tidak rusak oleh suhu tinggi. Pengurangan kadar air berfungsi untuk memudahkan pelarut menarik komponen bioaktif dalam sampel saat maserasi dan sampel tetap awet karena tidak lembab (Sudirman dkk, 2011). Berat sampel segar yang diambil adalah 3,86 Kg. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan cara dipotong menjadi serbuk. Penghalusan sampel bertujuan untuk memaksimalkan proses maserasi. Berat serbuk halus yang diperoleh adalah 500 g dan rendemen pengeringan adalah 12,95 % yang berarti daun miana kehilangan sekitar 87.05 % beratnya pada proses pengeringan.

4.2 Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi secara maserasi. Tujuan maserasi adalah untuk mengekstraksi komponen senyawa fitokimia yang terdapat di dalam sampel. Sampel daun miana yang telah dirajang dalam bentuk serbuk ditimbang dan diekstraksi menggunakan metanol 4 x 24 jam di mana setiap 1 x 24 jam metanol diganti dengan yang baru, hal ini dilakukan karena metanol yang telah jenuh tidak akan lagi mampu mengikat senyawa dari sampel. Metanol digunakan sebagai pelarut karena mampu mengikat semua komponen kimia yang terdapat pada tumbuhan, baik yang bersifat polar, semipolar, dan non polar. Maserat dievaporasi pada suhu 45°C dengan bantuan alat pompa vakum. Evaporasi dengan menggunakan bantuan pompa vakum akan menurunkan titik didih 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. Ekstrak kental metanol daun miana yang diperoleh seluruhnya adalah 69,81 g dan rendemen tahap 2 adalah sebesar 13,96 %.

4.3 Fraksinasi

Ekstrak kental metanol sebanyak 60 g disuspensi dengan campuran metanol:air dengan perbandingan (1:2) dan difraksinasi secara bertahap menggunakan n-heksan dan etil asetat. Fraksinasi bertujuan agar senyawa yang memiliki kepolaran berbeda terdistribusi dalam pelarut yang bersifat polar, semi polar dan non polar. Pada proses fraksinasi atau partisi, fraksi air (fasa air) cenderung berada di lapisan bawah dan fraksi n-heksan atau etil asetat (fasa organik) berada di lapisan atas. Hal ini terjadi karena air

memiliki masa jenis yang lebih besar dibandingkan pelarut organik.

Hasil fraksinasi kemudian dipekatkan masing-masing menggunakan *rotary evaporator* dan pompa vakum sehingga diperoleh ekstrak n-heksan, etil asetat dan air seperti pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Berat ekstrak kental dari masing-masing fraksi

No	Fraksi	Berat (gram)	Rendemen (%)
1	N-heksan	2,21	3,68
2	Etil asetat	7,41	12,35
3	Metanol-air	15,06	25,1

Berdasarkan tabel 4.1 rendemen fraksi n-heksan, etil asetat dan metanol-air berturut-turut adalah 3,68, 12,35, dan 25,1% hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar rendemen yang diperoleh adalah fraksi metanol air dan rendemen terkecil adalah fraksi n-heksan.

Total rendemen yang diperoleh pada fraksinasi adalah 41,13% yang berarti pada proses fraksinasi lebih dari 50% ekstrak tidak diperoleh, hal ini terjadi karena pada fraksinasi sebagian ekstrak tersisa karena pelarut cukup jenuh sehingga tidak dapat melarutkan ekstrak dan menyisakan residu pada wadah selain itu pada serangkaian proses fraksinasi, evaporasi dan penyalinan, sebagian ekstrak melekat pada wadah sehingga rendemennya dapat berkurang.

4.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia flavonoid dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder flavonoid yang terdapat pada ekstrak dan fraksi-fraksi daun miana.

Terhadap ekstrak metanol daun miana dan fraksi-fraksinya dilakukan uji fitokimia flavonoid. Hasil uji fitokimia flavonoid menunjukkan perubahan warna pada ekstrak metanol dan semua fraksi daun miana namun dengan intensitas yang berbeda, hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol dan semua fraksi mengandung senyawa flavonoid.

Hasil uji fitokimia flavonoid ekstrak metanol daun miana dan fraksi-fraksinya dipaparkan pada tabel 4.2

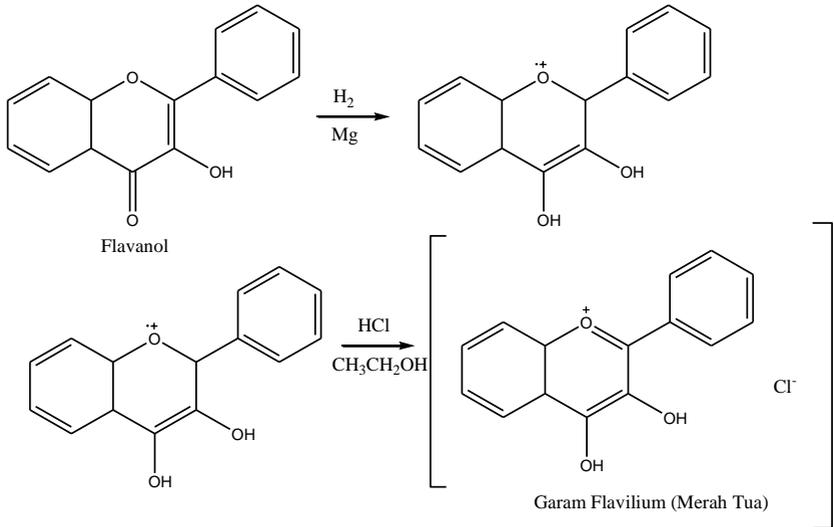
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Miana (*Coleus scutellaroides* Benth.) dan fraksi-fraksinya

Uji Fitokimia	pereaksi	ekstrak			
		M	N	E	A
Flavonoid	NaOH	+	-	+	+
	H ₂ SO ₄	+	-	+	+
	Mg-HCl	+	-	+	+

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

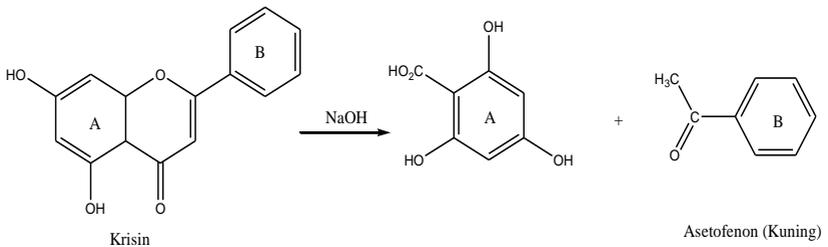
Berdasarkan hasil uji fitokimia seperti pada tabel 4.2 semua fraksi positif mengandung flavonoid kecuali fraksi n-heksan. Fraksi n-heksan negatif mengandung flavonoid karena flavonoid merupakan senyawa polar yang cenderung terekstrak pada pelarut polar.

Perubahan warna pada uji fitokimia terjadi karena senyawa flavonoid dapat membentuk garam benzopirilium yang berwarna merah, kuning, atau disebut dengan garam flavilium.



Gambar 4.1 Perkiraan reaksi antara senyawa Flavonoid dengan HCl+serbuk Mg (Achmad, 1986).

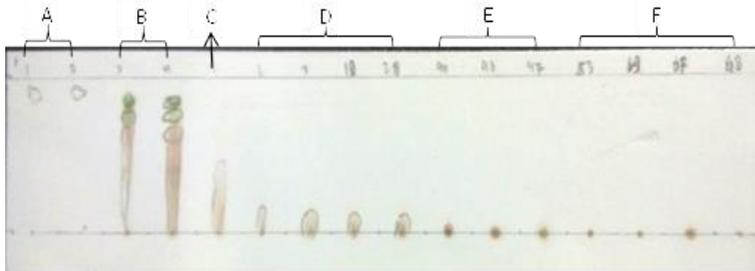
Adapun perkiraan reaksi yang terjadi pada uji flavonoid menggunakan reagen NaOH terlihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Perkiraan reaksi golongan senyawa flavonoid dengan NaOH (Achmad, 1986)

4.5 Pemisahan dan Pemurnian

Terhadap 6,82 gram fraksi etil asetat miana ungu yang diduga mengandung flavonoid aktif antioksidan diisolasi menggunakan variasi eluen yaitu n-heksan dan etil asetat dan metanol dengan berbagai perbandingan hingga diperoleh 68 fraksi isolat. Masing-masing isolat kemudian dipilih beberapa sebagai isolat perwakilan untuk diuji Kromatografi lapis tipis (KLT). Profil kromatogram KLT isolat hasil kolom gravitasi ekstrak etil asetat daun miana dapat dilihat pada gambar 4.3



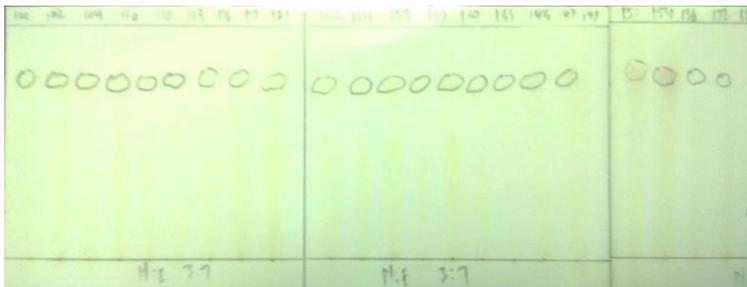
Gambar 4.3. Profil Kromatogram KLT isolat hasil kolom gravitasi (isolasi pertama) fraksi etil asetat daun miana dengan eluen n-heksan : etil asetat (3:7)

Isolat yang memiliki pola noda yang sama kemudian digabungkan menjadi 6 kelompok yaitu A (isolat 1-2), B (isolat 3-4), C (isolat 5), D (isolat 6-39), E (isolat 40-52) dan F (isolat 53-68). Berdasarkan gambar 4.3 isolat A telah memiliki pola noda tunggal akan tetapi senyawa ini merupakan senyawa nonpolar oleh karena itu isolat ini diduga bukan merupakan senyawa flavonoid.

Isolat B kemudian diisolasi kembali karena terdapat banyak senyawa yang belum terpisah sempurna dan diduga senyawa flavonoid terdapat dalam isolat ini.

Sebanyak 1,8 gram isolat B diisolasi kembali dengan metode kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel dan variasi eluen mulai dari n-heksan 100%, n-heksan + etil asetat 9:1 hingga etil asetat 100% dan dilanjutkan dengan eluen etil asetat + metanol 9:1 hingga metanol 100%. Hasil isolasi tahap dua ini menghasilkan 260 fraksi isolat.

Dari 260 fraksi yang diperoleh, fraksi yang berbentuk kristal yaitu terdapat pada fraksi nomor 71-172. Terhadap fraksi nomor 71-172 ini selanjutnya dilakukan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pengembang (eluen) n-heksan:etil asetat (3:7). Hasil analisis kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada gambar 4.4 untuk isolat 100-172

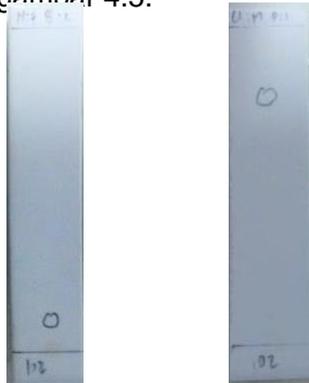


Gambar 4.4. Profil Kromatografi Lapis Tipis hasil kolom gravitasi (isolasi kedua) isolat 100-172 menggunakan eluen n-heksan:etil asetat 3:7

Berdasarkan Gambar 4.4, dapat dilihat bahwa fraksi fraksi nomor 71-172 ini memiliki harga R_f yang sama dan diperkirakan merupakan senyawa yang sama sehingga dapat digabung.

4.6 Uji Kemurnian

Untuk menguji kemurnian isolat, dilakukan kembali analisis dengan kromatografi lapis tipis dengan pengembang (eluen) n-heksan:etil asetat (8:2) dan kloroform:metanol (9:1) pada salah satu isolat yang berada di kisaran isolat 71-172 yang sebelumnya telah diketahui memiliki pola noda tunggal yang sama dalam hal ini dipilih isolat nomor 102. Hasil analisis kromatografi lapis tipis dari isolat dapat dilihat pada gambar 4.5.



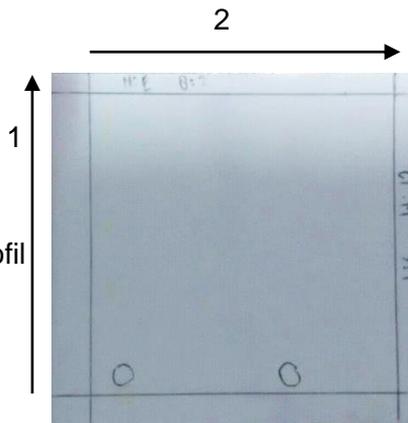
Gambar 4.5. Profil Kromatografi Lapis Tipis Isolat 102 dengan berbagai eluen, n-heksan:etil asetat 8:2 (1) dan kloroform:metanol 9:1 (2)

Berdasarkan pada Gambar 4.5, isolat yang diperoleh tetap menghasilkan bercak noda tunggal, selain itu isolat juga telah berbentuk kristal (lampiran 1). Hal ini menandakan bahwa isolat mengandung satu senyawa yang murni.

Tabel 4.3 Nilai R_f Isolat Pada Dua Variasi Eluen

No	Fasa gerak (Eluen)	Nilai R _f
1	n-heksan : etil asetat (8:2)	0,19
2	kloroform : metanol (9:1)	0,80

Selanjutnya terhadap isolat 102 dilakukan analisis dengan kromatografi lapis tipis dua dimensi dengan menggunakan eluen n-heksan:etil asetat (8:2) dan kloroform:metanol (9:1). Kromatografi lapis tipis dua dimensi tetap menghasilkan bercak noda tunggal berwarna ungu jika dilihat dari lampu UV.



Gambar 4.6. Profil

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi Isolat 102 dengan Menggunakan Eluen n-heksan:etil asetat 8:2 (1) dan kloroform:metanol 9:1 (2)

Hasil uji ini mengindikasikan bahwa isolat yang diperoleh merupakan isolat murni. Hasil uji kemurnian

terhadap isolat yang dilakukan dengan teknik kromatografi lapis tipis dua dimensi disajikan pada gambar 4.6.

Nilai R_f isolat pada kromatogram lapis tipis dua dimensi ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai R_f Isolat Pada KLT Dua Dimensi

No	Fasa Gerak (Eluen)	Nilai R_f
1	Eluen n-heksan : etil asetat(8:2)	0,17
2	Eluen kloroform : metanol (9:1)	0,60

4.7 Uji Fitokimia Isolat

Isolat yang didapat selanjutnya dilakukan uji fitokimia flavonoid. Hal ini dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung pada isolat. Isolat mula-mula dilarutkan kedalam metanol dan dipanaskan di atas penangas air, setelah itu isolat yang telah dilarutkan dan dipanaskan tersebut dibagi kedalam dua tabung reaksi yaitu tabung kontrol dan tabung uji. Tabung uji kemudian ditambahkan pereaksi yaitu logam Mg dan HCl pekat.

Berdasarkan uji fitokimia diperoleh hasil yang positif yaitu perubahan warna sampel dari kuning menjadi jingga yang mengindikasikan bahwa isolat merupakan flavonoid hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Sumarjan (2013) yang melaporkan bahwa daun miana mengandung senyawa flavonoid.

Uji fitokimia ini menggunakan pereaksi Mg+HCl pekat, perubahan warna yang terjadi menunjukkan isolat mengandung flavonoid.

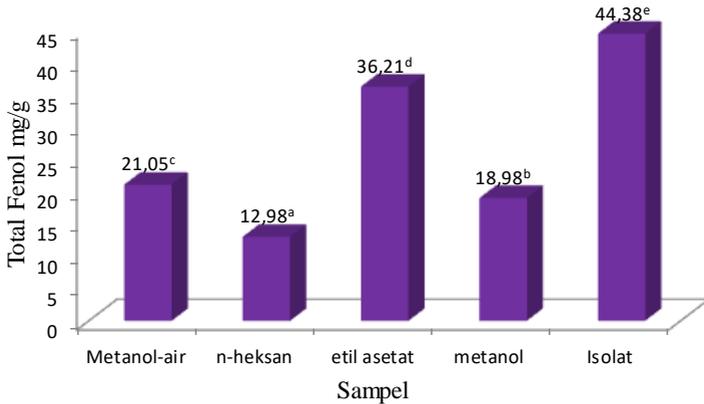
4.8 Penentuan Kandungan Total Fenol

Flavonoid merupakan salah satu senyawa fenolik golongan polifenol yang banyak dan memegang peranan yang penting pada tumbuhan. Sifat yang penting dari golongan polifenol adalah kemampuannya bertindak sebagai antioksidan (Nur dan Astawan, 2011).

Pada penelitian ini penentuan kandungan total fenol dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Metode ini didasarkan pada kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolik. Semua senyawa fenolik dapat bereaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu.

Standar yang digunakan untuk pembuatan kurva dalam penelitian ini adalah asam galat dengan variasi konsentrasi 9,44, 18,88, 28,32, 37,76 dan 47,2 ppm. Kandungan fenolik total pada masing-masing ekstrak dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat atau *Gallic Acid Equivalent* (GAE), di mana GAE merupakan acuan umum untuk mengukur sejumlah senyawa fenolik yang terdapat dalam suatu bahan (Mongkolsilp dkk, 2004).

Berdasarkan perhitungan, diperoleh nilai total fenol pada isolat flavonoid daun miana. Isolat flavonoid daun miana memiliki kandungan total fenol yang paling tinggi dibandingkan ekstrak berbagai fraksi daun miana (gambar 4.7)



Gambar 4.7 Total fenol Pada Ekstrak Berbagai Fraksi dan Isolat flavonoid Daun Miana

Selanjutnya dilakukan uji statistik menggunakan anova satu jalur untuk mengetahui perbedaan yang nyata pada total fenol isolat dan ekstrak, berdasarkan uji statistik terdapat perbedaan yang nyata pada total fenol isolat dan berbagai ekstrak. Selanjutnya dilakukan uji lanjut yaitu duncan yang bertujuan untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan total fenol pada sampel. Hasil uji lanjut yaitu uji duncan kandungan total fenol pada daun miana berturut-turut adalah Isolat > fraksi etil asetat > fraksi metanol-air > ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Isolat memiliki kandungan fenol total paling tinggi karena isolat merupakan senyawa golongan flavonoid yang mengandung komponen fenolik. Isolat telah dimurnikan melalui serangkaian proses, oleh karena itu senyawa telah murni. Fraksi etil asetat berada pada urutan kedua karena

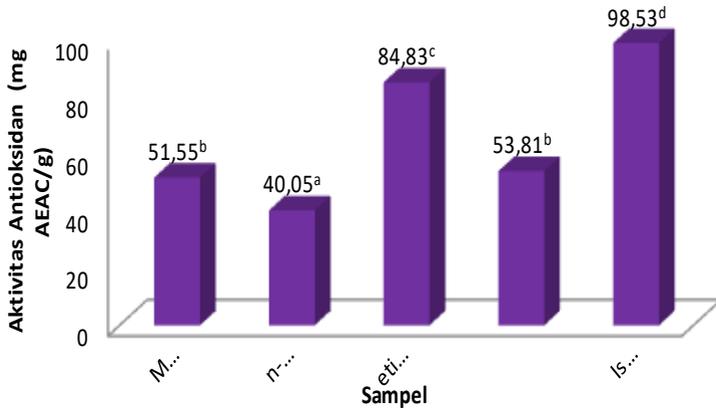
fraksi etil asetat mengandung banyak senyawa fenolik namun dengan kemurnian lebih rendah dibanding isolat. Fraksi metanol-air dan fraksi n-heksan memiliki nilai total fenol yang relatif lebih rendah karena senyawa fenol cenderung tidak terdistribusi dalam fraksi ini, sedangkan pada ekstrak metanol terdapat banyak senyawa selain fenolik yang dapat mempengaruhi pengukuran total fenol.

4.9 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH. Metode ini sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, 2005).

Penelitian ini menggunakan asam askorbat (Vitamin C) sebagai antioksidan standar untuk pembuatan kurva standar sehingga satuan pengukuran dinyatakan sebagai AEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*). Adapun alasan pemilihan Vitamin C sebagai standar karena Vitamin C merupakan antioksidan alami yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga absorbansinya mudah teramati selain itu Vitamin C juga memiliki gugus fenol sehingga dapat dijadikan pembanding dari antioksidan alami yang juga mengandung gugus fenol seperti flavonoid.

Mula-mula dibuat kurva standar asam askorbat untuk mendapatkan persamaan regresi linier yang akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan (mg AEAC/g sampel). Selanjutnya dihitung aktivitas antioksidan pada isolat yang dinyatakan dalam AEAC.



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

Gambar 4.8 Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Berbagai Fraksi dan Isolat Flavonoid daun miana

Gambar 4.8 menunjukkan isolat memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi, hal ini disebabkan oleh kandungan senyawa pada isolat lebih murni dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi sehingga tidak terdapat senyawa lain yang mempengaruhi aktivitas antioksidannya.

Selanjutnya dilakukan uji statistik menggunakan anova satu jalur untuk mengetahui perbedaan yang nyata pada aktivitas antioksidan isolat dan ekstrak, berdasarkan uji statistik terdapat perbedaan yang nyata pada aktivitas antioksidan isolat dan berbagai ekstrak. Hasil uji lanjut yaitu uji duncan kandungan antioksidan pada daun miana

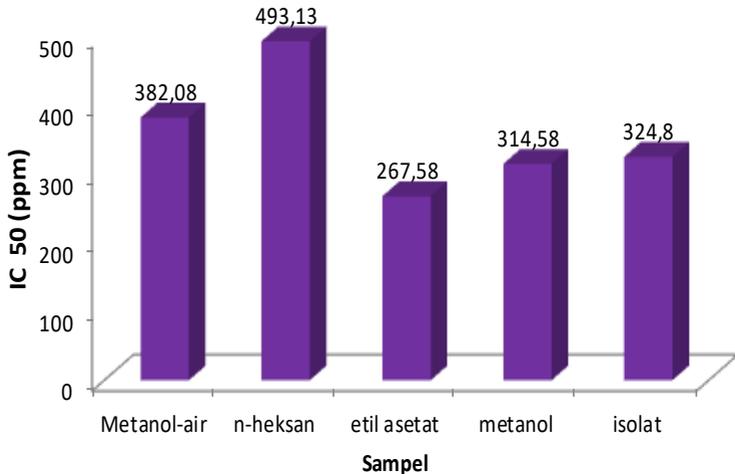
berturut-turut adalah Isolat > fraksi etil asetat > fraksi metanol-air = ekstrak metanol > fraksi n-heksan.

Aktivitas antioksidan pada isolat memiliki nilai yang tertinggi karena senyawa pada isolat mengandung flavonoid dengan kemurnian yang tinggi. Sementara itu fraksi etil asetat memiliki nilai antioksidan di urutan kedua karena fraksi etil asetat diperkirakan banyak mengandung senyawa bergugus OH seperti fenolik dan flavonoid. Fraksi metanol-air dan metanol tidak memiliki perbedaan yang signifikan dikarenakan kandungan senyawa pada fraksi ini hampir sama dan nilai antioksidannya berada di urutan ketiga karena memiliki kepolaran yang tinggi. Fraksi n-heksan memiliki nilai aktivitas antioksidan paling rendah karena senyawa antioksidan yang kebanyakan merupakan senyawa polar cenderung tidak terdistribusi pada fraksi ini.

Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan dikarenakan flavonoid mampu mendonorkan elektronnya melalui atom hidrogen dari gugus OH yang dimilikinya pada radikal bebas. Setelah mendonorkan atom Hidrogen, flavonoid menjadi radikal namun tidak reaktif karena memiliki struktur yang stabil dan berenergi rendah karena elektron tidak berpasangannya didelokalisasi oleh struktur resonansi (Waji dan Sugrani, 2009).

Aktivitas antioksidan juga dinyatakan dalam IC_{50} (Inhibitor Concentration) yaitu besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas, oleh karena itu semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan. Berdasarkan perhitungan nilai IC_{50} dari isolat adalah sebesar 324.80 ppm yang berarti dibutuhkan 324,80 ppm isolat untuk menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC_{50} pada isolat ini berada pada kisaran 250-500 ppm jika dilihat dari tingkatan kekuatan

antioksidannya dan termasuk pada tingkatan lemah. Adapun grafik perbandingan IC_{50} isolat flavonoid dengan ekstrak berbagai fraksi daun miana dapat dilihat pada gambar 4.9.



Gambar 4.9 Aktivitas Antioksidan (IC_{50}) Pada Ekstrak Berbagai Fraksi dan Isolat Flavonoid daun Miana.

Berdasarkan gambar 4.9, aktivitas antioksidan isolat flavonoid daun miana dalam IC_{50} berada pada urutan kedua setelah ekstrak etil asetat dan metanol. Hal ini terjadi karena pada ekstrak masih terdapat banyak senyawa yang dapat bersinergi untuk memberikan aktivitas antioksidan sedangkan pada ekstrak metanol air dan n-heksan aktivitas antioksidannya kecil karena hanya terdapat sedikit senyawa yang memiliki potensi antioksidan.

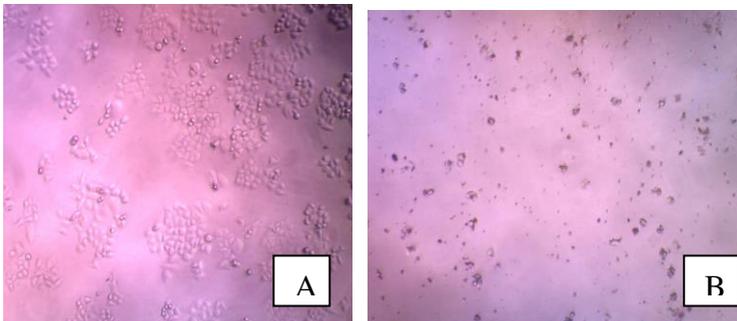
4.10 Uji Aktivitas Antikanker dengan Metode Kultur Sel

Uji bioaktivitas ekstrak daun miana ungu dan hijau terhadap berbagai alur sel kanker dengan metode MTT. Kemampuan penghambatan ekstrak sorgum diuji pada alur sel kanker paru-paru A549 dan kanker kolon WiDr. Alur sel A549 berasal dari sel karsinoma paru-paru dari pria berumur 58 tahun dengan morfologi menyerupai epitelial. Kedua sel ini secara morfologi merupakan sel epithelial berbentuk polygonal dan tumbuh melekat dalam substrat dengan bagian yang terpisah-pisah (sel monolayer). Karena pertumbuhannya ditandai adanya perlekatan sel pada permukaan botol atau wadah pertumbuhan sel. Perlekatan sel dapat dilepaskan dengan penambahan larutan tripsin EDTA, setelah seluruh media pertumbuhan dibuang. Perlekatan antara sel satu dengan sel yang lain dan terhadap substrat kultur diperantarai oleh adanya glikoprotein permukaan sel, ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} . Protein-protein lain yang dihasilkan oleh *cell line* dan serum, bergabung dengan permukaan sel dan substrat sehingga terjadi adisi sel.

Pada mamalia, perkembangbiakan sel diatur oleh serangkaian protein yang diproduksi oleh gen-gen *susceptible* tumor yang disebut onkogen (yang dalam keadaan normal disebut protoonkogen) dan gen penekan tumor. Gen yang termasuk onkogen meliputi gen-gen yang terlibat dalam signal mitogenik dan pemacu pertumbuhan ditemukan dalam proses daur sel (siklus sel). Kerusakan pada gen-gen tersebut beresiko terjadinya kanker atau proliferasi berlebihan. Sel kanker yang sedang berproliferasi mengalami beberapa fase yaitu fase mitosis (M), fase pasca mitosis (G1) yang meliputi sintesis RNA

dan protein, fase sintesis DNA (fase S) dan fase pra-mitosis (G2) untuk persiapan mitosis.

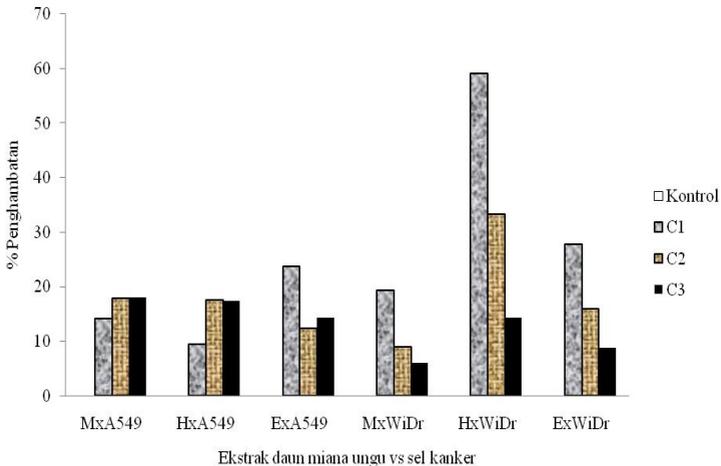
Perbedaan sifat proliferasi sel normal dan sel kanker terlihat dari beberapa ciri. Yang pertama adalah kemampuannya untuk membentuk gumpalan tumor, tidak seperti sel normal. Sifat yang kedua adalah responnya terhadap populasi di kultur. Sifat yang ketiga adalah sifat pertumbuhan yang tidak tergantung pada perlekatan yang menyebabkan sel kanker akan terus membelah, sehingga sering disebut sel lestari atau sel yang abadi.



Gambar 4.10. Mikrograf penghambatan sel kanker oleh ekstrak daun miana.

(A. kontrol negatif yaitu sel kanker WiDr tanpa ekstrak (kontrol), B. WiDr + perlakuan ekstrak heksana 125 $\mu\text{g/ml}$).

Data pada Gambar 4.10 dan 4.11 menunjukkan antiproliferasi terhadap beberapa alur sel kanker ditemukan pada ketiga kelompok ekstrak.



Gambar 4.11 Pengaruh ekstrak miana ungu terhadap penghambatan proliferasi sel kanker A549 dan WiDr. (MxA549 = ekstrak metanol, HxA549 = fraksi heksana, ExA549 = ekstrak etil asetat, konsentrasi C1= 125 ppm, C2 = 62.5 ppm, C3=31.25 ppm).

Jenis pelarut sangat mempengaruhi besar kecilnya penghambatan proliferasi. Penghambatan proliferasi sel kanker paru-paru oleh ekstrak etil asetat > ekstrak metanol > ekstrak heksana. Penghambatan proliferasi sel kanker kolon WiDr tertinggi sebesar 53.76 % pada konsentrasi 125 ppm pada ekstrak heksana miana ungu. Pelarut etil asetat dapat mengekstrak senyawa alkaloid, aglikon dan glikosida, sterol, terpenoid, dan flavonoid (Houghton & Raman, 1998; Cowan 1999).

Metanol dapat melarutkan komponen polifenol yang telah terbukti bersifat toksik terhadap sel kanker. Kemampuan ekstrak metanol menghambat sel kanker

karena ekstrak ini mengandung senyawa polar, seperti gula, asam amino, dan glikosida fenolik dengan berat molekul rendah dan tingkat kepolaran sedang, flavonoid aglikon, antosianin, terpenoid, saponin, tannin, flavon, fenon dan polifenol (Houghton dan Raman 1998; Dehkharghanian *et al.* 2010). Penghambatan pada sel kanker diduga karena adanya flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun miana menyebabkan siklus sel *arrest* (terhenti) sehingga sel tidak dapat berproliferasi. Mekanisme penghambatan sel kanker lambung AGS oleh komponen antosianin (malvidin, sianidin, delfinidin, pelargonidin, peonidin) dilaporkan oleh Shih *et al.* (2005). Malvidin (0 - 200 μ M) menunjukkan aktivitas antiproliferasi sel dan menyebabkan siklus sel *arrest* (terhenti) pada fase G0/G1. Akumulasi malvidin pada fase G1 sel AGS 20% (100 μ M) dan 30% (200 μ M). Sel kanker dalam siklus proliferasi merupakan sel-sel yang sensitif terhadap efek senyawa anti-tumor dan umumnya senyawa sitotoksik bekerja dengan jalan merusak enzim atau substrat yang dipengaruhi oleh sistem enzim. Sebagian besar efek pada enzim atau substrat berhubungan dengan sintesis DNA. Dengan demikian senyawa bioaktif yang terdapat dalam miana diduga menghambat sel yang sedang membelah atau sintesis DNA.

Komponen bioaktif seperti asam fenolat berperan dalam mencegah kanker dan antigenotoksik karena langsung berinteraksi dengan reseptor aril hidrokarbon (Kampa *et al.* 2003). Senyawa bioaktif yang terdapat pada miana diduga berinterkalasi dengan DNA sehingga secara langsung akan mempengaruhi transkripsi dan replikasi. Polifenol dilaporkan mampu membentuk kompleks tripartit dengan topoisomerase II dan DNA. Topoisomerase II adalah suatu enzim tergantung ATP yang bekerja mengikat

DNA dan menyebabkan double-strand break pada ujung 3'fosfat sehingga memungkinkan penukaran strand dan pelurusan DNA superkoil. Pelurusan strand ini diikuti dengan penyambungan strand DNA oleh topoisomerase II. Topoisomerase ini sangat penting fungsinya dalam replikasi dan perbaikan DNA. Pembentukan kompleks tripartit tersebut akan menghambat penyambungan kembali strand DNA, menyebabkan penghambatan daur sel terhenti di fase G1 dan G2 serta memacu terjadinya apoptosis. Adanya gangguan pada sistem perbaikan DNA *double strand* akan memicu kematian sel secara apoptosis (Bandelet *et al.* 2008).

Adanya korelasi aktivitas antioksidan dan antiproliferasi sel kanker merupakan salah satu mekanisme yang diduga menghambat kanker. Ekstrak miana diduga menghambat sel kanker melalui mekanisme apoptosis. Apoptosis dicirikan dengan morfologi sel mengerut, terjadinya kondensasi dan fragmentasi inti sel. Kematian sel disebabkan karena perubahan metabolik yang terganggu diikuti dengan pecahnya sel menjadi benda apoptotik. Proantosianin dilaporkan menginduksi apoptosis pada sel lestari SNU-C4 melalui jalur mitokondria dengan meningkatkan ekspresi gen proapoptosis (Bax) dan menurunkan ekspresi gen antiapoptosis (Bcl-2). Weigun *et al.* (2004) melaporkan bahwa epigeninidin menginduksi apoptosis pada fase G2. Apoptosis yang diinduksi pada sel Hep G2 mungkin dimediasi melalui jalur p53 dan induksi ekspresi p21 berasosiasi dengan sel siklus *arrest* G2.

4. 11. Identifikasi Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri Infra red

(IR) dan UV-Vis . Spektrofotometri IR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung pada sampel isolat.

Hasil pembacaan spektrum pada spektrofotometer IR menunjukkan adanya gugus fungsi OH yang ditandai oleh pita serapan pada bilangan gelombang 3344,8 cm^{-1} . Selain itu juga terdapat gugus C-H aromatik yang ditandai oleh pita serapan pada bilangan gelombang 829,9 cm^{-1}

Tabel 4.5 Data Spektrum Spektrofotometri Inframerah dari Isolat Daun Miana

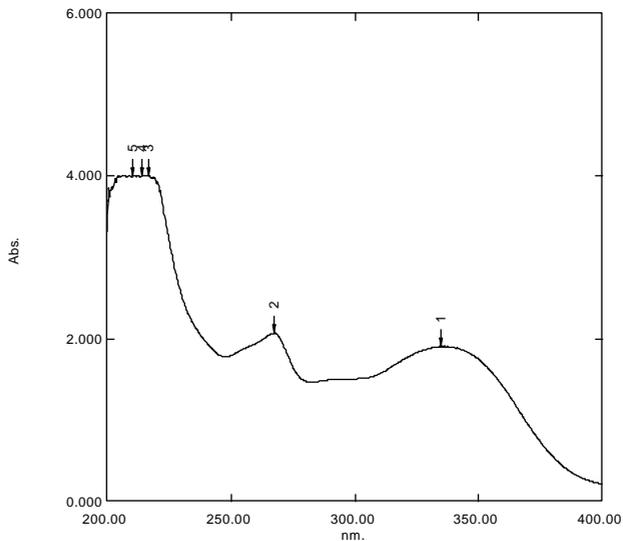
Isolat	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Bentuk Pita	Intensitas	Penempatan gugus
	(Sukadana, 2011)	Creswell, dkk (2005)			
829,9	650-1000	650-1000	Tajam	Lemah	C-H Aromatik
1032,5	990-1100	1000-1260	Tajam	Sedang	C-O Alkohol
1182,7	-	1000-1260	Tajam	Sedang	C-O Alkohol
1245,2	-	1000-1260	Tajam	Sedang	C-O Alkohol
1364,0	-	1220-1370	Tajam	Sedang	C-H Alifatik
1459,0	1400-1650	-	Tajam	Sedang	C=C Aromatik
1609,6	1400-1650	-	Tajam	Sedang	C=C Aromatik
2854,6	2800-2950	2700-3000	Tajam	Sedang	C-H Alifatik
2926,0	2800-2950	2700-3000	Tajam	Tinggi	C-H Alifatik
3344,8	3000-3500	3200-3400	Melebar	Lemah	O-H

Pada pembacaan spektrum juga terdeteksi gugus C=C aromatik yang ditandai oleh pita serapan pada bilangan gelombang 1459,0 cm^{-1} dan 1609,6 cm^{-1} dan beberapa gugus C-H alifatik yang datanya dapat terlihat pada tabel 4.5.

Berdasarkan data spektrum dari spektrofotometri IR pada tabel 4.5, diketahui bahwa isolat mengandung beberapa gugus seperti O-H, C=C aromatik, C-H aromatik,

C-O alkohol dan C-H alifatik yang diduga merupakan senyawa golongan flavonoid.

Metode Spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada absorbansi cahaya tampak oleh larutan berwarna. Senyawa yang tidak berwarna dapat dibuat berwarna dengan mereaksikannya dengan reagen untuk menghasilkan senyawa berwarna. Spektrum terserap atau jumlah absolut spektrum cahaya yang diserap suatu senyawa adalah banyaknya cahaya yang diserap atau hilang oleh suatu senyawa pada panjang gelombang tertentu.



Gambar 4.12. Hasil spektra UV-Vis isolat daun miana

Tabel 4.6 Data Spektrum Spektrofotometri Inframerah dari Isolat Daun Miana

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, hal ini didukung oleh hasil isolasi flavonoid yang dilaporkan oleh Dewi *et al* (2014) yang memberikan serapan pita I pada kisaran panjang gelombang 310-350 nm dan pita II pada kisaran panjang gelombang 250-295 nm.

BAB 5. KESIMPULAN

Dalam buku ini, dideskripsikan empat aspek penting terkait dengan hasil penelitian daun miana ungu. Pertama, daun miana diekstraksi dengan pelarut berdasarkan tingkat kepolaran sehingga didapatkan hasil ekstrak metanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan. Ekstrak etil asetat mengandung flavonoid dan total fenolik yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak metanol dan n-heksan ($36,22 \pm 1,19$ mg GAE/g). Kedua, aktivitas antioksidan yang paling tinggi terdapat dalam ekstrak etil asetat ($84,43 \pm 0,92$ mg AEAC/g) yang berarti bahwa dalam 1 gram ekstrak miana ungu setara dengan 84,43 mg asam askorbat atau vitamin C. Ketiga, penghambatan ekstrak etil asetat daun miana ungu tertinggi pada sel kanker paru-paru A549 adalah 23.76% dan pada sel kanker kolon WiDr ekstrak etil asetat daun miana ungu mempunyai aktivitas penghambatan tertinggi yakni 27.82%. Keempat, spektrum hasil UV-Vis dan IR, terdapat puncak karakteristik dari senyawa golongan flavonoid.

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
- Achmad, Sjamsul Arifin. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Penerbit Karunika. Jakarta
- Astawan, Made., Kasih, A.L. 2008. *Khasiat warna-warni makanan*. Gramedia. Jakarta
- Anand P *et al.* 2008. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res*, 25: 2097-2116.
- Auroma O.I. 1994. Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J Nutr Biochem* 5: 370-381.
- Bhaigyabati, T., T, Kirithika., J, Ramya., K, Usha. 2011. Phytochemical constituents and Antioxidant Activity of Various Extracts Of Corn Silk (*Zea mays. L*). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2(4):986-993.
- Cresswell, J. Clifood, Ollaf A. R., dan Malcolm Campbell. 2005. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Bandung : ITB.
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 1*. Trubus Agriwidya, Anggota IKAPI. PT.Pustaka Pembangunan Swadaya Nusantara. Jakarta.
- Dalimartha, S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta : Trubus Agriwidya, Anggota IKAPI. PT.Pustaka Pembangunan Swadaya Nusantara.

- De Padua, L. S., N. Bunyaprahatsara, & R. H. M. J. Lemmens. 1999. *Plant Resources of South East Asia No 12 (1) : Medicinal and Poisonous Plant*. Blachuys Publisher, Leiden.
- Dewi, Ni Wayan Oktarini A.C., Ni Made Puspawati, I Made Dira Swantara, I.A.R.Astiti Asih, Wiwik Susana Rita. 2014. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Terong Belanda dalam Menghambat Peroksidasi Lemak pada Plasma Darah Tikus Wistar. *Cakra Kimia Indonesian E-Journal of Applied Chemistry*. No 1 (2) : 7-16.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.*, 82, 47-95.
- Desi, (2001). Uji Daya Anti Bakteri Ekstrak Daun Iler terhadap beberapa bakteri gram positif dan negatif. Skripsi. Universitas Pancasila.
- Fessenden, Ralph J., dan Joan S. Fessenden. 1986. *Organic Chemistry*. 3rd. Wadsworth, Inc. California.
- Aloysius Hadyana Pudjaatmaka. 1998. *Kimia Organik*. Edisi 3. Jilid 1. Erlangga. Jakarta
- Frankel, Edwin N. 2007. *Antioxidants in food and biology*. Wood Head Publishing. New Delhi
- Gordon I. 1994. *Functional Food, Food Design, Pharmafood*. Champman dan Hall. Newyork

- Gordon, M. H. 1990. *The Mechanism of Antioxidant Action in vitro*. Di dalam : Hudson, B. J. F. (ed). Food Antioxidants. Elsevier Applied Science, London
- Halliwel B, Aeschbach R., Lolinger J, Auroma O I. 1995. *Toxicology*. "J Food Chem" 33: 601.
- Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo G., Rakes D.D. 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre for Sciences and High Technology.
- Hanson. 2003. *Natural Products the Secondary Metabolites*. Cambridge : Royal Society of Chemistry.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Institut Teknologi Bandung. Bandung
- Hardiyanti, Yuniar., Djaswir Darwis., Adlis Santoni. 2013. Ekstraksi dan Uji Antioksidan Senyawa Antosianin Dari Daun Miana (*Coleus scutellarioides* L (Benth).) Serta Aplikasi Pada Minuman. *Jurnal Kimia Unand (ISSN No. 2303-3401)*, Volume 2 Nomor 2.
- Harborne JB.1996. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hernani, R.M. 2005. *Tumbuhan Berkhasiat Sebagai Antioksidan*. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Hertog, Michael G.L., Peter C.H. Hollman and Dini P. Venema. 1992. Optimization of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J. Agric. Food Chem* (40): 1591-1598
- Howard, Luke R., and Zhimin Xu. 2012. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd. Chicester.
- Jacob, R. A, and Burri. 1996. *Oxidative Damage and Defense*. Food Chem. 84, 23-28.
- Jang, H.D., Chang, K.S., Huang, C.L., Lee S.H., Su, M.S. 2007. *Principal Phenolic Phytochemical and Antioxidant Activities of Three Chinese Medicial Plants*. Food Chem. 103: 749-756.
- Jun, M.H.Y., J., Fong, X., Wan, C.S., Yang, C.T., Ho. 2003. *Camparison of Antioxidant Activities of Isoflavones Form Kudzu Root (Puerarua labata O)*. Journal Food Science Institute of Technologist. 68:2117-2122.
- Juniarti., Osmeli, D., Yuhernita. 2009. *Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (brine shrimp lethality test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl) dari Ekstrak Daun Saga (abrus precatorius L.)*. Makara, sains. 13(1):50-54.
- Kee JL., Hayes ER. 1996. Farmakologi. Jakarta: EGC
- Khopkar, S.M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Universitas Indonesia. Jakarta

- Kinho, Julianus., Diah Irawati Dwi Arini, Jafred Halawane, Lis Nurani, Halidah, Yermias Kafiar dan Moody C.Karundeng. 2011. *Tumbuhan Obat Tradisional di Sulawesi Utara Jilid II*. Balai Penelitian Kehutanan. Manado
- Koes, R.E., Quattrocchio, F. and Mol, J.N.M. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16, 123–132.
- Kubo, IN., MasuokaP, Xiao, Heraguchi. 2002. Antioxidant activity of dedocyl gallate. *J Agr Food Chem*. 50:3533-3539.
- Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. 2006. *Correlation between the in vitro antioxidant capacity and polyoohenol content of aqueous extracts form Bulgarian herbs*. *Phytother Res*. 20:961-965.
- Koffi. E., Sea, T., Dodehe, Y., Singh, B. 2010. *Effect of Solvent Type on Extraction of Polyphenols form Twenty Three Ivorian Plants*. *J Anim. Plant SCI* 5(3): 550-558.
- Lisdawati, Vivi., Daroham Mutiatikum., Sukmayanti Alegantina., Yun Astuti N. 2008. *Karakterisasi Daun Miana (Plectranthus scutellarioides Benth.) dan Buah Sirih (Piper betle L.) Secara Fisiko Kimia dari Ramuan Lokal Antimalaria Daerah Sulawesi Utara*. *Media Litbang Kesehatan Volume XVIII Nomor 4*.
- Lugasi A, Hovari J, Sagi KV, Biro L.2003. the role of antioxidant phytonutrients in prevention of diseases. *Acta Biol Szeg* 47: 119-125

- Molyneux, P. 2003. *The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Journal Science of Technology. 26(2):211-219.
- Mongkolsilp, S., Pongbupakit, I., Sae-lee, N., Sitthithaworn, W. 2004. *Radical Scavenging activity and total phenolic content of medical plants used in primary health care*. Jurnal of Pharmacy and Science. 9(1) :32-35.
- Midleton, E., Kandaswarni., Theoharis. 2000. *The Effect of Plant Flavonoids on Mamalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease & Cancer*. Pharmacological Reviews, 52 (4), 711-722.
- Molyneux, P. 2003. *The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Journal Science of Technology. 26(2):211-219.
- Molyneux P. 2004. *The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimazing antioxidant activity*. Songklanakarin J Sci Technol. 26:211-219.
- Mongkolsilp, S., Pongbupakit, I., Sae-lee, N., Sitthithaworn, W. 2004. *Radical Scavenging activity and total phenolic content of medical plants used in primary health care*. Jurnal of Pharmacy and Science. 9(1) :32-35.
- Mahesh A.R, Ranganath, Harish Kumar. 2013. *Enrichment of Flavonoids from the Methanolic Extract of Boerhaavia Diffusa Roots by Partitioning*

Technique. *Research Journal of Chemical Sciences*. 1(3):43-47

Markham, K.R. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Pr.

Marpaung, Prataya N. S., Adeanne C. Wullur, dan Paulina V. Y. Yamlean. 2014. *Uji Efektivitas Sediaan Salep Ekstrak Daun Miana (Coleus scutellarioides [L] Benth.) Untuk Pengobatan Luka yang Terinfeksi Bakteri Staphylococcus aureus pada Kelinci (Oryctolagus cuniculus)*. Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 3 No. 3

Natrij. 2004. Thin-layer chromatography. https://en.wikipedia.org/wiki/Thin-layer_chromatography. 12 September 2020 (13.11).

Nur, A.M., Astawan, M. 2011. *Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia) Dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik, Pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar*. Skripsi. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor.

Pierpoint,W.S. 2000.Why do plants make medicines. *Biochemist*. 22, 37–40.

Poedjiadi, Anna., Titin Supriyanti, dan Poedjiadi Soemodimedjo. 2009. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-Press. Depok

- Pokorny, J., Yanishlivea, N., Gordon, M. 2001. *Antioxidant in Food. Practical Applications*. Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC. England.
- Promosiana, A., N. Indartiyah, & M. P Tahir. 2007. *Peta Potensi Bioregional Tumbuhan Biofarmaka. Direktorat Budidaya Tumbuhan Sayuran dan Biofarmaka*, Dirjen Hortikultura, Deptan RI. Jakarta.
- R.A.DAY, Jr., Dan A.L. Underwood. 1981. *Analysis of Quantitative Chemistry*. 4. Prentice-Hall Inc. Emori. R. Soendoro. 1988. *Analisa Kimia Kuantitatif*. 4. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Rahmawati, Fri. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Ekstrak Daun Miana (*Colleus scutellariodes* [L] Benth). *Skripsi*. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ridwan, Y., F. Satrija , L. K. Darusman, & E. Handharyani. 2009. Efektivitas Anticestoda Ekstrak Daun Miana (*Coleus blumei* Bent) terhadap Cacing Hymenolepis microstoma pada Mencit. *Jurnal Media Peternakan IPB* Vol. 33 No. 1.
- Rohdiana, D. 2001. Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol dalam Daun Teh. *Majalah Jurnal Indonesia*, 12 (1), 53-58

- Salimi YK, Bialangi N, Saiman. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lamk.). *Akademika*. Vol.6 no.2.
- Salimi YK.; Bialangi N.; Abdulkadir W.; Parulian B. 2019. Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lamk.) Dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*. *Indo. J. Chem. Res.*, 7, 32-40.
- Sari, Ochtavia Prima., Titik Taufiqurrohmah. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Fraksi Etil Asetat Rimpang Tumbuhan Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schelecht). *Indo. J. Chem*, 2006, 6 (2), 219 - 223
- Sastrohamidjojo (1991). *Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti Cetakan Pertama*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Seigler DS. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic. Boston.
- Sholihah, M.A., Nurhanan, A.R. Wan Rosli, W.I. 2012. Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysian Zea mays hair extracts. *International Food Research Journal*. 19(4): 1533-1538.
- Sukadana, I.M. 2009. Senyawa Antibakteri Golongan Flavonoid Dari Buah Belimbing Manis (*Averrhoa*

carambola Linn.). *Jurnal. Kimia* 3 Vol. 2 Juli 2009
: 109-116 ISSN 1907-9850

Suryohudoyo, Purnomo. 2008. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas*. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair.

Tangkeallo, Christiani., Tri Dewanti Widyaningsih. 2014. Aktivitas Antioksidan Serbuk Minuman Instan Berbasis Miana. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* No 4 (Vol 2) :278-284.

Widjaja S. 1997. Antioksidan: Pertahanan Tubuh Terhadap Efek Oksidan dan Radikal Bebas. *Majalah Ilmu Fakultas Kedokteran USAKTI*. 16:1659-1672.

Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius. Yogyakarta.

Winarti, Sri. 2010. *Makanan Fungsional*. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Winarto WP. 2007. *Tumbuhan Obat Indonesia untuk Pengobatan Herba Jilid I*. Karyasari Herba Media. Jakarta.

Wonorahardjo, Surjani. 2013. *Metode-metode Pemisahan Kimia Sebuah Pengantar*. Akademia Permata. Jakarta.

Zuhra, Cut Fatimah., Juliati Br. Tarigan, dan Herlince Sihotang. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa

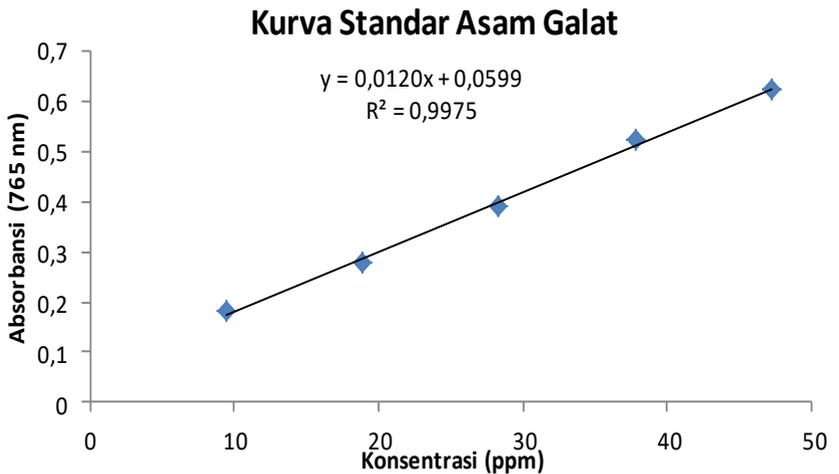
Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatera*. 1 (3):7-10.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Analisis Pengujian Kandungan Total Fenol

Tabel Data Kurva Standar Asam Galat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
9,44	0,1818
18,88	0,2767
28,32	0,3906
37,76	0,5214
47,2	0,6246



Tabel Data Hasil Analisis total Fenol

Kode	B Sampel (g)	Absorbansi	FP	Konsentrasi dari kurva standar	Total Fenol (mg/1000g)
Isolat	0,0124	0,1715	20,0	27,5000	443548,3871
	0,0124	0,1718	20,0	27,5333	444086,0215

Contoh Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Total fenol isolat (TPC)} &= \frac{c.v.f}{g} \\
 &= \\
 &= \frac{27,500 \mu\text{g/ml} \times 1 \text{ ml} \times 20}{0,0124 \text{ g}} \\
 &= 443548,3871 \mu \text{ g/g} \\
 &\text{sampel}
 \end{aligned}$$

Tabel Hasil Pengolahan Statistik Total Fenol

Anova					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1365,713	4	341,428	6556,218	,000
Within Groups	,260	5	,052		
Total	1365,974	9			

Total Fenol

Duncan

Sampel	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
n-heksan	2	12,982450				
Metanol	2		18,979150			
Metanol-air	2			21,057450		
etil asetat	2				36,218150	
Isolat	2					44,381720
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Lampiran 2. Hasil Pengolahan data Aktivitas Antioksidan

Hasil Pengolahan Statistik Aktivitas Antioksidan

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4886,268	4	1221,567	1152,657	,000
Within Groups	5,299	5	1,060		
Total	4891,567	9			

DPPH

Duncan^a

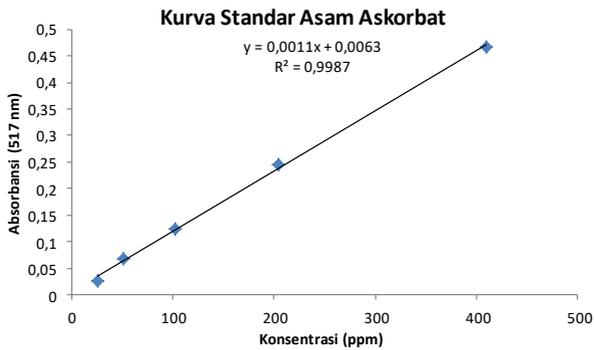
Aktivitas Antioksidan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Fraksi n-heksan	2	40,05290 0			
Fraksi Metanol-Air	2		51,54970 0		
Ekstrak Metanol	2		53,81310 0		
Fraksi etil asetat	2			84,82570 0	
Isolat	2				98,53372 4
Sig.		1,000	,079	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Tabel Data Kurva Standar Asam Askorbat

Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi yang sebenarnya (mg/ml) = x	Absorbansi Blanko	Absorbansi Standar	Abs B - Abs Std y
25	25,6	0,769	0,7423	0,0267
50	51,2	0,769	0,7016	0,0674
100	102,4	0,769	0,6442	0,1248
200	204,8	0,769	0,5231	0,2459
400	409,6	0,769	0,3024	0,4666

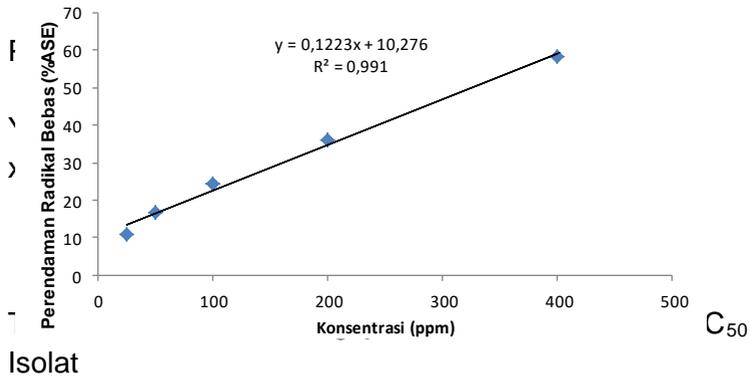


Kode	Berat (g)	Abs blanko	Abs sampel	Abs B - Abs Sampel	Aktiv Antioksidan (AAE □g)	Aktiv Antioksidan (AAE □g/g)
Isolat	0,0124	0,769	0,6283	0,1407	122,1818	98533,7243
	0,0124	0,769	0,6283	0,1407	122,1818	98533,7243

Tabel Data Hasil Analisis Aktivitas antioksidan

Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas antioksidan (AEAC } \mu\text{g/g)} &= \frac{c.V}{g} \\
 &= \frac{122,1818 \mu\text{ g/ml} \times 10 \text{ ml}}{0,0124 \text{ g}} \\
 &= 98533,7 \mu\text{ g/g} \\
 &\text{sampel}
 \end{aligned}$$

Kurva Hasil Analisis DPPH IC₅₀

Konsentrasi	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	Peredaman Radikal bebas (% ASE)
25 ppm	0,769	0,6854	10,87
50 ppm	0,769	0,6411	16,63
100 ppm	0,769	0,5814	24,40
200 ppm	0,769	0,4912	36,12
400 ppm	0,769	0,3216	58,18

FOTO PENULIS



CV PENULIS

Yuszda K Salimi. NIDN 0023037106. Dilahirkan di Gorontalo pada tanggal 23 Maret 1971. Anak pertama dari keluarga Drs. Kasiru Salimi (Alm) dan Fatmah Buluati (Alm). Pada tanggal 23 Januari 1999 menikah dengan Masrin M. Ali dan Allah SWT memberikan karunia tiga anak: Nurul Zakiah Ali (Alm), Mahirah Salsabila Ali dan Ahmad Kamaluddin Ali. Menyelesaikan sekolah di SDN 53 (1981), SMPN 2 (1986), SMAN 3 (1989) di Kota Gorontalo. Meraih gelar Sarjana Sains (S.Si) di jurusan Kimia FMIPA di Universitas Hasanuddin (1997). Sejak 1998, bekerja sebagai dosen tetap di jurusan Kimia Universitas Negeri Gorontalo (UNG). Meraih gelar Magister Sains (M.Si) di program studi Biokimia Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB) pada tahun 2005. Gelar Doktor (Dr) diraih di Ilmu Pangan IPB pada tahun 2012. Mengampu mata kuliah

Kimia Dasar, Biokimia, Kimia Bahan Makanan, Biokimia Pangan, Toksikologi dan Bioteknologi. Aktif menulis artikel di beberapa jurnal ilmiah Nasional dan Internasional. Sejak tahun 2011 melakukan penelitian yang didanai oleh hibah DRPM Kemenristekdikti seperti Hibah Doktor, Hibah Bersaing, Hibah Fundamental dan hibah PTUPT. Tak hanya meneliti, penulis juga aktif melakukan pengabdian pada masyarakat. Pernah menjabat sebagai Dekan Fakultas Sains dan Teknologi (2013-2016) dan Ketua LPPM (2016-2020) Universitas Muhammadiyah Gorontalo. Sejak tahun 2015, dipercaya sebagai tenaga ahli bidang pangan dan auditor pada Lembaga Pengkajian Pangan, Obat-obatan, dan Kosmetika (LPPOM) Majelis Ulama Indonesia Provinsi Gorontalo.