

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA METABOLIT
SEKUNDER DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN *Vitex trifolia* Linn
ASAL LOMBOK**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat
guna memperoleh gelar Sarjana Sains**



Fannisa Rahmawati

3325122128

Program Studi Kimia



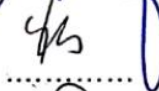
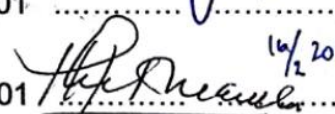



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA**

2017


LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA METABOLIT
SEKUNDER DARI FRAKSI ETIL ASETAT DAUN *Vitex trifolia* Linn
ASAL LOMBOK**

Nama : Fannisa Rahmawati
No. Registrasi : 3325122128

Nama	Tanda	Tanggal
<u>Penanggung Jawab</u>		
Dekan	<u>Prof. Dr. Suyono, M.Si</u> NIP. 19671218 199303 1 005	 16/2 2017
<u>Wakil Penanggung Jawab</u>		
Pembantu Dekan I	<u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> NIP. 19640511 198903 2 001	 16/2 2017
<u>Ketua</u>	<u>Dr. Yusmaniar, M.Si</u> NIP. 19620626 199602 2 001	 16/2 2017
<u>Sekretaris</u>	<u>Dra. Zulmanelis, M.Si</u> NIP. 19560501 198803 2 001	 16/2 2017
<u>Anggota :</u>		
Penguji	<u>Dr. Afrizal, M.Si</u> NIP. 19730416 199903 1 002	 16/2 2017
Pembimbing I	<u>Dr. Fera Kurniadewi, M.Si</u> NIP. 19761231 200112 2 002	 16/2 2017
Pembimbing II	<u>Irma R. K., M.Sc, Tech</u> NIP. 19721204 200501 2 001	 20/2 2017

Dinyatakan lulus ujian skripsi tanggal : 13 Februari 2017



“Barang siapa bertakwa kepada Allah maka Dia akan menjadikan jalan keluar baginya, dan memberinya rizki dari jalan yang tidak ia sangka, dan barang siapa yang bertawakkal kepada Allah maka cukuplah Allah baginya, Sesungguhnya Allah melaksanakan kehendak-Nya, Dia telah menjadikan untuk setiap sesuatu kadarnya” (Q.S. Ath-Thalaq: 2-3)

Alhamdulillah. Segala puji bagi Allah SWT atas segala rahmat dan nikmat yang telah diberikan kepadaku. Tiada hentinya ku bersyukur telah dihadirkan orang-orang terhebat dalam hidupku.

Kepada **Mama dan Papa**

Terima kasih berkat doa, dukungan, semangat, dan cinta yang terus-menerus dilimpahkan tanpa henti. Semoga ini menjadi awal untuk membanggakan dan membahagiakan kalian.

Terima kasih untuk **mas Dafi** dan **mba Anis, mba Nia** dan **mas Niko**,

Serta keponakanku tercinta, **Razan, Ammar**, dan **Altaf** yang selalu memberi semangat, doa dan motivasi kepadaku.

Terima kasih untuk sepupuku tersayang, **Aming**,

yang selalu berbagi cerita, memotivasi, dan menjadi kakak serta sahabat yang selalu mendukungku

dan Terima kasih untuk sanak saudara, om, tante, bude, pakde, sepupu-sepupuku semua

Untuk teman-teman seperjuangan **KIMIA 2012**

Untuk **congers.**, Fanie, Pongo, Alay dan Dinia

Yang selalu menjadi sahabat terbaik

Untuk **Afifah** dan **Baha**, yang setia menjadi partner dan senantiasa menjalani suka-duka saat penelitian

Untuk **teman-teman seperjuangan di Lab**,

yang merasakan saat-saat bersama di Lab

Terima kasih atas pelajaran hidup, canda tawa, suka-duka, kenangan dan pengalaman yang takkan pernah terlupakan

aku berharap dan doakan semoga kita semua dapat meraih mimpi dan kesuksesan. **Aamiin.**



ABSTRAK

FANNISA RAHMAWATI. Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* Linn. Asal Lombok. Skripsi. Jakarta: Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, 2017.

Penentuan struktur senyawa ditentukan berdasarkan analisis spektrum UV-Vis, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR. Pemisahan dan pemurnian telah dilakukan pada penelitian ini dengan menggunakan metode kromatografi vakum cair dan kromatografi radial dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. menghasilkan satu senyawa murni yaitu casticin. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH yang dinyatakan dalam IC₅₀. Nilai IC₅₀ senyawa casticin pada metode DPPH secara berturut-turut adalah $94,335 \times 10^6$ ppm dimana senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah.

Kata Kunci: *Vitex trifolia* Linn., aktivitas antioksidan, DPPH, casticin.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Esa atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia Linn.* asal Lombok”. Skripsi ini disusun untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelas Sarjana Sains.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tanda adanya bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini tidak mungkin dapat terselesaikan dengan baik. Untuk itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Fera Kurniadewi, M.Si. dan Irma Ratna K.,M.Sc, Tech. Selaku dosen pembimbing atas bimbingan, motivasi, dan saran dalam penulisan skripsi ini.
2. Dr. Yusmaniar, M.Si. selaku Koordinator Program Studi Kimia dan Prof. Dr. Erdawati, M.Si. selaku Pembimbing Akademik penulis yang senantiasa memberikan arahan dan saran dalam bidang akademik.
3. Dosen-dosen UNJ yang telah memberikan ilmu dan motivasi kepada penulis.
4. Laboran laboratorium kimia UNJ yang membantu penulis selama di Lab.
5. Semua pihak yang tidak bisa penulis satu persatu sebutkan.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi penyempurnaan pengetahuan penulis di masa yang akan datang. Penulis berharap skripsi ini dapat sebagai sumber ilmu pengetahuan bagi kita semua.

Jakarta, Januari 2017

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Identifikasi Masalah	3
C. Pembatasan Masalah	4
D. Perumusan Masalah	4
E. Tujuan Penelitian.....	4
F. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Genus <i>Vitex</i>	6
B. <i>Vitex trifolia</i>	7
C. Fitokimia <i>Vitex trifolia</i>	10
D. Radikal Bebas dan Antioksidan.....	13
E. Isolasi Bahan Alam.....	16
BAB III METODE PENELITIAN	20
A. Tujuan Operasional Penelitian	20
B. Tempat dan Waktu Penelitian	20
C. Metode Penelitian	20
D. Alat dan Bahan.....	21
E. Prosedur Penelitian	21
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan	26

B. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan	29
C. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	40
A. Kesimpulan	40
B. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman <i>Vitex trifolia</i>	8
Gambar 2. Tanaman <i>Vitex trifolia</i> dan Bagian-bagiannya.....	9
Gambar 3. Struktur Senyawa Flavonoid Hasil Isolasi dari Genus <i>Vitex</i> .	11
Gambar 4. Struktur Senyawa Fenolik dari <i>Vitex trifolia</i>	11
Gambar 5. Struktur Senyawa Terpenoid Hasil dari <i>Vitex trifolia</i>	12
Gambar 6. Mekanisme Vitamin C sebagai Antioksidan.....	15
Gambar 7. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi Etil Asetat	27
Gambar 8. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi I <i>V. trifolia</i> Linn	27
Gambar 9. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi I10 ₄ <i>V. trifolia</i> Linn .	28
Gambar 10. Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Senyawa Isolat Fraksi I10 ₄	29
Gambar 11. Struktur Molekul Senyawa Isolat: Casticin.....	31
Gambar 12. HMBC Senyawa Isolat: Casticin	32
Gambar 13. Struktur Molekul Senyawa Isolat: Casticin.....	34
Gambar 14. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Asam Askorbat.....	34
Gambar 15. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap BHT.....	37
Gambar 16. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Isolat ...	31
Gambar 17. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Konsentrasi pada Metode DPPH.....	37
Gambar 18. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Konsentrasi Asam Askorbat pada Metode DPPH.....	38
Gambar 19. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Konsentrasi BHT pada Metode DPPH.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Korelasi NMR ^1H - ^{13}C Isolat dalam pelarut CdCl_2	32
Tabel 2. Perbandingan Spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR Senyawa Isolat dengan Literatur.....	33
Tabel 3. Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH	36
Tabel 4. Nilai IC_{50} Larutan Standar dan Isolat dengan Metode DPPH..	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Bagan Kerja Isolasi Ekstrak Etil Asetat Daun <i>Vitex trifolia</i>	45
Lampiran 2.	Bagan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	47
Lampiran 3.	Perhitungan Pembuatan Larutan	48
Lampiran 4.	Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH.....	49
Lampiran 5.	Perhitungan Nilai IC ₅₀ pada Metode DPPH	52
Lampiran 6.	Spektrum FT-IR Senyawa Isolat.....	53
Lampiran 7.	Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Isolat.....	53
Lampiran 8.	Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Isolat	54
Lampiran 9.	Spektrum ¹ H- ¹³ C HMBC Senyawa Isolat	54
Lampiran 10.	Spektrum ¹ H- ¹³ C HSQC Senyawa Isolat	55
Lampiran 11.	Spektrum UV-Vis Senyawa Isolat.....	55

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Aktivitas masyarakat yang semakin beragam belakangan ini menyebabkan kurangnya memperhatikan pola hidup sehat, diantaranya: kebiasaan merokok, minimnya kesadaran akan bahaya terpapar polusi dari asap kendaraan, dan bahaya pembelian makanan panas dengan wadah plastik. Tanpa disadari, hal tersebut menyebabkan tubuh terancam paparan radikal bebas. Radikal bebas adalah atom maupun gugus atom atau apa saja yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan (Fessenden dan Fessenden, 1986). Kebiasaan masyarakat yang suka merokok memiliki zat-zat radikal bebas, seperti: peroksinitrit, hidrogen peroksida, dan superoksida. Radikal bebas dalam asap rokok dapat mempercepat kerusakan seluler akibat stres oksidatif. Molekul target yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein. Kandungan kimia berbahaya dalam bentuk gas ataupun volatil pada rokok menyebabkan terjadinya mutasi gen berulang kali. Selanjutnya, kombinasi mutasi gen dan kerusakan DNA menyebabkan ketidak stabilan genetik yang menyebabkan penyakit kanker.

Salah satu upaya untuk mencegah kereaktifan radikal bebas yaitu dengan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan (Winarsi, 2007). Elektron dari antioksidan akan

menjadi perlindungan terdepan dalam menghadapi senyawa radikal bebas. Radikal bebas akan menerima elektron dari antioksidan sebelum dapat merusak jaringan tubuh lebih lanjut. Banyak senyawa yang dapat bertindak sebagai antioksidan, antara lain: asam askorbat, α -tokoferol, dan β -karoten (Lobo, *et al.*, 2010).

Tubuh memiliki berbagai enzim, seperti dismutasi superoksida dan katalase yang dapat menetralkan radikal bebas agar tidak merusak sel-sel tubuh yang penting. Namun, seiring dengan seringnya masyarakat terpapar polusi disekitar menimbulkan kenaikan kadar radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas berlebih ini tidak sepenuhnya dapat diatasi oleh antioksidan di dalam tubuh, sehingga diperlukan mengonsumsi senyawa antioksidan dari makanan atau minuman. Tingginya kebutuhan antioksidan di masyarakat yang banyak polusi menyebabkan banyak perusahaan makanan dan minuman memproduksi minuman dan makanan instan yang mengandung antioksidan. Namun antioksidan yang digunakan berupa antioksidan sintetis seperti: Butilhidroksitoluen (BHT) dan butilhidroksianisol (BHA). Penggunaan antioksidan sintetis sebagai konsumsi rutin tidak baik bagi tubuh karena dapat menimbulkan efek samping. Untuk menghindari efek samping dari antioksidan sintetis, banyak dilakukan pencarian senyawa bahan alam yang dapat berperan sebagai antioksidan alami untuk dijadikan sumber antioksidan alternatif.

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan adalah tanaman dari genus *Vitex*. Kemampuan antioksidan pada

beberapa tanaman Vitex, yaitu *Vitex negundo* dan *Vitex trifolia* telah diteliti. Sifat dari pelarut ekstrak metanol berpengaruh pada pengukuran total senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan. Adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki kemampuan sebagai sumber alternatif antioksidan alami (Shah *et al.*, 2013). Hasil ini menunjukkan bahwa tanaman *V. trifolia* Linn asal Lombok memiliki potensi yang besar untuk dijadikan sebagai sumber alternatif baru penghasil senyawa antioksidan alami, namun pengetahuan kimia mengenai *V. trifolia* Linn asal Lombok ini belum lengkap, oleh karena itu penelitian ini ditujukan untuk mengisolasi metabolit sekunder dari daun *V. trifolia* Linn asal Lombok pada fraksi etil asetat dan menguji kemampuan bioaktivitasnya dengan uji antioksidan. Hasil uji antioksidan senyawa metabolit sekunder hasil isolasi *Vitex trifolia* Linn. diharapkan dapat membantu para peneliti untuk melengkapi data dalam pencarian tumbuhan sumber senyawa antioksidan alami sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik.

B. Identifikasi Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang diuraikan di atas, maka dapat diidentifikasi beberapa masalah yaitu:

1. Bagaimana mengisolasi metabolit sekunder dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok?

2. Senyawa apakah yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok?
3. Bagaimana struktur molekul senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok?
4. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok?
5. Berapa nilai IC_{50} senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok?

C. Pembatasan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada isolasi dan uji aktivitas antioksidan senyawa metabolit sekunder dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn asal Lombok.

D. Perumusan Masalah

Berdasarkan pembatasan masalah yang telah diuraikan di atas, maka masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut: “Bagaimana struktur senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn asal Lombok dan bagaimana hasil uji aktivitas antioksidan senyawa tersebut dengan metode uji penangkapan radikal DPPH ?”

E. Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi dan menentukan struktur senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn asal Lombok,
2. Mengetahui dan mendapatkan informasi tentang aktivitas antioksidan senyawa tersebut dengan metode uji penangkapan radikal DPPH.

F. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. Memberikan informasi mengenai kandungan senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn asal Lombok.
2. Memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan dari senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* yang selanjutnya dapat dijadikan sebagai sumber obat antioksidan alamiah untuk pengobatan tradisional maupun modern.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Genus *Vitex*

Vitex merupakan familia dari Verbenaceae, familia besar yang terdiri dari 1900 spesies dan 91 genus. Genus *Vitex* memiliki sekitar 250 spesies yang tersebar di daerah tropis dan subtropis (McKenna *et al.*, 2002). Genus *Vitex* ditemukan oleh Linnaeus pada tahun 1753 dengan empat spesiesnya yaitu: *V. agnus-castus*, *V. negundo*, *V. pinnata* dan *V. trifolia* (Chantaranothai, 2011). Senyawa aktif berbagai spesies *Vitex* memiliki sifat sebagai obat. Spesies ini didominasi oleh jenis pepohonan dan semaksemak (Kulkarni, 2011).

Vitex trifolia Linn merupakan tanaman semak atau pohon bersemak yang dapat tumbuh hingga ketinggian 6 meter dan tersebar luas di negara Asiapasifik seperti India, Sri Lanka, China, Filipina, Indonesia, Australia Utara, Kaledonia Baru dan French Polynesia. *Vitex agnus-castus* Linn merupakan pohon kecil atau semak yang tersebar di pesisir Anatolian. *Vitex negundo* Linn merupakan pohon yang tegak dan ramping dan dapat tumbuh mencapai ketinggian 2 hingga 5 meter dan bertumbuh secara luas di Wastelands (Meena *et al.*, 2011).

V. agnus-cactus tersebar di sekitar perairan dan tepi pantai Mediterania, Eropa bagian selatan, dan di sekitar Asia. *V. negundo* terutama tumbuh di Pakistan, India dan Sri Lanka. *V. rotundifolia*

Linn tersebar di mediterania dan Asia serta di sepanjang garis pantai dari selatan ke utara China. *V. trifolia* tersebar di negara-negara Asia. *Vitex pubescens*, *Vitex agnus-cactus*, *Vitex molis*, *Vitex pyramidata*, dan *Vitex gaumeri* diketahui memiliki aktivitas antidisentri, analgesik, anti-inflamasi, dan antitumor serta digunakan masyarakat sebagai perawatan pengobatan infeksi gastrointestinal. Sistem pengobatan kuno dari India dan Arab mengungkapkan bahwa daun dan biji dari *Vitex negundo* digunakan secara luas untuk pengobatan rematik dan inflamasi. Spesies *Vitex glabrata*, *Vitex leucoxylin*, *Vitex penduncularis*, *Vitex innata* dan *Vitex trifolia* diketahui memiliki sifat insektisida. *Vitex negundo* memiliki aktivitas *larvicidal* terhadap spesies nyamuk *Culex quinquefasciatus*, dan *Anopheles stephensi* serta digunakan untuk mencegah nyamuk *Aedes aegypti* (Rani *et al.*, 2012). Manfaat yang dimiliki oleh tumbuhan *Vitex* didukung oleh kandungan metabolit sekunder yaitu terpena, flavonoid, lignan, asam fenolik, dan antrakuinon (Yao *et al.*, 2016).

B. Vitex trifolia

Vitex trifolia merupakan famili *Verbenaceae*. Tinggi dari *Vitex trifolia* bisa mencapai 6 meter dengan empat cabang pada pohonnya. Tanaman ini biasa terlihat di tepi sungai, kolam dan saluran air. Bagian tumbuhan seperti daun dan bunga dari *Vitex trifolia* memiliki potensi pengobatan dalam sistem pengobatan di India. *Vitex trifolia* adalah semak di daerah tropis yang tersebar di sepanjang negara Asia Pasifik.

Vitex trifolia adalah salah satu dari 200 spesies genus *Vitex* yang tumbuh di daerah

tropis dan telah mengobati berbagai penyakit (Jangwan *et al.*, 2013).

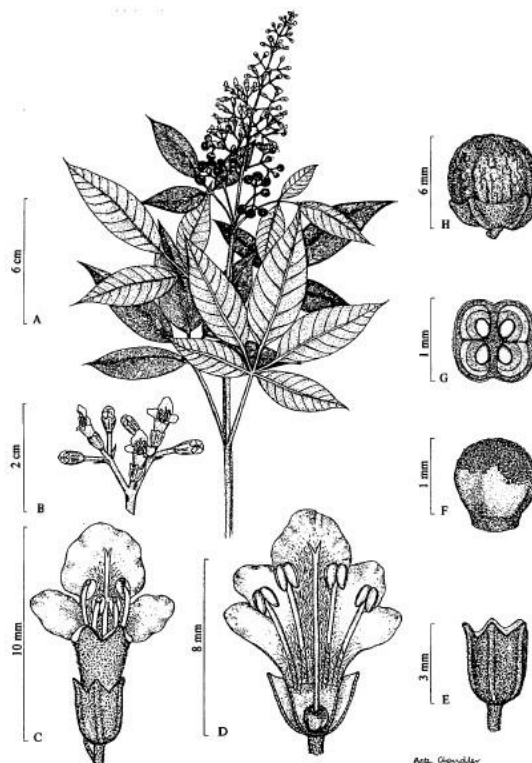
Vitex trifolia dikenal dengan nama legundi di daerah Jawa dan sudah lama oleh masyarakat digunakan sebagai obat tradisional. Rasa dari *Vitex trifolia* adalah pahit, pedas dan bersifat sejuk (Hariana, 2008).



Gambar 1. Tanaman *Vitex trifolia* (Tanobat, 2015)

Vitex trifolia memiliki ketinggian 1 hingga 4 meter dan terkadang bisa lebih tinggi tergantung lingkungannya. Mahkota daunnya berwarna lavender hingga biru, pembuluhnya berukuran sekitar 8 milimeter. Buahnya berbentuk bulat dengan diameter 4 hingga 5 milimeter (Kulkarni, 2011). *V. trifolia* tumbuh tegak dan perdu (semak), batang berambut halus. Daun majemuk menjari beranak daun tiga, bertangkai, helaian anak daun berbentuk bulat telur, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas berwarna hijau, permukaan bawah berambut rapat warna putih, panjang sekitar 4 hingga 9,5 cm, dan lebar

1,75 hingga 3,75 cm. Bunga majemuk berkumpul pada tandan, berwarna ungu muda, keluar dari ujung tangkai (Dalimartha, 2008).



Gambar 2. Tanaman *Vitex trifolia* dan Bagian-bagiannya

klasifikasi tanaman *Vitex trifolia* Linn. dapat dilihat pada data dibawah ini

(USDA, 2015).

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida

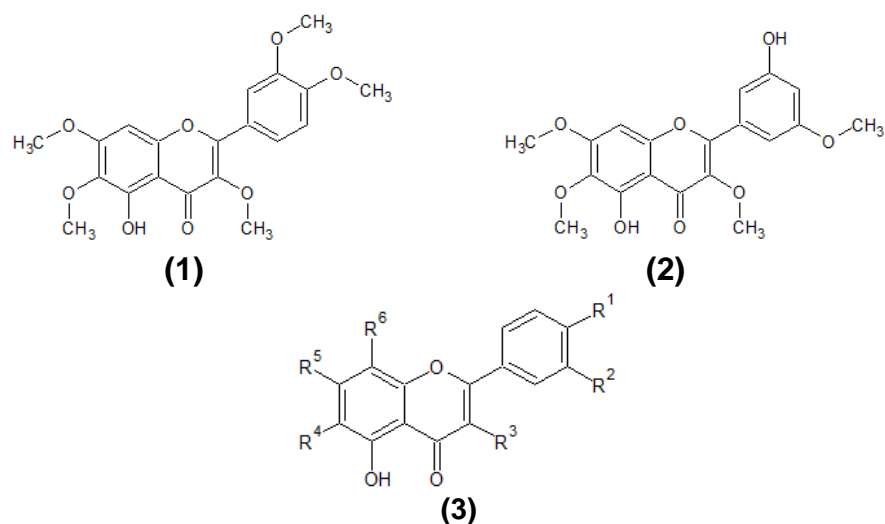
Subclass	: Asteridae
Order	: Lamiales
Family	: Verbenaceae
Genus	: <i>Vitex L.</i>
Species	: <i>Vitex trifolia L.</i>

Vitex trifolia digunakan oleh masyarakat sebagai obat anti-inflamasi dan untuk mengobati kanker di China. Buah dari *Vitex trifolia* yang memiliki sifat sebagai obat penenang dan anti-inflamasi ini telah digunakan untuk menyembuhkan sakit kepala, rematik, migrain, sakit mata, dan demam di negara-negara Asia. Buah keringnya telah lama digunakan di China dan Korea untuk menyembuhkan asma dan penyakit alergi lainnya (Chan *et al.*, 2016). *V. trifolia* juga digunakan sebagai obat influenza, demam, migren, sakit kepala, sakit gigi, sakit perut, diare, mata merah, rematik, beri-beri, dan batuk. Akar legundi mempunyai efek farmakologis mencegah kehamilan dan perawatan setelah bersalin. Bijinya untuk obat pereda nyeri, penyegar badan dan perawatan rambut. Buah *V. trifolia* digunakan untuk obat cacing dan peluruh haid. Sementara daunnya untuk analgesik, obat luka, dan menormalkan siklus haid (Hariana, 2008).

C. Fitokimia *Vitex trifolia*

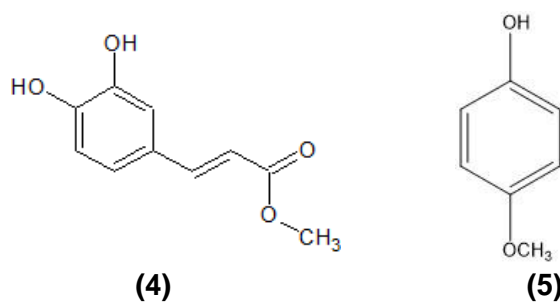
Tumbuhan Genus *Vitex* merupakan salah satu dari banyak genus yang memiliki khasiat dan sudah banyak digunakan oleh masyarakat

sebagai obat tradisional karena efek farmakologis yang dimilikinya. Variasi senyawa metabolit sekunder yang dimiliki juga dapat dilihat pada penelitian sebelumnya yang berhasil mengisolasi beberapa senyawa seperti flavonoid, fenolik dan terpenoid. Walaupun jumlah senyawa metabolit sekunder tidak sebanyak senyawa metabolit primer namun senyawa metabolit sekunder memiliki peranan yang sangat penting untuk tumbuhan.



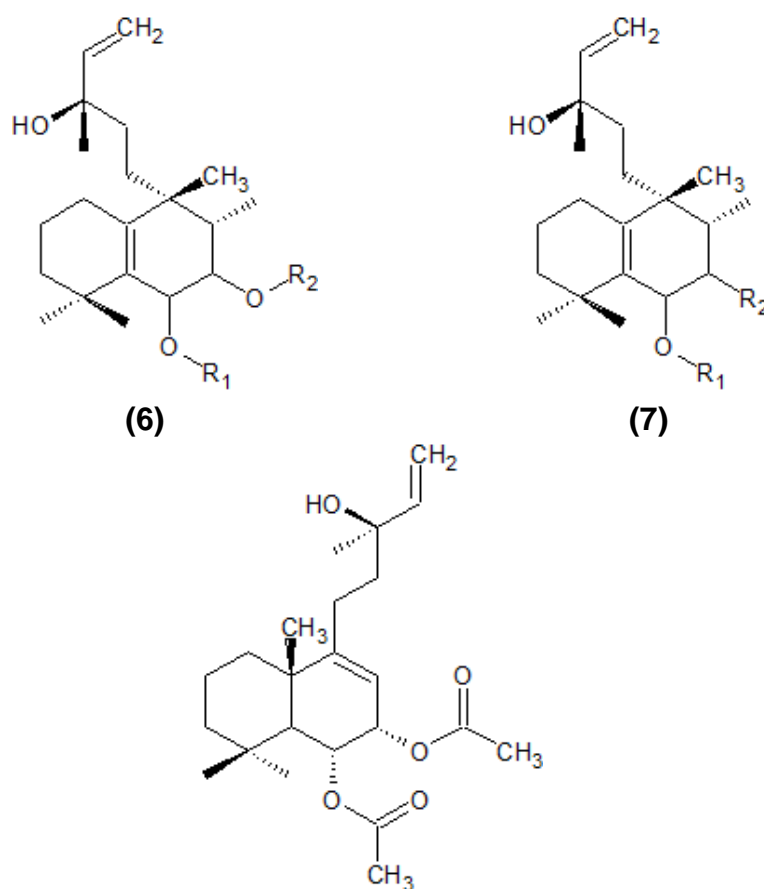
Gambar 3. Struktur Senyawa Flavonoid Hasil Isolasi dari *Vitex trifolia* (Xin Li *et al.*, 2005) (Ganapaty *et al.*, 2005) (El-Kousy *et al.*, 2012) Senyawa flavonoid yang telah diisolasi adalah Artemetin **(1)** (Xin Li *et al.*, 2005); Casticin **(2)** yang diisolasi dari buah (Ganapaty *et al.*, 2005); dan Luteolin-7-O-β- gluKuronopiranosida **(3)** (El-Kousy *et al.*, 2012).

Senyawa flavonoid yang telah diisolasi dari *Vitex trifolia* dapat dilihat pada gambar 3. Senyawa flavonoid telah diisolasi dari daun, buah, dan pucuk daun dari *Vitex trifolia*.



Gambar 4. Struktur Senyawa Fenolik Hasil Isolasi dari *Vitex trifolia* (El-Kousy *et al.*, 2012) (Kannatha-san *et al.*, 2011) Senyawa fenolik yang telah diisolasi adalah E-metil kafeat (4) (ElKousy *et al.*, 2012); dan Metil-p-hidroksibenzoat (5) yang diisolasi bagian daunnya (Kannatha-san *et al.*, 2011).

Senyawa fenolik yang telah diisolasi dari *Vitex trifolia* dapat dilihat pada gambar 4. Bagian pohon yang telah diisolasi adalah daun dari *Vitex trifolia*.



(8)

Gambar 5. Struktur Senyawa Terpenoid Hasil Isolasi dari *Vitex trifolia* (Kiuchi *et al.*, 2004) (Tiwari *et al.*, 2013). Senyawa terpenoid yang telah diisolasi adalah Vitetrifolin D (**6**); Vitetrifolin E (**7**) yang diisolasi pada bagian buah (Kiuchi *et al.*, 2004); dan 6 α ,7 α -diasetoksi-13-hidroksi-8(9),14-labdadien (**8**) yang diisolasi bagian daunnya (Tiwari *et al.*, 2013).

Senyawa fenolik yang telah diisolasi dari *Vitex trifolia* dapat dilihat pada gambar 5. Bagian dari *Vitex trifolia* yang telah diisolasi adalah daun dan buahnya.

D. Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan (Fessenden dan Fessenden, 1986). Radikal bebas juga bertujuan untuk menjadi perantara pada proses alami yang melibatkan sitotoksitas, kontrol *vascular tone* dan neurotransmisi. Elektron bebas yang berada pada radikal bebas menyebabkan molekulnya menjadi sangat reaktif, sangat tidak stabil dan bereaksi cepat dengan senyawa lain, sehingga radikal bebas mengambil elektron yang dibutuhkan dari senyawa lain untuk mencapai kestabilan menyebabkan terjadinya proses reaksi berantai dan, akan menghasilkan gangguan pada sel yang hidup. Efek merugikan dari spesi oksigen reaktif pada sel menyebabkan kerusakan pada DNA, lipid, asam amino dan lain-lain yang dapat menyebabkan kanker, alzheimer, agal ginjal dan lain-lain (Sarma *et al.*, 2010).

Di dalam tubuh manusia, terdapat beberapa contoh dari radikal bebas diantaranya adalah superoksida (O_2^-) yang dihasilkan di mitokondria dan sistem kardiovaskular dan memiliki paruh waktu 10^{-4} detik, radikal hidroksi (OH^\cdot) yang sangat reaktif dan dihasilkan saat produksi iron berlebih, hidrogen peroksida (H_2O_2) yang terbentuk didalam tubuh karena jumlah reaksi yang besar, peroksil radikal (ROO^\cdot) yang reaktif dan dibentuk di lipid, protein, dan DNA, hidroperoksida ($ROOH$) dengan paruh waktu yang stabil, oksigen (1O_2) yang sangat reaktif; ozon (O_3) terbentuk sebagai polutan dan dapat berbagai molekul menghasilkan singlet oksigen 1O_2 , nitrit oksida (NO^\cdot), peroksinitrit ($ONOO^\cdot$) terbentuk dari NO^\cdot dan superoksida dan sangat reaktif, nitrogen dioksida (NO_2) terbentuk saat polusi terbentuk (Devasagayam *et al.*, 2004).

Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, dan karbohidrat. Secara umum, tahapan reaksi pembentukan radikal bebas melalui 3 tahapan reaksi berikut,

a. tahap inisiasi (awal pembentukan radikal bebas),



b. tahap propagasi (pemanjangan rantai radikal),



c. tahap terminasi (bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal, sehingga potensi propagasinya rendah).



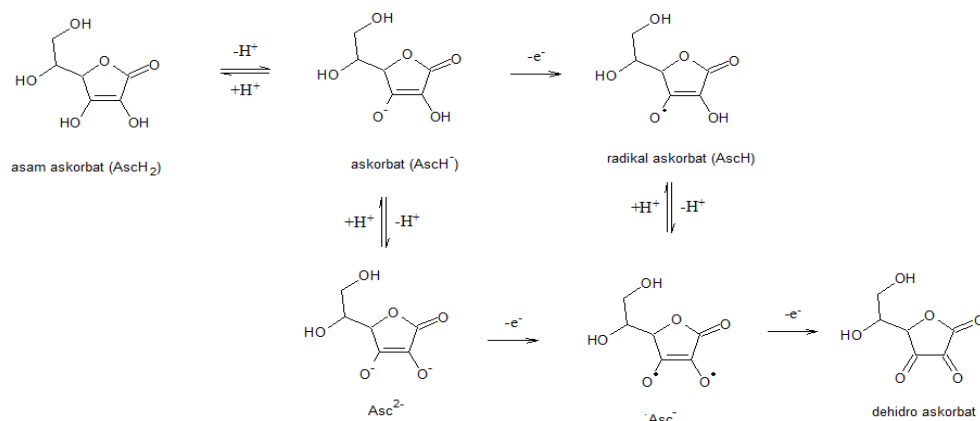
Tanpa disadari, dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus menerus, baik dalam proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok, dan lain-lain. Oleh sebab itu, tubuh memerlukan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya (Winarsi, 2007).

Antioksidan berfungsi untuk menekan jumlah radikal bebas, memungkinkan radikal bebas untuk melakukan fungsinya yang berguna tanpa menghasilkan banyak kerusakan. Namun beberapa kerusakan tidak

dapat dihindari dan membutuhkan sistem perbaikan untuk menjaga sel hidup dan utuh (Lone *et al.*, 2013). Antioksidan mampu untuk menstabilkan atau mendeaktivasi radikal bebas sebelum menyerang sel (Percival, 1998).

Antioksidan primer memiliki sifat sebagai pemutus reaksi berantai (*chain breaking antioxidant*) dan bekerja untuk mencegah pembentukan senyawa radikal baru. Antioksidan primer bereaksi dengan radikal-

radikal lipid dan mengubahnya menjadi produk-produk yang lebih stabil. Antioksidan mengikuti mekanisme pemutusan rantai reaksi radikal dengan mendonorkan atom hidrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal, produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk awal (Sayuti dan Yenrina, 2015).



Gambar 6. Mekanisme Vitamin C sebagai Antioksidan (Huber *et al.*, 2007)

Antioksidan sekunder berperan sebagai pengikat ion-ion logam, penangkap oksigen, pengurai hidroperoksida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi singlet oksigen. Antioksidan sekunder bekerja dengan cara mengkelat logam yang bertindak sebagai pro-oksidan, menangkap radikal dan mencegah terjadinya reaksi berantai

Antioksidan tersier berperan untuk memperbaiki kerusakan bimolekul yang disebabkan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfida reduktase (Sayuti dan Yenrina, 2015).

E. Isolasi Bahan Alam

Isolasi senyawa kimia dari bahan alam adalah metode memisahkan senyawa yang bercampur sehingga menghasilkan senyawa tunggal yang murni. Tumbuhan mengandung ribuan senyawa yang dikategorikan sebagai metabolit primer dan metabolit sekunder. Biasanya proses isolasi senyawa dari bahan alami menargetkan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder, karena senyawa metabolit sekunder diyakini dan telah diteliti dapat memberikan manfaat bagi kehidupan manusia. Antara lain manfaatnya dalam bidang pertanian, kesehatan dan pangan. Salah satu genus yang sudah banyak diisolasi adalah *Vitex*.

Tanaman *Vitex* dapat diisolasi dengan berbagai cara menggunakan teknik kromatografi. Pada penelitian ini, *Vitex trifolia* diisolasi dengan kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi sentrifugal. Sebelum memulai kromatografi vakum cair, terlebih dahulu ditentukan eluen menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah sebuah metode dari kromatografi cair dimana sampel ditotolkan sebagai titik kecil atau goresan dibatas pada gelas, plastik atau piring logam. Fasa gerak bergerak pada fasa diam dengan cara kapiler yang terkadang didukung oleh gravitasi atau tekanan. Pemisahan KLT dilakukan ditempat terbuka dengan masing-masing komponen memiliki waktu jumlah migrasi yang sama namun dengan jarak migrasi yang berbeda. Fasa gerak pada KLT memiliki satu

pelarut atau pelarut campuran organik atau pelarut aqueous. KLT memiliki keuntungan lebih dibanding kromatografi kertas, dimana hasilnya lebih bagus dan pemisahannya lebih efisien karena ukuran partikelnya lebih kecil pada fasa diam (The Royal Society of Chemistry, 2015).

Setelah eluen sudah ditentukan, kemudian dilakukan KVC. . Penggunaan KVC memungkinkan pemisahan secara bertahap. Kelebihannya adalah lebih cepat, menggunakan sedikit pelarut, sedikit silika, dan lebih baik dibanding kromatografi cahaya. Semua pelarut bisa digunakan untuk KVC. Pelarut sangat polar bisa digunakan, termasuk metanol dan air, karena kolom nya kering sehingga apabila ada perubahan dalam polaritas tidak akan menyebabkan silika pecah didalam kolom (Tortzen, 2008). Pengelusian dilakukan secara SGP (Step Gradient Polarity) yaitu dengan cara meningkatkan kepolaran pelarut.

Kromatografi vakum cair dilakukan hingga elusi selesai. fraksi hasil KVC kemudian ditampung dan dilakukan pemisahan lanjutan dengan cara kromatografi sentrifugal. Kromatografi sentrifugal merupakan teknik kromatografi cair-cair. Contoh yang biasa digunakan adalah kromatotron. Fasa cair dari sistem dua fasa digunakan sebagai fasa diam larutan yang dimasukkan ke kolom ketika yang dibelakang berputar saat kecepatan rotasi cukup. Fasa diam menahan rotor/kolom yang ada didalam oleh gaya sentrifugal yang dihasilkan. Fasa kedua dari system dua fasa digunakan sebagai fasa gerak mengandung larutan

yang diekstraksi. Fasa gerak dimasukkan dibawah tekanan kedalam rotor dan dipompa ke fasa diam.

Dua fasa dicampur bersama, dimana saat itu pertukaran molekul diantara dua fasa terjadi. Pemisahan larutan mencapai sebagai fungsi spesifik koefisien partisi dari setiap larutan diantara fasa diam dan fasa gerak. Fasa gerak kemudian tertuang disetiap aliran sel yang masuk ke sel selanjutnya. Fraksi elusi dari fasa diam dan fasa gerak dikumpulkan selama beberapa selang waktu, dari beberapa menit hingga beberapa jam. Fraksi ini atau elusi ini mengandung larutan yang murni (Kromaton, 2015).

Sampel yang sudah diisolasi kemudian di uji dengan KLT, apabila terdapat spot tunggal, maka senyawa hasil isolasi sudah murni. Untuk memastikan apakah senyawa sudah murni kemudian dilakukan uji KLT kembali dengan variasi eluen. Jika senyawa telah murni, senyawa tersebut diuji karakterisasi dengan spektroskopi UV, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$.

Selain KLT, terdapat metode lain untuk melakukan isolasi tanaman, salah satunya adalah *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC). HPTLC adalah bentuk lain dari kromatografi lapis tipis yang memiliki kemampuan memisahkan dengan pelapis yang optimal, prosedur baru dalam fase diam, peningkatan aplikasi pada sampel. HPTLC mengembangkan efisiensi pemisahan tingkat tinggi, waktu analisis yang

singkat, jumlah penggunaan fasa diam yang sedikit, dan efisiensi proses perolehan data (Variyar et al., 2011).

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tujuan Operasional Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn dan melakukan uji aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi dengan metode DPPH.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia FMIPA UNJ Jakarta Timur, yang dilakukan mulai Januari 2016 sampai Desember 2016.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi metode eksplorasi yang meliputi: ekstraksi dan partisi fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn dengan berbagai teknik kromatografi, antara lain kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi lapis tipis (KLT). Senyawa murni yang diperoleh ditentukan struktur molekulnya dengan spektroskopi UV, FT-IR, ¹H-NMR, dan ¹³C -NMR, lalu diuji aktivitas antioksidannya dengan metode penangkapan radikal DPPH.

D. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan, neraca analitik, peralatan Kromatografi Vakum Cair (KVC), alat penguap vakum putar/*rotary evaporator* (EYELA USA N-1001S-WD, Cat Num 216959), *magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS 7), 21lampu UV, peralatan kromatografi lapis tipis. Instrumen yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, UV Biospec-1601), Spektrometer Inframerah (SPECTRUM ONE Perkin Elmer FTIR), Spektrometer ¹H-NMR (JEOL JMN A5000, 500 MHz) dan ¹³C-NMR (JEOL JMN A5000, 125 MHz) di Institut Teknologi Bandung,

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat daun *V. trifolia* Linn yang diperoleh dari penelitian Elsafira Arivianti dengan massa total 18,7526 gram. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbagai pelarut dengan kualifikasi teknis yang telah didistilasi (*n*-heksana, aseton, dan etil asetat), dan silika gel (Merck Cat. Num 105553) sebagai fasa diam dalam kromatografi. Uji aktivitas antioksidan menggunakan reagen 1,1-difenil-pikrilhidrazil, asam askorbat (Merck milipore Cat. Num 1531) dan BHT (Brataco Chem).

E. Prosedur penelitian

1. Tahap Isolasi dan Pemurnian

Fraksi etil asetat dipisahkan dengan beberapa tahap kromatografi

a. Penentuan Eluen

Penentuan eluen dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Fasa diam yang digunakan yaitu silika gel. Plat silika dipotong yaitu berukuran 5x5 cm dan dibuat garis atas dan bawah masing-masing memiliki jarak sebesar 0,5 cm dari tepi plat. Sampel ditotolkan dengan pipa kapiler berdiameter $\pm 0,5$ mm - 1 mm. Setelah itu plat KLT dimasukkan dalam chamber, dengan tinggi pelarut tidak melewati batas bawah plat KLT. Plat dimasukkan dalam chamber dan dibiarkan beberapa saat. Setelah mencapai batas atas, plat KLT diambil dan dikeringkan. Hasil plat tersebut dilihat dibawah lampu UV.

b. Pemisahan Fraksi

Pemisahan fraksi Etil Asetat (EtOAc) dilakukan dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC) menggunakan fasa diam yang berupa silika gel serta fasa gerak berupa campuran n-heksana, kloroform dan etil asetat hasil dari penentuan eluen yang telah dilakukan. Kolom kromatografi diisi dengan silika gel yang telah disuspensikan dengan eluen sedikit demi sedikit ke dalam kolom agar diperoleh lapisan homogen. Eluen dibiarkan mengalir sehingga silika gel di dalam kolom menjadi padat dan rata permukaannya. Pembuatan kolom ini dilakukan dengan hati-hati agar tidak ada udara yang mengisi celah-celah silika. Silika gel

harus tetap terendam oleh pelarut ketika sampel dimasukkan sampai pemisahan selesai. Fraksi aktif yang diperoleh melalui uji sebelumnya dimasukkan ke dalam kolom, kemudian eluen dialirkan. Pengelusian dilakukan secara SGP (Step Gradient Polarity) yaitu dengan cara meningkatkan kepolaran pelarut. Masing-masing fraksi ditampung dalam botol berukuran ± 50 mL, kemudian dimonitoring dengan KLT.

c. Pemurnian Fraksi

Tahap pemurnian fraksi dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi radial. Kromatografi radial menggunakan alat kromatotron. Pelat ini dipasang pada poros motor listrik dan diputar pada kecepatan 800 rpm. Pelarut atau eluen dimasukkan ke bagian tengah pelat yang tidak dilapisi adsorben melalui pompa yang mampu mengalirkan 1-10 mL pelarut per menit dan merambat melalui lapis tipis karena gaya sentrifugal. Dengan demikian rotor dicuci untuk menghilangkan pencemar yang terdapat dalam adsorben. Kemudian sampel dimasukkan dan dilakukan elusi dengan menggunakan pelarut yang sama sampai proses elusi selesai atau menggunakan pelarut yang kepolarannya dinaikkan secara gradien dengan laju sekitar 3-6 mL per menit. Proses elusi akan menghasilkan pita-pita yang berupa lingkaran. Pada tepi pelat pita-pita akan terputar keluar dan ditampung dalam tabung penampung, kemudian dianalisis lebih lanjut.

2. Tahap identifikasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan data spektroskopi Infra Red (IR), dan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (^1H NMR dan ^{13}C NMR).

3. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil pikrihidrazil). Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi kloroform daun *Vitex trifolia* Linn dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian dibuat konsentrasi bervariasi yaitu 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing 1 mL larutan uji ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol. Setiap campuran dikocok lalu disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi masing-masing sampel diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Perlakuan yang sama juga dilakukan terhadap asam askorbat dan BHT sebagai kontrol positif, sedangkan untuk kontrol merupakan campuran metanol tanpa sampel dengan DPPH. Data aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi DPPH tanpa sampel dan absorbansi sampel merupakan nilai absorbansi DPPH yang ditambah sampel. Data yang diperoleh dinyatakan dalam tabel.

4. Nilai IC_{50}

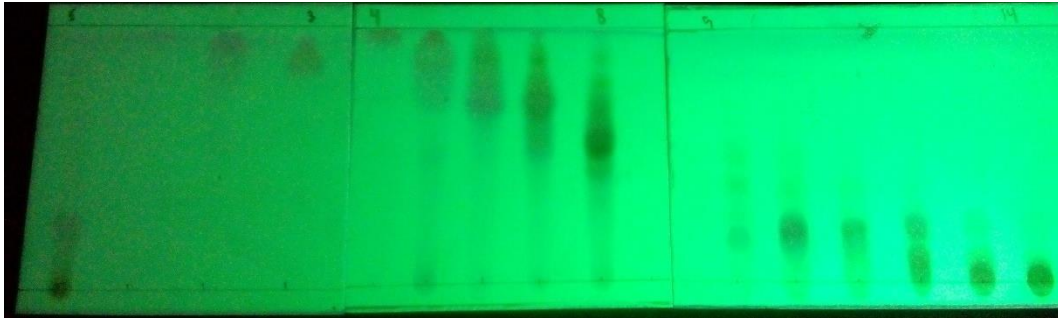
Setelah persen aktivitas antioksidannya diperoleh, selanjutnya ditentukan nilai IC_{50} pada semua sistem. Nilai IC_{50} dapat diketahui dengan membuat grafik hubungan antara konsentrasi dengan persen aktivitas antioksidan, dimana Log konsentrasi (ppm) sebagai sumbu x dan persen aktivitas antioksidan (%) sebagai sumbu y. Nilai IC_{50} yaitu konsentrasi dimana aktivitas antioksidannya bernilai 50%, dapat ditentukan berdasarkan grafik dengan menggunakan program interactive Chart Design Data VBA (Add-In Software For Microsoft Excel 2013)

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Tahap Isolasi dan Pemurnian

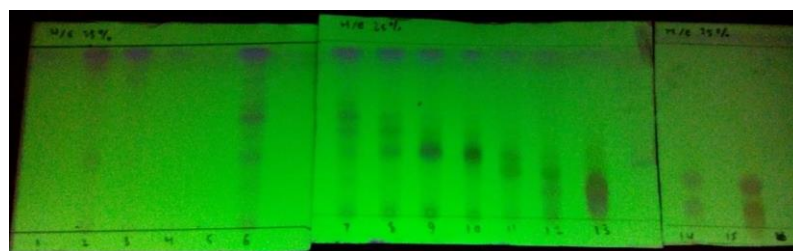
Penelitian ini diawali dengan fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn yang dipisahkan dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC). Fasa diam yang digunakan pada KVC adalah silika gel, sedangkan fasa geraknya adalah eluen n-heksana-etil asetat. Proses elusi dilakukan secara *Step Gradient Polarity* (SGP) dimulai dari campuran eluen yang bersifat non-polar yaitu n-heksana:etil asetat (H/E) dengan perbandingan (9:1) yang diulang sebanyak tiga kali elusi, (8:2) dua kali elusi, (7:3) dua kali elusi, (6:4) dua kali elusi, (1:1) dua kali elusi, dan (3:7) tiga kali elusi. Total jumlah fraksi yang diperoleh adalah 14 fraksi utama yaitu fraksi 1 (10 mg); 2 (274,3 mg); 3 (434,5 mg); 4 (484,7 mg); 5 (687,3 mg); 6 (360,1 mg); 7 (616,9 mg); 8 (513,4 mg); 9 (600,9 mg); 10 (632,3 mg); 11 (754,6 mg); 12 (565,1 mg); 13 (493,5 mg); 14 (200,5 mg). Hasil pemisahan diamati menggunakan KLT dengan eluen H/E:7/3 ditampilkan pada gambar 8. Fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan nilai R_f selanjutnya digabungkan sehingga total akhir diperoleh 9 fraksi, yaitu A (10 mg); B (274,3 mg); C (434,5 mg); D (484,7 mg); E (687,3 mg); F (892 mg); G (513,4 mg); H (1,2092 g); I (1,171 g). Serbuk terbentuk pada fraksi I sehingga dilakukan pemisahan lebih lanjut pada fraksi I tersebut.



Gambar 7. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi Etil Asetat *V. trifolia* Linn.

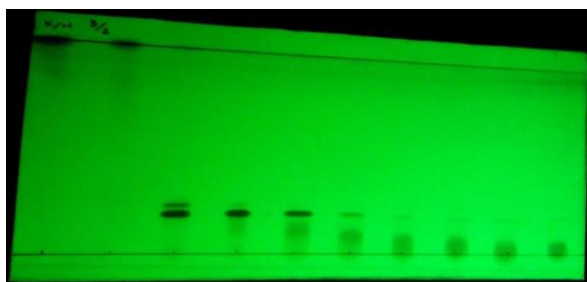
1. Pemisahan fraksi I

Fraksi I (1,171 g) selanjutnya dipisahkan kembali dengan teknik KVC menggunakan eluen H/E yang ditingkatkan kepolarannya secara perlahan dimulai dari perbandingan (9:1) tiga kali elusi, (8,5:1,5) dua kali elusi, (8:2) dua kali elusi, (7,5:2,5) tiga kali elusi, (7:3) tiga kali elusi, dan (1:1) dua kali elusi sehingga diperoleh 15 fraksi yaitu fraksi I1 (18,1 mg); I2 (5,6 mg); I3 (15,8 mg); I4(19,4 mg); I5 (15,3 mg); I6 (15,3 mg); I7 (17,8 mg); I8 (11,6 mg); I9 (15,1 mg); I10 (23,9 mg); I11 (27 mg); I12 (16,5 mg); I13 (556 mg); I14 (276,7 mg); I15 (276,7 mg). Hasil pemisahan diamati dengan KLT dengan eluen H/E:7/3 ditampilkan pada gambar. Fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan nilai Rf selanjutnya digabungkan sehingga total akhir diperoleh 10 fraksi, yaitu I1 (18,1 mg); I2 (21,4 mg); I3 (19,4 mg); I4 (15,3 mg); I5 (44,7 mg); I6 (39 mg); I7 (27 mg); I8 (16,5 mg); I9 (55,6 mg); I10 (386,9 mg).



Gambar 8. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi I *V. trifolia* Linn
2. Pemisahan Fraksi I10

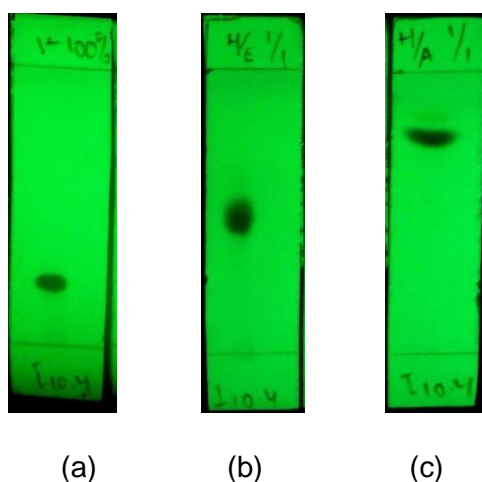
Fraksi I10 (386,9 mg) selanjutnya dipisahkan kembali dengan teknik KVC menggunakan eluen n-heksana:kloroform (H/K) yang kepolarannya ditingkatkan secara perlahan dimulai dari perbandingan (3:7) tiga kali elusi, n-heksana:kloroform (2:8) tiga kali elusi, kloroform 100% empat kali elusi sehingga diperoleh 10 fraksi yaitu fraksi I10₁ (25 mg); I10₂ (20,8 mg); I10₃ (41,3 mg); I10₄ (62,6 mg); I10₅ (20,2 mg); I10₆ (30,4 mg); I10₇ (35,5 mg); I10₈ (36,9 mg); I10₉ (40,2 mg); I10₁₀ (31,4 mg). Hasil pemisahan diamati dengan KLT dengan eluen H/K:2/8 ditampilkan pada gambar10. Fraksi-fraksi yang memiliki kesamaan nilai Rf selanjutnya digabungkan sehingga total akhir diperoleh 10 fraksi, yaitu fraksi I10₁ (25 mg); I10₂ (20,8 mg); I10₃ (41,3 mg); I10₄ (75,9 mg); I10₅ (30,4 mg); I10₆ (35,5 mg); I10₇ (36,9 mg); I10₈ (40,2 mg); I10₉ (31,4 mg). Fraksi I10₄ selanjutnya dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial.



Gambar 9. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi I10₄ *V. trifolia* Linn

3. Pemisahan Fraksi I10₄

Fraksi I10₄ (142,2 mg) dipisahkan menggunakan eluen kloroform:nheksana (K/H) (7:3). Hasil kromatogram ditunjukkan pada gambar 12. Fraksi I10₄ telah didapatkan spot tunggal, sehingga untuk memastikannya dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan sistem 3 eluen pada fraksi I10₄. Fraksi I10₄ diuji dengan eluen, kloroform 100%, n-heksana:etil asetat dan n-heksana:aseton.



Gambar 10. Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Senyawa Isolat Fraksi I10₄ dengan eluen (a) Kloroform 100%, (b) nHeksana:Etil Asetat (1:1), dan (c) n- Heksana:Aseton (1:1)

B. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan

Pemisahan terhadap fraksi Etil Asetat daun *Vitex trifolia* Linn. dilakukan dengan teknik kromatografi Vakum Cair (KVC) dan kromatografi radial (kromatotron) menggunakan eluen tertentu sehingga didapat satu isolat murni. Penentuan struktur terhadap senyawa hasil isolasi ditentukan dengan menganalisa data spektroskopi UV-Vis, spektroskopi infra merah (IR), ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR.

Senyawa Isolat yang diperoleh berupa serbuk berwarna hijau tua. Berdasarkan hasil spektrum IR (KBr) senyawa isolat menunjukkan

regangan gugus -OH yang mengalami ikatan hidrogen dengan -C=O ($V_{\text{max}} 3439,08 \text{ cm}^{-1}$), gugus -C-H aromatik ($V_{\text{max}} 2924,09 \text{ cm}^{-1}$), gugus -C=C alkena ($1653,00 \text{ cm}^{-1}$), gugus -C=C aromatik ($V_{\text{max}} 1593,20 \text{ cm}^{-1}$ dan $1473,62 \text{ cm}^{-1}$), gugus -C-O ($1274,95 \text{ cm}^{-1}$).

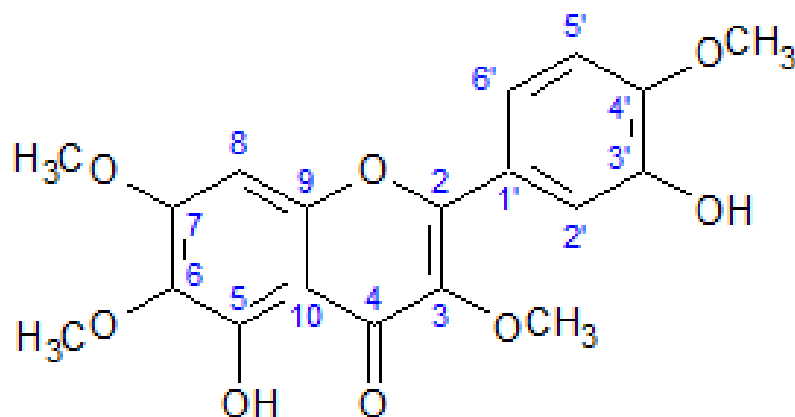
Penentuan struktur isolat dianalisis dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Gugus metoksi (-OCH_3) ditandai adanya empat sinyal proton singlet (3H) pada $\delta_{\text{H}} 3,86 \text{ ppm}$ (3H, s); $\delta_{\text{H}} 3,91 \text{ ppm}$ (3H, s); $\delta_{\text{H}} 3,94 \text{ ppm}$ (3H, s); dan $\delta_{\text{H}} 3,97 \text{ ppm}$ (3H, s), kemudian dari data $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan adanya sinyal proton yang menunjukkan struktur cincin aromatik dengan sistem ABX pada $\delta_{\text{H}} 6,95 \text{ ppm}$ (1H, *d*, $J = 8,6 \text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}} 7,69 \text{ ppm}$ (1H, *dd*, $J = 8,5 \text{ Hz}$ dan $J = 2,25 \text{ Hz}$), dan $\delta_{\text{H}} 7,67 \text{ ppm}$ (1H, *d*, $J = 2,25 \text{ Hz}$). Hal ini mengarah pada cincin B flavonoid terdapat dua substituen. Substituen yang terikat pada cincin B ditentukan berdasarkan analisis data HMBC (Hetero Multiple Bond Connectivity) dimana gugus OH menunjukkan adanya korelasi H dengan gugus OH pada C-3' yang memiliki korelasi dengan C-2' dan C-4', sehingga dari data tersebut menunjukkan adanya sinyal metoksi yang terikat pada C-4'.

Dua substituen metoksi lainnya terikat pada cincin A flavonoid. Hal ini ditunjukkan dari data HMBC bahwa sinyal proton δ_{H} (1H,s) berkorelasi dengan C-6 dan C-7. Sedangkan substituen OH terikat pada C-5 dilihat dari pergeseran kimia H dari sinyal OH $12,94 \text{ ppm}$ (1H, s) dimana sinyal tersebut khas untuk proton dari gugus OH yang melakukan ikatan hidrogen dengan gugus karbonil. Hasil analisis menggunakan data dari

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) mengkonfirmasi pergeseran kimia masing-masing sinyal proton dan karbon.

Data spektrum UV pada panjang gelombang 354 nm dan 255 nm menunjukkan bahwa senyawa isolat merupakan senyawa turunan flavonoid dengan jumlah atom karbon 19 yang diperoleh dari data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$, maka dapat diperkirakan terdapat empat substituen metoksi pada kerangka flavonoid, empat metin dan sebelas karbon kuartener. Empat karbon metoksi pada δ_{C} 148,91 ppm (posisi C-4'); δ_{C} 158,88 ppm (posisi C-7); δ_{C} 132,32 ppm (posisi C-6); dan δ_{C} 139,08 ppm (posisi C-3). Sinyal karbon metin pada δ_{C} 90,46 ppm (posisi C-8); δ_{C} 110,49 ppm (posisi C-2'); δ_{C} 114,44 ppm (posisi C-5') dan δ_{C} 121,68 ppm (posisi C-6'). Sinyal karbon kuartener pada δ_{C} 123,64 ppm (posisi C-1'); δ_{C} 132,32 ppm (posisi C-6); δ_{C} 139,08 ppm (posisi C-3); δ_{C} 145,64 (posisi C-3'); δ_{C} 148,91 (posisi C-4'); δ_{C} 152,43 ppm (posisi C-2); δ_{C} 152,80 ppm (posisi C-5); δ_{C} 155,76 ppm (posisi C-9); δ_{C} 158,88 ppm (posisi C-7); dan δ_{C} 179,06 ppm (posisi C-4).

Berdasarkan data analisis yang ada, maka struktur senyawa isolat diduga merupakan 3',5'-dihidroksi-3,4',6,7-tetrametoksiflavon atau casticin.

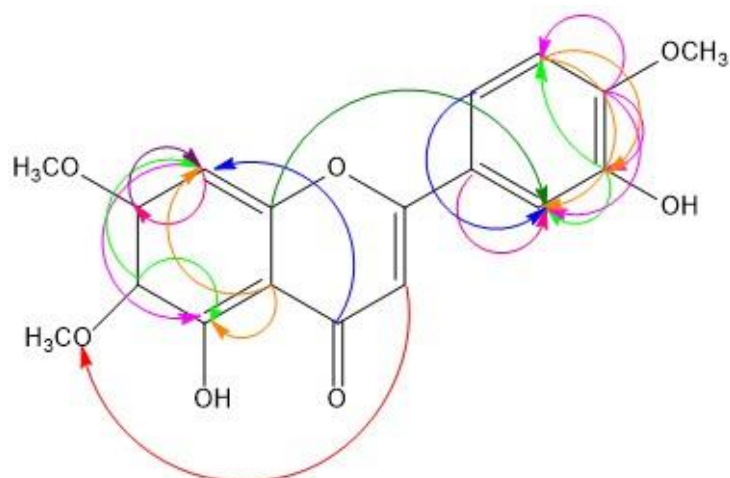


Gambar 11. struktur Molekul Senyawa Isolat: Casticin

Tabel 1. Korelasi NMR ^1H - ^{13}C Isolat dalam pelarut CdCl_3

Posisi	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	HMBC (^1H - ^{13}C)
2	-	152,43	-
3	-	139,08	C-6
4	-	179,06	C-8
5	12,59	152,80	C-5, C-8
6	-	132,32	C-5, C-6, C-8
7	-	158,88	C-7, C-8
8	6,49	90,46	C-7, C-8
9	-	155,76	C-2'
10	-	106,68	C-5, C-8
1'	-	123,64	C-2'
2'	-	110,49	-
3'	5,79	145,64	C-2', C-3', C-5'
4'	-	148,91	C-2', C-3', C-5'
5'	-	114,44	C-2', C-3', C-5'
6'	-	121,68	C-2'

Dugaan senyawa tersebut adalah casticin kemudian diperkuat dengan dilakukannya perbandingan data ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR senyawa hasil isolasi dengan literatur.



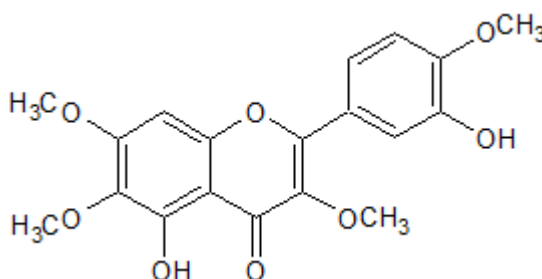
Gambar 12. HMBC Senyawa Isolat: Casticin

Tabel 2. Perbandingan Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Isolat dengan Literatur

Posisi	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$	
	Isolat	Literatur (Azizuddin <i>et al.</i> , 2010)	Isolat	Literatur (Azizuddin <i>et al.</i> , 2010)
2	-	-	152,43	152.3
3	-	-	139,08	139.0
4	-	-	179,06	178.9
5	-	-	152,80	152.7
6	-	-	132,32	132.3
7	-	-	158,88	158.8
8	6,49 (1H,s)	6.49 (s)	90,46	90.4
9	-	-	155,76	155.7
10	-	-	106,68	106.6
1'	-	-	123,64	123.6
2'	7,67 (d, J=2,25 Hz)	7.66 (d, J=2.2 Hz)	110,49	110.4
3'	-	-	145,64	145.6
4'	-	-	148,91	148.8
5'	6,95 (d, J=8,6 Hz)	6.95 (d, J=8.6 Hz)	114,44	114.4
6'	7,70 (dd, J=8,6 Hz, J=2,25 Hz)	7.71 (dd, J=8.6 Hz; J=2.2 Hz)	121,68	121.5

3-OCH ₃	3,95 (3H,s)	3.95 (s)	61,02	60.9
6-OCH ₃	3,98 (3H,s)	3.98 (s)	60,26	60.1
7-OCH ₃	3,92 (3H,s)	3.91 (s)	56,44	56.3
4'-OCH ₃	3,86 (3H,s)	3.87 (s)	56,17	55.9
3'-OH	5,79	5.70 (s)	-	-
5-OH	12,59	12.47 (s)	-	-

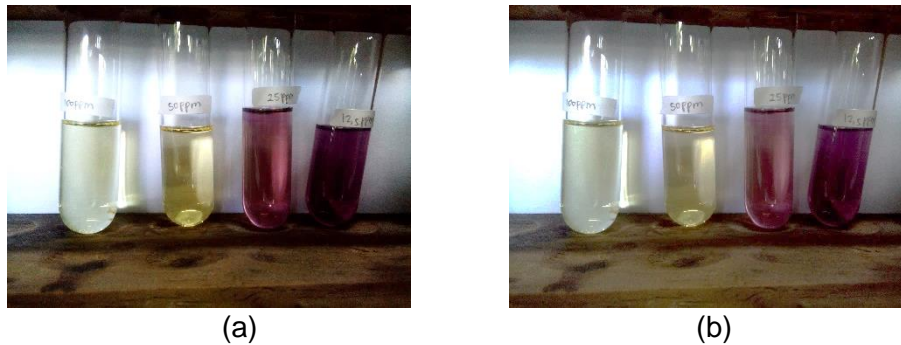
Hasil perbandingan data ¹H-NMR dan ¹³C-NMR senyawa hasil isolasi dengan literatur menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi tersebut sama dengan literatur, dengan demikian senyawa isolat adalah casticin.



Gambar 13. Struktur Molekul Senyawa Isolat: Casticin

C. Uji aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Senyawa Hasil Isolasi

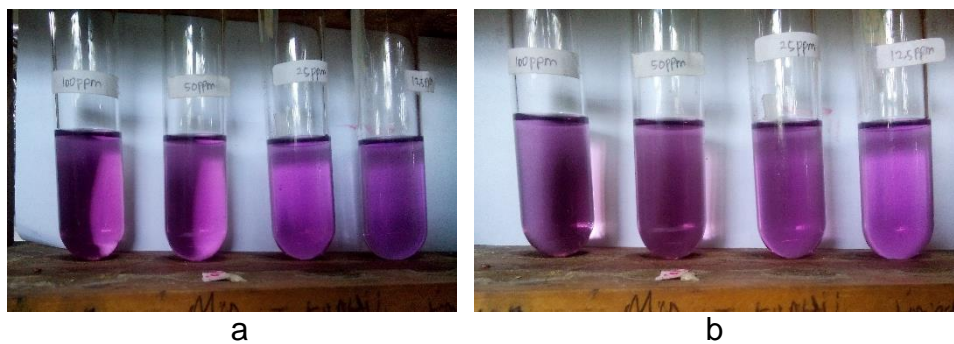
Uji aktivitas antioksidan yang dilakukan adalah dengan metode DPPH. Uji ini merupakan suatu metode uji aktivitas antioksidan yang paling sering digunakan. Uji ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang terjadi ketika sampel untuk mendonorkan elektron kepada radikal DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan mengubahnya menjadi molekul DPPH-H (*diphenyl picryl hydrazine*) yang lebih stabil, sehingga menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning.



Gambar 14. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Asam Askorbat.
(a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi



Gambar 15. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap BHT (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi



Gambar 16. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH terhadap Isolat (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi

Hasil dari dari pengukuran uji DPPH menunjukkan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna kuning yang signifikan terlihat pada standar asam askorbat dan BHT, sedangkan

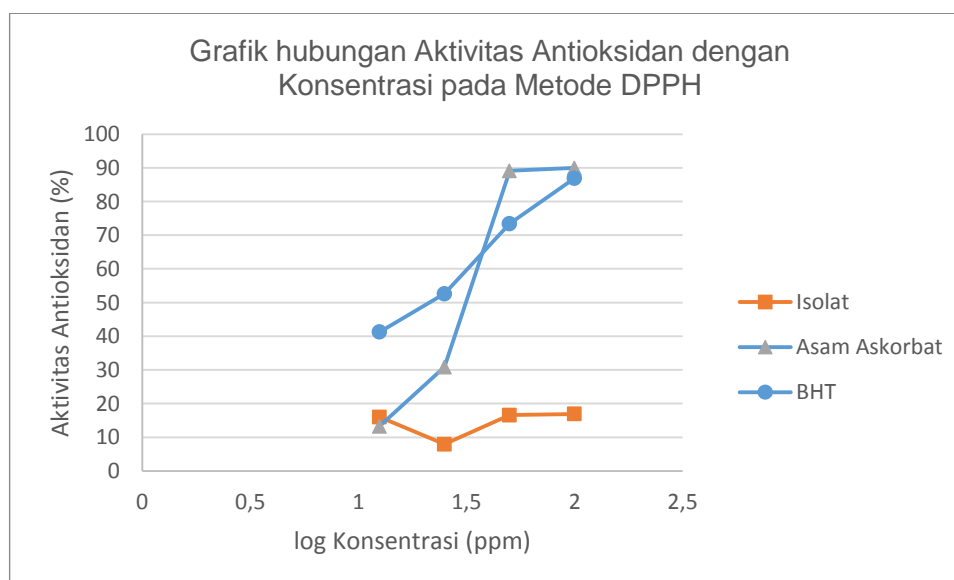
pada senyawa isolat tidak menunjukkan perubahan warna signifikan. Perubahan ini terjadi karena elektron dari larutan standar asam askorbat dan BHT berikatan dengan radikal DPPH dan mengubahnya menjadi DPPH-H yang stabil lebih baik dibanding dengan senyawa isolat. Hal ini menunjukkan bahwa larutan standar asam askorbat dan BHT memiliki kemampuan mendonorkan elektron lebih baik dibanding dengan senyawa isolat. Jika asam askorbat, BHT, dan senyawa isolat dibandingkan, intensitas warna yang dihasilkan oleh asam askorbat lebih tinggi dibanding dengan BHT dan senyawa isolat yang menunjukkan bahwa asam askorbat memiliki kemampuan transfer elektron yang lebih baik dibanding BHT dan senyawa isolat. Perubahan warna yang terjadi kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm sebagai panjang gelombang maksimum yang diperoleh dan didapatkan data pada tabel.

Tabel 3. Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

Larutan	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		Absorbansi Rata-rata	Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH (%)
		Abs1	Abs2		
Kontrol				0,611	
Asam Askorbat	12,5	0,530	0,530	0,530	13,25
	25	0,422	0,422	0,422	30,85
	50	0,066	0,067	0,066	89,11
	100	0,062	0,061	0,061	89,93
BHT	12,5	0,359	0,358	0,358	16,03
	25	0,292	0,287	0,289	52,61
	50	0,164	0,161	0,162	73,40
	100	0,080	0,080	0,080	86,90
Isolat	12,5	0,513	0,513	0,513	16,03
	25	0,563	0,562	0,562	7,93
	50	0,510	0,509	0,509	16,61

	100	0,508	0,509	0,508	16,93
--	-----	-------	-------	-------	-------

Tabel menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin kecil nilai absorbansi. Penurunan nilai absorbansi ini diakibatkan karena bereaksinya radikal DPPH dengan jumlah elektron yang terkandung dalam larutan standar dan senyawa isolat, sehingga radikal DPPH menjadi senyawa DPPH-H yang lebih stabil terbentuk, membuat larutan semakin berwarna cerah. Hasil perubahan kemudian dibuktikan dengan persentase aktivitas antioksidan dan dibuat grafik hubungan antioksidan dari data yang diperoleh, dimana sumbu x merupakan persen aktivitas antioksidan dan sumbu y merupakan log konsentrasi. Hasil perbandingan ditunjukkan pada gambar .



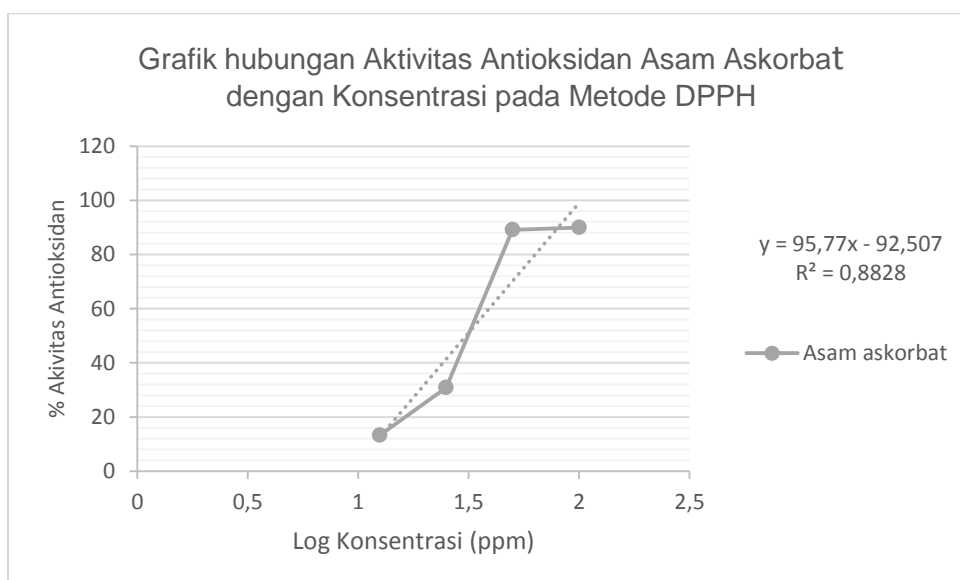
Gambar 17. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi pada Metode DPPH

Grafik tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan standar lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa isolat seperti yang telah dijelaskan

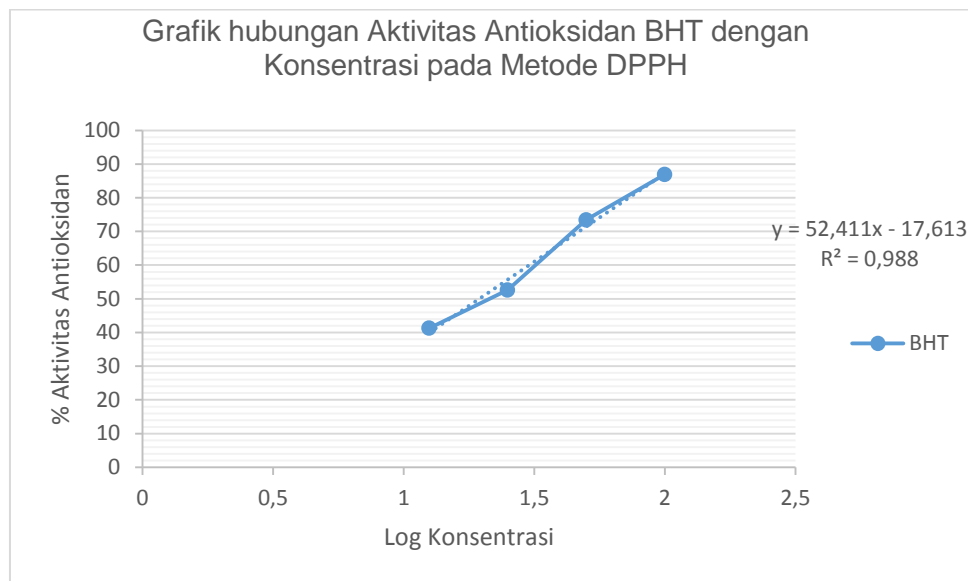
sebelumnya. Selanjutnya, diperoleh persamaan regresi yang didapat dari grafik hubungan aktivitas antioksidan, maka nilai IC_{50} dapat diketahui dari setiap larutan standar dan senyawa isolat.

Tabel 4. nilai IC_{50} larutan standar dan Isolat dengan Metode DPPH

sampel	Nilai IC_{50} (ppm)	Potensi Antioksidan
Asam Askorbat	30,76	Sangat Kuat
BHT	19,51	Sangat Kuat
Isolat	$94,33 \times 10^6$	Sangat Lemah



Gambar 18. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi Asam Askorbat pada Metode DPPH



Gambar 19. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Konsentrasi BHT pada Metode DPPH

Berdasarkan hasil dari nilai IC_{50} terlihat bahwa asam askorbat dan BHT memiliki nilai IC_{50} yang kecil, dimana semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin kuat kemampuan antioksidan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa asam askorbat dan BHT memiliki kemampuan antioksidan yang sangat tinggi, sedangkan nilai IC_{50} senyawa isolat menunjukkan hasil yang sangat besar, menandakan bahwa kemampuan antioksidan dari senyawa isolat sangat kecil karena nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm. Berdasarkan Penelitian yang dilakukan oleh Hajdu, *et al.* (2007) menunjukkan hasil bahwa senyawa casticin yang merupakan senyawa isolat menghasilkan nilai IC_{50} yang sangat besar dan tidak berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Sehingga aktivitas antioksidan standar dan isolat dapat diurutkan sebagai berikut

Senyawa Isolat < Asam askorbat < BHT

Nilai IC_{50} pada senyawa casticin yang telah diisolasi dari fraksi etil asetat sangat kecil, yaitu $94,33 \times 10^6$ ppm. Berdasarkan penelitian yang sebelumnya telah dilakukan oleh Arivianti (2016) menunjukkan bahwa nilai IC_{50} pada fraksi etil asetat dengan metode DPPH menunjukkan hasil yang sangat baik, yaitu 24,99 ppm. Perbedaan hasil dari ekstrak dan senyawa disebabkan oleh senyawa-senyawa dalam fraksi etil asetat bekerja dengan baik satu sama lain, oleh karena itu nilai IC_{50} fraksi etil asetat lebih baik dibandingkan senyawa hasil isolasi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari fraksi etil asetat daun *Vitex trifolia* Linn. asal Lombok diperoleh kesimpulan, yaitu

1. Hasil dari analisis spektrum UV, IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR menginformasikan bahwa senyawa yang diperoleh adalah casticin.
2. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari isolat $94,335 \times 10^6$ ppm dan senyawa isolat memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.

B. Saran

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Isolasi dari bagian lain tumbuhan *Vitex trifolia* Linn. seperti buah dan akar serta dilakukan uji bioaktivitas yang beragam.
2. Uji aktivitas antioksidan dengan metode lain untuk melihat potensi antioksidan senyawa isolat tersebut.
3. Uji biokativitas lain terhadap senyawa hasil isolasi yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariavianti, E. 2016. *Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri dari Ekstrak Metanol, Fraksi n-Heksana, dan Fraksi Etil Asetat Daun Vitex trifolia L. Asal Lombok*. Skripsi. Jakarta: Universitas Negeri Jakarta.
- Azizuddin, Makhmoor, T., Choudary, M. I. 2010. Radical Scavenging Potential of Compounds Isolated from *Vitex agnus-castus*. *Turk J Chem*, 34, 119-126.
- Chan, E. W. C., Baba, S., Chan, H. T., Kainuma, M., Tangah, J., 2016. Medicinal Plants of Sandy Shores: A Short Review on *Vitex trifolia L.* and *Ipomoea pes-caprae (L.) R. Br.* *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 7 (2), 107-115.
- Chantaranothai, P. 2011. A Revision of Genus *Vitex* (Lamiaceae) in Thailand. *Tropical Natural History*, 11 (2), 91-118.
- Dalimartha, S., 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Pustaka Bunda.
- Day, I. R., Underwood, A. L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of The Association of Physicians of India*, LII, 794-804.
- El-Kousy, S., Mohamed, M., Mohamed, S., 2012. Phenolic and biological activities of *Vitex trifolia* Aerials Parts. *Life Science Journal*, 9 (2), 670-677.
- Fessenden, R. J., Fessenden, J. S.. 1997. *Kimia Organik Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Ganapaty, S., Vidyadhar, K. N., 2005. Phytoconstituents and biological activities of *Vitex* - a review, *Journal of Natural Remedies*, 5 (2), 75-95.

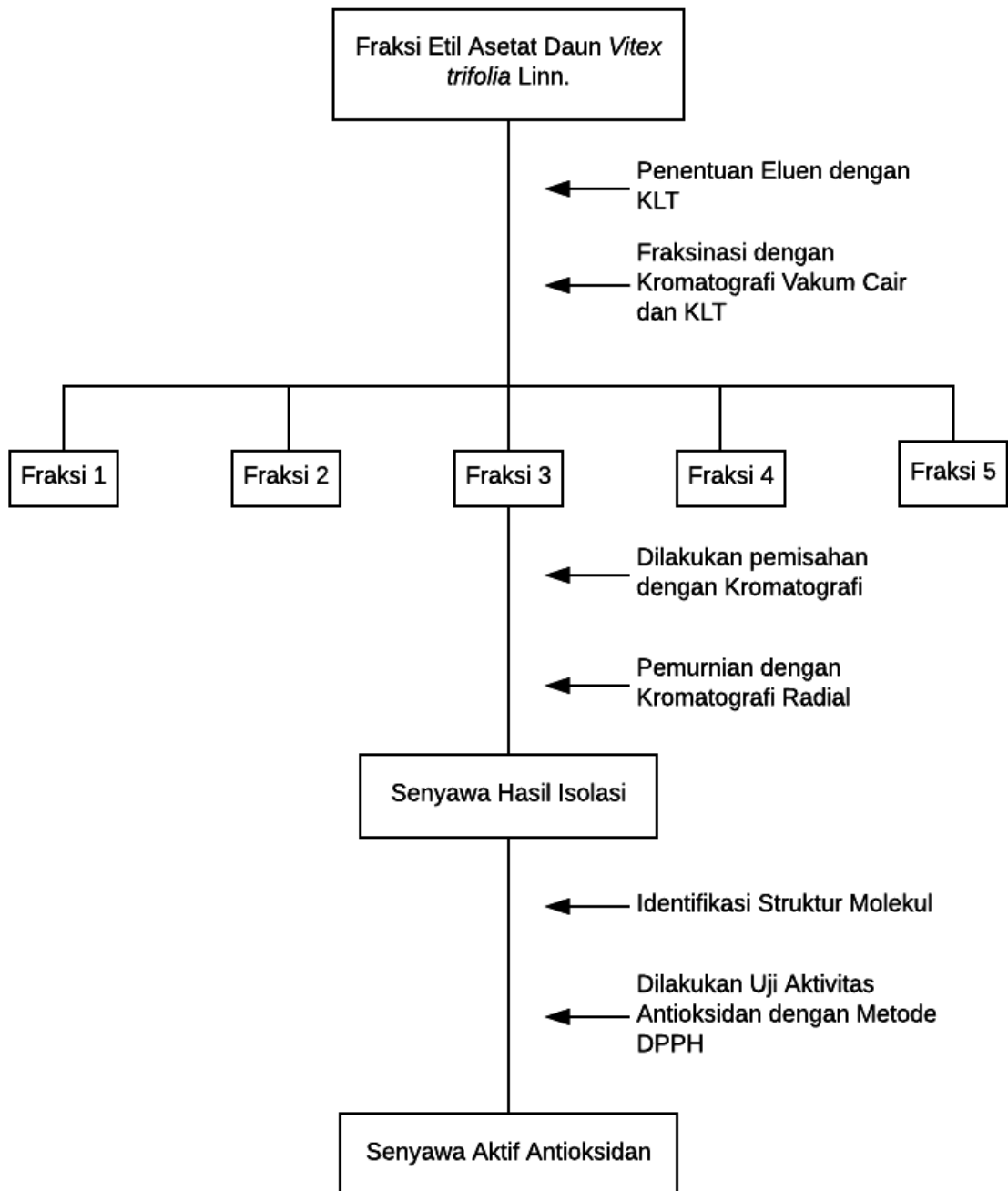
- Hajdu, Z., Hohmann, J., Forgo, P., Martinek, T., Dervarics, M., Zupko, I., Falkay, G., Cossuta, D., Mathe, I. 2007. Diterpenoids and Flavonoids from the Fruits of *Vitex agnus-castus* and Antioxidant Activity of the Fruit Extracts and Their Constituents. *Phytotherapy Research*, 21, 391-394.
- Hariana, H. A., 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Huber, A., Burkle, A., Munch, G. 2007. Neuroprotective Mechanisms: Oxidative Stress as a Target for Neuroprotective Therapies in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 77-102.
- Jangwan, J. S., Aquino, R. P., Mencherini, T., Picerno, P., Singh, R. 2013. Chemical constituents of ethanol extract of leaves and molluscicidal activity of crude extracts from *Vitex trifolia* Linn. *Herba Pol*, 59 (2), 20-32.
- Kannathasan, K., Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. 2011. Mosquito Larvicidal Activity of Methyl-p-hydroxybenzoate Isolated from the Leaves of *Vitex trifolia* Linn. *Acta Tropica*, 120, 115-118.
- Kiuchi, F., Matsuo, K., Ito, M., Qui, T. K., & Honda, G. 2004. New Norditerpenoids with Trypanocidal Activity from *Vitex trifolia*. *Chem. Pharm Bull*, 52(12), 1492-1494.
- Kromaton. 2015. *Fast Centrifugal Partition Chromatography*. <http://www.kromaton.com/en/the-cpc/technologies>. Diakses tanggal 8 Oktober 2015.
- Kulkarni L. A. 2011. Pharmacological Review of *Vitex trifolia* Linn. (Verbaeaceae). *Pharmacologyonline*, 3, 858-863.
- Kulkarni, N., Mandhanya, M., Jain, D. K. 2011. Centrifugal Thin Layer Chromatography. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*. 1 (3), 294-300.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Department of Botany*, 4(8), 118-128.

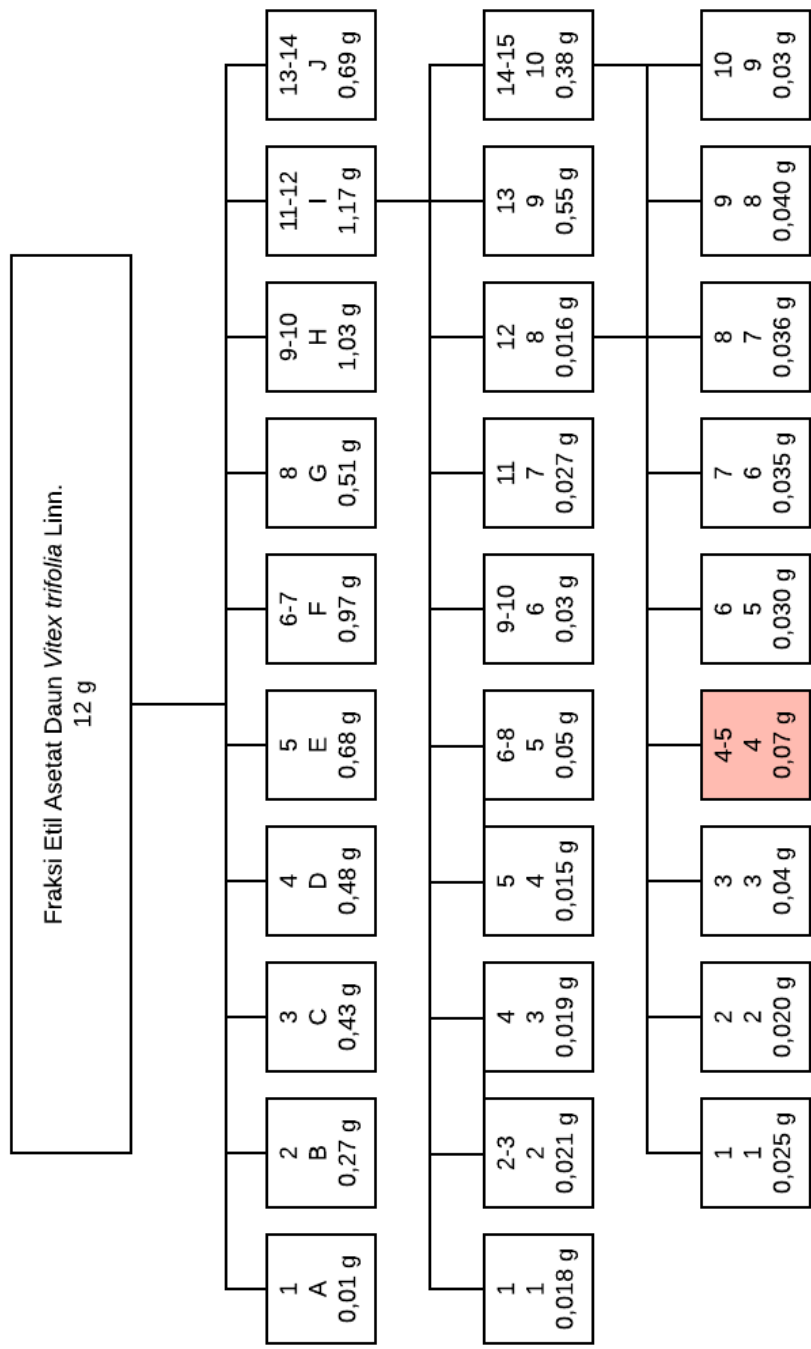
- Lone, A. A., Ganai, S. A., Ahanger, R. A., Bhat, H. A., Bhat, T. A., Wani, I. A. 2013. Free radicals and antioxidants: Myths, Facts and Mysteries. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 7 (3), 91-113.
- Meena, A. K., Niranjana, U. S., Rao, M. M., Phadi, M. M., Babu, R. 2011. A Review of the Important Chemical Constituents and Medicinal Uses of *Vitex* Genus, *Asian Journal of Traditional Medicines*, 6 (2), 54-60.
- Percival, M., 1996. Antioxidants, *Clinical Nutrition*, 10, 1-4.
- Rani, A., Sharma, A., 2013. The Genus *Vitex*: A Review, *Pharmacognosy Reviews*, 7 (14), 188-199.
- Sarma, A. D., Mallick, A. R., Ghosh, A. K. 2010. Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1 (3), 185-192.
- Shah S., Dhanani T., Kumar S. 2013. Validated HPLC Method for Identification and Quantification Of p-Hydroxy Benzoic Acid and Agnuside in *Vitex negundo* and *Vitex trifolia*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 500-508.
- Tanobat. 2015. Legundi – Ciri-Ciri Tanaman serta Khasiat dan Manfaatnya. <http://www.tanobat.com/legundi-ciri-ciri-tanaman-serta-khasiat-dan-manfaatnya.html>. Diakses tanggal 9 Januari 2017, Pukul 20.09 WIB.
- The Royal Society of Chemistry. 2015. *Chromatography*. <http://media.rsc.org/Modern%20chemical%20techniques/MCT5%20Chromatography.pdf>. Diakses tanggal 7 Januari 2016, Pukul 18.37 WIB.
- Tiwari N., Thakur J., Saikia D., Gupta M. M. 2013. Antitubercular Diterpenoids from *Vitex trifolia*. *Phytomedicine*, 20, 605-610.
- Tortzen, C. 2008. A Short guide to Dry Column Vacuum Chromatography. *DCVC*, (16), 2431-2434.

- USDA. 2016. Natural Resources Conservation Service. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=vitr7>. Diakses tanggal 9 Januari 2017, pukul 19.43 WIB.
- Xin Li, W., Bin Cui, C., Cai, B., Yan Wang, H., & Sheng Yao, X. 2005. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M Phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7(4), 615-626.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- Yao, J. L., Fang, S. M., Liu, R., Oppong, M. B., Liu, E. W., Fan, G. W., Zhang, H., 2016. A Review on the Terpenes from Genus *Vitex*. *Journal of Molecules*, 21, 1-20.

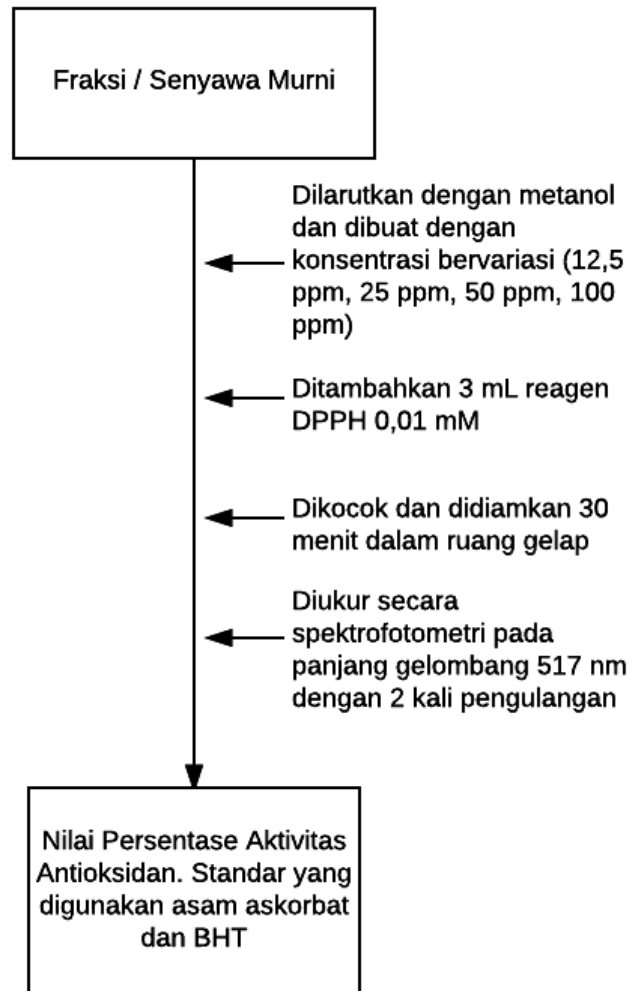
LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja Isolasi Ekstrak Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* Linn.





Lampiran 2. Bagan Uji Aktivitas Antioksidan Daun *Vitex trifolia* Linn. dengan Metode DPPH



Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan

1. Pembuatan larutan induk senyawa Isolat (200 ppm)

$$ppm = \frac{\text{Massa zat (mg)}}{\text{Massa pelarut (Kg)}}$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{\text{Massa zat (mg)}}{\text{Massa jenis metanol} \times \text{Volume (L)}}$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{3,2 \text{ mg}}{0,0008 \frac{\text{Kg}}{\text{L}} \times \text{Volume (L)}}$$

$$\text{Volume} = 0,02 \text{ L} = 20 \text{ mL}$$

= 3,2 mg senyawa isolat dilarutkan dalam 20 mL metanol

2. Pembuatan Larutan Induk BHT dan Asam askorbat (200 ppm)

$$ppm = \frac{\text{Massa zat (mg)}}{\text{Massa pelarut (Kg)}}$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{\text{Massa zat (mg)}}{\text{Massa jenis metanol} \times \text{Volume (L)}}$$

$$200 \text{ ppm} = \frac{1,6 \text{ mg}}{0,0008 \frac{\text{Kg}}{\text{L}} \times \text{Volume (L)}}$$

$$\text{Volume} = 0,01 \text{ L} = 10 \text{ mL}$$

= 1,6 mg BHT dan Asam askorbat dilarutkan dalam 10 mL metanol

3. Pengenceran Larutan Induk 200 ppm menjadi 100 ppm

$$V_{\text{larutan induk}} \times M_{\text{larutan induk}} = V_{\text{pengenceran}} \times M_{\text{pengenceran}}$$

$$V_{\text{larutan induk}} \times 200 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_{\text{larutan induk}} = 5 \text{ mL}$$

4. Pengenceran Larutan Induk 100 ppm menjadi 50 ppm

$$V_{\text{larutan induk}} \times M_{\text{larutan induk}} = V_{\text{pengenceran}} \times M_{\text{pengenceran}}$$

$$V_{\text{larutan induk}} \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_{\text{larutan induk}} = 5 \text{ mL}$$

5. Pengenceran Larutan Induk 50 ppm menjadi 25 ppm

$$\begin{aligned}
 V_{\text{larutan induk}} \times M_{\text{larutan induk}} &= V_{\text{pengenceran}} \times M_{\text{pengenceran}} \\
 V_{\text{larutan induk}} \times 50 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm} \\
 V_{\text{larutan induk}} &= 5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

6. Pengenceran Larutan Induk 25 ppm menjadi 12,5 ppm

$$\begin{aligned}
 V_{\text{larutan induk}} \times M_{\text{larutan induk}} &= V_{\text{pengenceran}} \times M_{\text{pengenceran}} \\
 V_{\text{larutan induk}} \times 25 \text{ ppm} &= 10 \text{ mL} \times 12,5 \text{ ppm} \\
 V_{\text{larutan induk}} &= 5 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

7. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

$$\begin{aligned}
 [\text{Larutan DPPH}] &= \frac{\text{Massa DPPH}}{\text{Mr DPPH}} \times \frac{1000}{V_{\text{pelarut}} \text{ (mL)}} \\
 0,0001 \text{ mol/L} &= \frac{\text{Massa DPPH}}{394,32 \frac{\text{gram}}{\text{mol}}} \times \frac{1000}{50 \text{ mL}} \\
 \text{Massa DPPH} &= 1,9715 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

a. Asam Askorbat

- Konsentrasi 12,5 ppm

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas antioksidan (\%)} &= \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times \\
 &100\%
 \end{aligned}$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,530}{0,611} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 13,25 \%$$

- Konsentrasi 25 ppm

$$\begin{aligned}
 \text{Aktivitas antioksidan (\%)} &= \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times \\
 &100\%
 \end{aligned}$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,422}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 30,85 %

- Konsentrasi 50 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,066}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 89,11 %

- Konsentrasi 100 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,062}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 89,93 %

b. BHT

- Konsentrasi 12,5 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,358}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 41,24 %

- Konsentrasi 25 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,289}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 52,61 %

- Konsentrasi 50 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,162}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 73,40 %

- Konsentrasi 100 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times$$

100%

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,080}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 86,90 %

c. Isolat

- Konsentrasi 12,5 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times$$

100%

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,513}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 16,03 %

- Konsentrasi 25 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times$$

100%

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,562}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 7,93 %

- Konsentrasi 50 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times$$

100%

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,509}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 16,61 %

- Konsentrasi 100 ppm

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{(\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbansi}_{\text{sampel}})}{\text{Absorbansi}_{\text{kontrol}}} \times$$

100%

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,611 - 0,507}{0,611} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 16,93 %

Lampiran 5. Perhitungan Nilai IC50 pada Metode DPPH

1. Asam Askorbat

Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 95,77x - 92,507$

$$50 = 95,77x - 92,507$$

$$\log x = 1,48801$$

$$x = 30,76 \text{ ppm}$$

2. BHT

Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 52,411x - 17,613$

$$50 = 52,411x - 17,613$$

$$\log x = 1,2903$$

$$x = 19,51 \text{ ppm}$$

3. Asam Askorbat

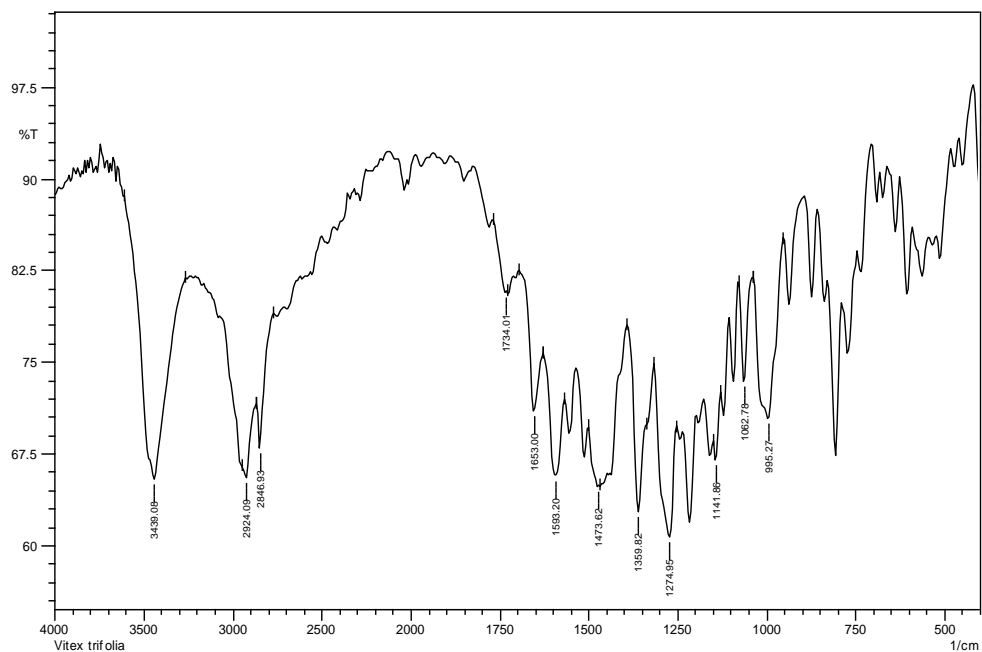
Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 3,7786x + 8,5311$

$$50 = 3,7786x + 8,5311$$

$$\log x = 1,48801$$

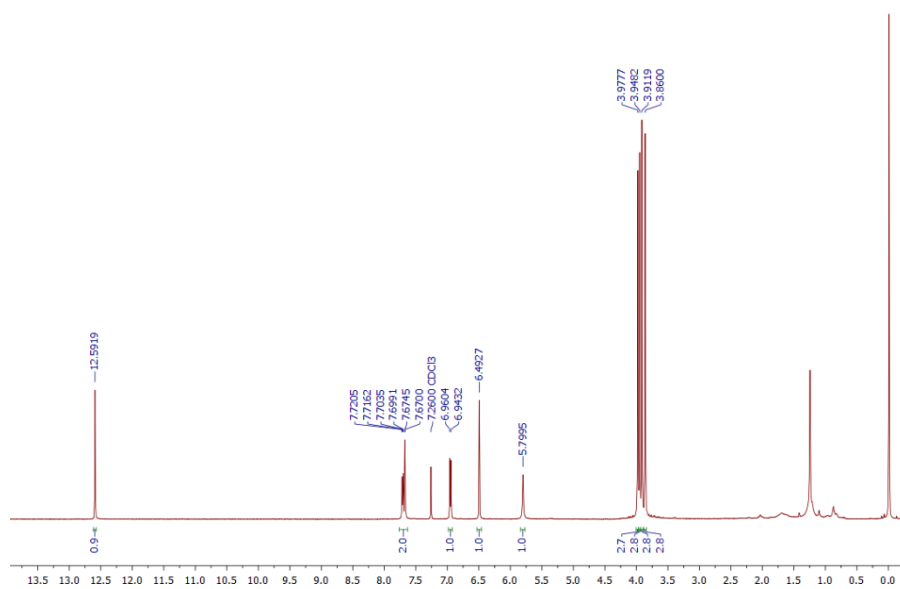
$$x = 94,335 \times 10^6 \text{ ppm}$$

Lampiran 6. Spektrum FT-IR Senyawa Isolat



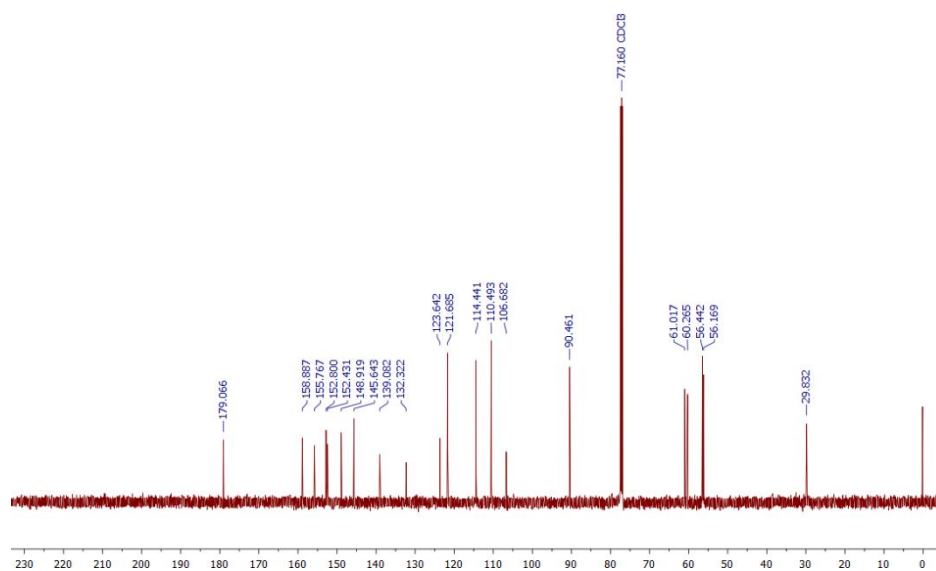
Lampiran 7. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Isolat

Fero-1104_1H

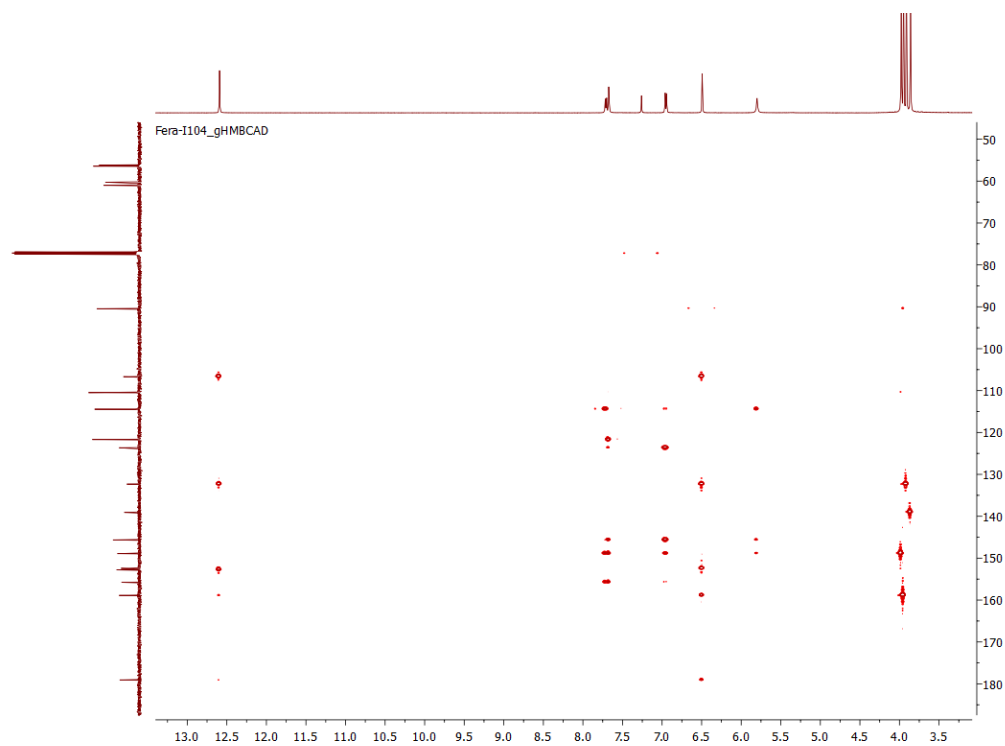


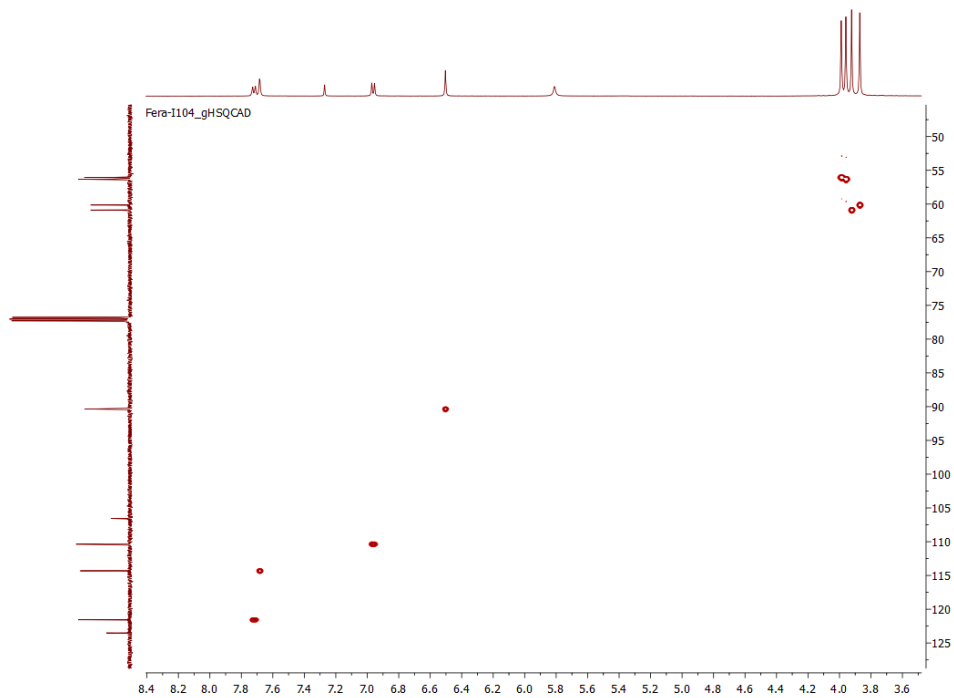
Lampiran 8. Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa Isolat

Fera-1104_13C



Lampiran 9. Spektrum ^1H - ^{13}C HMBC Senyawa Isolat



Lampiran 10. Spektrum ^1H - ^{13}C HSQC Senyawa Isolat**Lampiran 11. Spektrum UV-Vis Senyawa Isolat**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta:

Nama : Fannisa Rahmawati

No. Registrasi : 3325122128

Program Studi : Kimia

Menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "**Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Daun *Vitex trifolia* Linn Asal Lombok**" adalah:

1. Dibuat dan dilaksanakan oleh saya sendiri berdasarkan data yang diperoleh dari hasil penelitian.
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang telah dibuat oleh orang lain atau menjiplak karya tulis orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul bila pernyataan saya ini tidak benar.

Jakarta, 16 Februari 2017

Yang Membuat Pernyataan



Fannisa Rahmawati

No. reg. 3325122128

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Fannisa Rahmawati. Lahir di Jakarta pada tanggal 3 November 1994. Anak ketiga dari tiga bersaudara. Lahir dari pasangan Bapak Toni Rinadi dan Ibu Zuhrotus Suaidah.

Penulis menyelesaikan pendidikan formal di SD Harapan Indonesia Bekasi pada tahun 2001-2006, SMPN 25 Bekasi pada tahun 2006-2009, MAN 1 Malang pada tahun 2009-2012, dan diterima di Kimia FMIPA Universitas Negeri Jakarta pada tahun 2012 melalui jalur SNMPTN tulis. Studi S1 diselesaikan pada tahun 2017.

Penulis pernah melakukan kunjungan ke beberapa industri, seperti PT. Niramas Utama (INACO), PT. Coca Cola Amatil Indonesia, PT. Amerta Indah Otsuka (Pocari Sweat), PT. Yakult Indonesia Persada, PT. Sidomuncul, dan Pabrik Carica – Dieng, Wonosobo. Penulis juga pernah melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Mandalasari, Banten. Selain itu penulis pernah menjadi asisten dosen Praktikum Kimia Struktur dan Fungsi Biomolekul dan Praktikum Penentuan Struktur Molekul.