ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI N-HEKSANA DAUN *Vitex trifolia* Linn Asal,Yogyakarta

Skripsi

Disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains

Hermastuti
3325130952

PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
20

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI N-HEKSANA DAUN *Vitex Trifolia* L. Asal YOGYAKARTA

Nama : Hermastuti
No. Reg : 3325130952
Program Studi : Kimia

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan	: Prof. Dr. Suyono, M.Si NIP 19671218 199303 1 005	.....	21/08 - 2017
Wakil Penanggung Jawab Wakil Dekan I	: Dr. Muktiningsih N, M.Si NIP 19640511 198903 2 001	.....	21/08 - 2017
Ketua	: Prof. Dr. Erdawati, M. Sc NIP 19510912 198103 2 001	.....	16/08 - 2017
Sekretaris	: Arif Rahman, M.Sc NIP 19790216 200501 1 003	.....	16/08 - 2017
Anggota Penguji	: Dra. Zulmanelis, M.Si NIP 19560501 198803 2 001	.....	16/08 - 2017
Pembimbing I	: Dr. Fera Kurniadewi, M.Si NIP 19761231 200112 2 002	.....	21/08 - 2017
Pembimbing II	: Irma Ratna Kartika, M.Sc.Tech NIP 19721204 200501 2 001	.....	20/08 - 2017

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal: 15 Agustus 2017

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul **"Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi N-Heksana Daun *Vitex Trifolia* Linn Asal, Yogyakarta"** yang disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Kimia Universitas Negeri Jakarta adalah karya ilmiah saya dengan arahan dari dosen pembimbing.

Sumber informasi yang diperoleh dari penulis lain yang telah dipublikasikan yang disebutkan dalam teks skripsi ini, telah dicantumkan dalam Daftar Pustaka sesuai dengan norma, kaidah dan etika penulisan ilmiah.

Jika dikemudian hari ditemukan sebagian besar skripsi ini bukan hasil karya saya sendiri dalam bagian-bagian tertentu, saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya sanding dan sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Jakarta, 16 Agustus 2017

METERAI TEMPEL
TGL. 20
D513EAEF609826682
6000
ENAM RIBU RUPIAH

Hermastuti

ABSTRAK

HERMASTUTI. Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder Dari Fraksi N-Heksana Daun *Vitex Trifolia* Linn Asal, Yogyakarta. Dibawah Bimbingan FERAKURNIADEWI, IRMARATNAKARTIKA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dari fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn, serta aktivitas antioksidannya. Metode dalam penelitian ini yaitu pemurnian dan pemisahan terhadap fraksi n-heksana daun *vitex trifolia* L, menggunakan teknik kromatografi, menghasilkan satu senyawa isolat. Hasil analisis data spektroskopi UV-Vis dan ^{1}H-NMR, menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah $\beta-$Sitosterol. Hasil uji antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan nilai IC_{50} pada senyawa isolat adalah $2.01x10^{-4}$ppm dimana senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

Kata Kunci : *Vitex Trifolia L, Aktivitas Antioksidan, DPPH, Steroid, β-Sitosterol*

ABSTRACT

HERMASTUTI. Isolation and Antioxidant Activity of N-Heksana Fraction Secondary Metabolites from the leaves of *Vitex Trifolia* L. from Yogyakarta, Under Supervised by FERAKURNIADEWI, IRMARATNAKARTIKA.

This study aims to determine the secondary metabolite compounds from the fraction of n-heksane leaf *Vitex trifolia* Linn, and its antioxidant activity. The method of this research is purification and separation of n-hexane fraction of *vitex trifolia* leaf, using chromatography technique, yielding one isolate compound. Results of analysis of UV-Vis and ^{1}H-NMR spectroscopy data, showed that the isolated compound was β-Sitosterol. The result of antioxidant test using DPPH method showed IC^{50} value on the isolate compound is $2.01x10^{4}$ppm where this compound has weak antioxidant activity.

Keywords: *Vitex Trifolia L, Antioxidant Activity, DPPH, Steroids, β-Sitosterol*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, Tuhan semesta alam yang telah memberikan rahmat serta hidayat-nya sehingga penulis mampu menyelesaikan Skripsi yang berjudul "Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi Klorofrom Daun *Vitex Trifolia* Linn Asal Demangan Baru, Yogyakarta". Skripsi ini disusun untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa tidak adanya bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini tidak mungkin dapat terselesaikan dengan baik. Untuk itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr.Fera Kurniadewi, M.Si dan Irma Ratna Kartika M.Sc, Tech. Selaku dosen pembimbing atas bimbingan, motivasi, dan saran dalam penulisan skripsi ini. Terima kasih pula kepada Dr.Yusmaniar,M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia dan kepada Arif Rahman M.Sc selaku Pembimbing Akademik penulis yang senantiasa memberikan arahan dan saran dalam bidang akademik. Serta kepada Dosen-dosen Jurusan Kimia UNJ yang telah memberikan ilmu dan motivasi kepada penulis dan kepada Laboran laboratorium Kimia UNJ yang membantu penulis selama di Laboratorium Penelitian. Kepada kedua Orang Tua saya yang selalu tiada henti mendoakan. Serta rekan-rekan tim Antioksidan dan semua rekan-rekan KIMIA UNJ 2013.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapapun yang membacanya. Penulis juga menyadari, skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari pembaca.

Jakarta, 7 Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
KATA PENGANTAR ..... **iv**
DAFTAR ISI ..... **v**
DAFTAR TABEL ..... **vi**
DAFTAR GAMBAR ..... **vii**
DAFTAR LAMPIRAN ..... **viii**

BAB I PENDAHULUAN **1**
A Latar Belakang 1
B. Perumusan Masalah 2
C. Tujuan Penelitian 2
D. Manfaat Penelitian 2

BAB II TINJAUAN PUSTAKA **3**
A Genus Vitex 3
B. *Vitex Trifolia* 4
C. Fitokimia genus *Vitex Trifolia* 6
D. Radikal Bebas dan Antioksidan 10
E. Uji Aktivitas Antioksidan 12
F. Pemisahan Senyawa secara Kromatografi 13
G. Identifikasi Senyawa dan Penentuan Struktur 17

BAB III METODE PENELITIAN **19**
A. Tempat dan Waktu Penelitian 21
B. Metode Penelitian 19
C. Teknik Pengumpulan dan Analisa Data 24

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN **26**
A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan 27
B. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap Senyawa Hasil Isolasi 28

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN **37**
DAFTAR PUSTAKA **38**
LAMPIRAN **44**

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Taksonomi Tanaman *Vitex trifolia* (legundi) 4
Tabel 2. Struktur Senyawa Flavonoid dari *Vitex trifolia* 7
Tabel 3. Struktur Senyawa Flavonoid dari *Vitex trifolia* (Lanjutan) 8
Tabel 4. Struktur Senyawa Terpenoid dari *Vitex trifolia* 9
Tabel 5. Struktur Senyawa Steroid dari *Vitex trifolia* **Error! Bookmark not defined.**
Tabel 6. Penggolongan Kromatografi ..... **Error! Bookmark not defined.**
Tabel 7. Data Pengamatan Absorbansi Sampel dan Standar 25
Tabel 8. Perbandingan Data Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa Isolat 27
Tabel 9. Data Absorbansidan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH 33
Tabel 10. Nilai IC_{50} pada Sampel Standar dan Sampel 36
Tabel 11. Tingkat Kekuatan Antioksidan dengan Metode DPPH 36

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Tanaman *Vitex trifolia* Linn (Legundi) dan Bagian-bagian 4
Gambar 2. Tumbuhan *Vitex trifolia*. (a) Bunga *Vitex trifolia* dan (b) Buah 5
Gambar 3. Reduksi DPPH dari Senyawa Peredam Radikal Bebas..... 13
Gambar 4. Kromatogram Pemisahan Fraksi N-Heksana *Vitex trifolia*..... 20
Gambar 5. Kromatogram Penggabungan Fraksi N-Heksana *Vitex trifolia*..... 21
Gambar 6. Kromatogram Pemisahan Fraksi E dengan Eluen K/H (3:7) 21
Gambar 7. Kromatogram Pemisahan Fraksi E dengan Eluen H/E (8:2)..... 22
Gambar 8. Kromatogram Pemisahan Fraksi Eg denga Eluen H/E (8:2)..... 22
Gambar 9. Kromatogram Pemisahan Fraksi Eg dengan Eluen H/E (8:2)..... 23
Gambar 10.Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Isolat 23
Gambar 11.Struktur Senyawa β-Sitosterol..... 27
Gambar 12.Warna Larutan Asam Askorbat pada 100ppm 28
Gambar 13.Warna Larutan Asam Askorbat pada 50ppm 28
Gambar 14.Warna Larutan Asam Askorbat pada 25ppm 29
Gambar 15.Warna Larutan Asam Askorbat pada 12,5ppm 29
Gambar 16.Warna Larutan BHT pada 100ppm 29
Gambar 17.Warna Larutan BHT pada 50ppm 30
Gambar 18.Warna Larutan BHT pada 25ppm 30
Gambar 19.Warna Larutan BHT pada 12,5ppm 30
Gambar 20.Warna Larutan Isolat pada 100ppm 31
Gambar 21.Warna Larutan Isolat pada 50ppm 31
Gambar 22.Warna Larutan Isolat pada 25ppm 32
Gambar 23.Warna Larutan Isolat pada 12.5ppm 32
Gambar 24.Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi 34
Gambar 25.Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi Asam Askorbat .. 34
Gambar 26.Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi BHT 35
Gambar 27.Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi Isolat 35

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Bagan Kerja Fraksi N-Heksana Daun *Vitex trifolia* L.....43
Lampiran 2. Bagan Uji Aktivitas Antioksidan Daun *Vitex trifolia* L 44
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan.....45
Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH.....46
Lampiran 5. Perhitungan Nilai IC_{50} pada Metode DPPH 49
Lampiran 6. Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa Isolat 50
Lampiran 7. Spektra UV-Vis Isolat 50

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tumbuhan menjadi sumber daya alam yang sangat penting karena merupakan tempat terjadinya sintesis senyawa organik yang dapat menghasilkan golongan senyawa dengan berbagai macam struktur dan fungsi alaminya. Keanekaragaman tumbuhan ini berarti senyawa kimia (*chemodiversity*) yang kemungkinan terkandung di dalamnya juga beranekaragam. Saat ini, banyak masyarakat kembali menggunakan bahan-bahan alam untuk menghindari pola hidup yang tidak sehat dengan menghindari bahan-bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan bahan-bahan alami (Purniawati, 2014). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai obat yaitu *Vitex trifolia* (legundi). Genus *vitex* termasuk dalam tumbuhan family *Verbenaceae* yang memiliki 270 spesies berupa pohon dan semak-semak yang terdapat di daerah sub-tropis. Tanaman legundi sering digunakan masyarakat pada daerah sumatera, jawa, dan sulawesi sebagai obat tradisional. Efek farmakologis pada *vitex trifolia* diantaranya sebagai, obat influenza, demam, sakit kepala, sakit gigi, mata merah, beri-beri, muntah darah dan pembunuh serangga (Hariana, 2009).

Efek farmakologis pada tanaman ditentukan berdasarkan kandungan metabolit sekundernya. Daun dan akar mengandung alkaloid, saponin, flavonoida dan polifenol, dan daunnya juga mengandung minyak atsiri (Hariana, 2009). Daun legundi yang diekstrak dengan petroleum eter memberikan skrining positif untuk steroid, terpenoid, flavonoid, senyawa fenol, tannin, saponin dan fitosterol (Thenmozhi *et al.,* 2011). Berdasarkan hasil informasi dari biopharmaca, pada *vitex trifolia* mengandung flavonoid (agnusida) yang dapat berpotensi sebagai antioksidan. Antioksidan berfungsi melindungi tubuh terhadap radikal-radikal bebas sehingga antioksidan sangat penting dalam memelihara kesehatan tubuh (Arts *et al.,* 2004). Meningkatnya jumlah radikal bebas didalam tubuh sehingga diperlukan asupan antioksidan dari luar tubuh. Pemberian antioksidan dari luar tubuh diperlukan untuk mengatasi keadaan stress oksidatif ini (Lobo *et al.,* 2010).

Penelitian mengenai tumbuhan yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol bagian aerial *Vitex trifolia* telah dilakukan di Mesir (EL-Kousy *et al.*, 2012). Namun, masih sedikit yang melakukan penelitian pada tumbuhan genus *Vitex* yang ada di Indonesia. Belum ada penelitian mengenai isolasi dari daun *Vitex trifolia* pada fraksi n-heksana asal Yogyakarta, karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* dan melakukan uji aktivitas antioksidan terhadap senyawa hasil isolasi tersebut.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah di uraikan di atas, maka masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut: “ Bagaimana struktur senyawa hasil isolasi dari fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn dan bagaimana hasil uji aktivitas antioksidan senyawa tersebut dengan metode uji penangkapan radikal DPPH “.

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah yang telah diuraikan, penelitian ini bertujuan untuk menentukan struktur senyawa metabolit sekunder dari fraksi n-heksana daun Vitex Trifolia L. dan menguji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat :

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

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

A. Genus *Vitex*

Genus *Vitex* terdiri dari 270 spesies yang tersebar di seluruh dunia dan terdiri dari jenis pohon dan semak yang tumbuh di daerah tropis, sub-tropis, dan ada beberapa spesies di daerah beriklim sedang (Meena *et al.,* 2011). India merupakan 1 dari 11 negara besar yang memiliki 13 spesies *Vitex*. Berdasarkan beberapa penelitian di India, ekstrak metanol dari beberapa tumbuhan *Vitex* tertentu berperan sebagai antibakteri diantaranya adalah *Vitex altissima, Vitex diversifolia, Vitex negundo, Vitex peduncularis, dan Vitex trifolia*. *Vitex negundo* juga memiliki bioaktivitas lain yaitu sebagai antifilarial (Sahare & Singh, 2013) analgesik dan anti inflamasi (Zheng *et al.,* 2009).

Berdasarkan potensi tumbuhan *vitex* sebagai obat tradisional, beberapa penelitian telah dilakukan antara lain ekstrak metanol daun *V. negundo* telah diuji dan terbukti efektif sebagai antibakteri, antifungi, dan antioksidan, ekstrak etanol biji *V. negundo* terbukti efektif sebagai antifungi (Zheng *et al.,* 1996). Selain itu, ekstrak metanol bunga *V.agnus-castus* terbukti efektif sebagai antimikroba dan antikanker. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa ekstrak metanol akar *Vitex negundo* terbukti efektif sebagai antihiperpigmentasi(Azhar-ul-Haq *et al.,* 2006). Genus *Vitex* merupakan salah satu tumbuhan endemik Indonesia. Beberapa spesies yang banyak terdapat di Indonesia adalah *V. negundo, V. trifolia, V. pinnata, V. cofassus, dan V. parviflora.* Indonesia, *V. trifolia dan V. negundo* digunakan untuk pengobatan gangguan usus dan penghilang rasa sakit sedangkan *V. pinnata, V. cofassus, dan V. parviflora* banyak digunakan sebagai kayu dalam pembuatan perkakas rumah tangga (Lemmens and Bunyapraphatsara, 2003). *V. Agnus-castus* L. banyak digunakan masyarakat sebagai obat sakit perut, antijamur dan penyakit yang berkaitan dengan pencernaan. *V.negundo L* digunakan sebagai antiinflamasi, obat antinyeri, antiasma dan antibanteri. *Vitex pinnata* Linn digunakan sebagai obat sakit punggung, sakit perut dan suplemen. Tumbuhan

genus *Vitex* sudah digunakan secara medis untuk inflamasi, analgesik, antikonvulsan, dan obat antiasma (Nugroho & Alam, 2012).

B. *Vitex trifolia*

Vitex trifolia adalah salah satu spesies yang sangat banyak digunakan oleh penduduk Pasifik untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Matsui *et al.*, 2009). *Vitex* yang berada di Indonesia adalah *Vitex trifolia* yang dikenal dengan nama lokal pohon galumi atau legundi (Orwa *et al.*, 2009). Legundi tumbuh pada tempat-tempat yang tandus, panas dan berpasir dan ditemukan tumbuh liar di hutan jati, semak belukar, atau dipelihara sebagai tanaman pagar. Legundi tumbuh tegak, tinggi 1-4 m, batang berambut halus.

Gambar 1. (a) Tanaman *Vitex Trifolia* Linn (Legundi) dan (b) Bagian-bagiannnya (Tanobat, 2015)

Legundi merupakan tumbuhan anggota *Verbenaceae*. Perdu, tumbuh tegak, tinggi 1-4 m, batang berambut halus. Daun majemuk menjari beranak daun tiga, bertangkai, helaian anak daun berbentuk bulat telur sungsang, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas berwarna hijau, permukaan bawah berambut rapat warna putih, panjang 4- 9,5 cm, lebar 1,75-3,75 cm. Bunga majemuk berkumpul dalam tandan, berwarna ungu muda, keluar dari ujung tangkai. Buahnya berbentuk bulat, daun berbau aromatik khas dan dapat digunakan untuk menghalau serangga atau kutu lemari (Dalimartha, 2008).

Klasifikasi tumbuhan *Vitex trifolia* menurut NRCS (*Natural Resources Conservation Servise*) (2010) adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Taksonomi Tanaman *Vitex Trifolia* (legundi) (NRCS, 2010)

Rank	Scientific Name and Common Name
Kingdom	Plantae – Plants
Subkingdom	Tracheobionta – Vascular plants
Superdivision	Spermatophyta – Seed plants
Division	Magnoliophyta – Flowering plants
Class	Magnoliopsida – Dicotyledons
Subclass	Asteridae
Order	Lamiales
Family	Verbenaceae – Verbena family
Genus	Vitex L. – chastetree
Species	*Vitex trifolia* L.- simpleleaf chastetree

Gambar 2. Tumbuhan *Vitex trifolia*. (a) Bunga *Vitex trifolia* (Laxmikant, 2012); dan (b) Buah *Vitex trifolia* (Orwa *et al.*, 2009)

Daun *Vitex trifolia* berkhasiat sebagai analgesik, antipiretik, obat luka, peluruh kencing, peluruh kentut, pereda kejang, germicide (pembunuh kuman), batuk kering, batuk rejan, beri-beri, sakit tenggorokan, muntah darah, obat cacing, demam nifas, sakit kepala, TBC, turun peranakan, tipus dan peluruh keringat. Penggunaan tanaman untuk pemakaian luar adalah untuk mengatasi

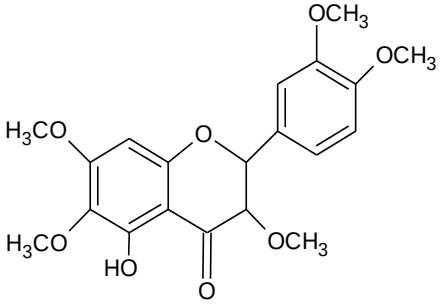
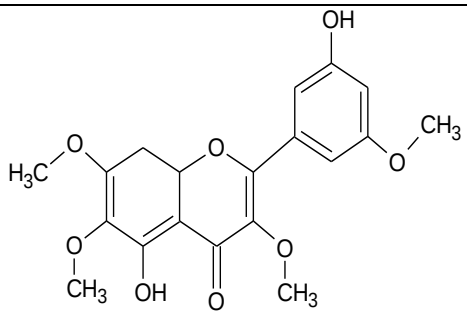
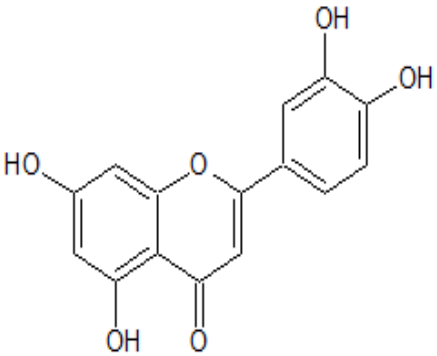
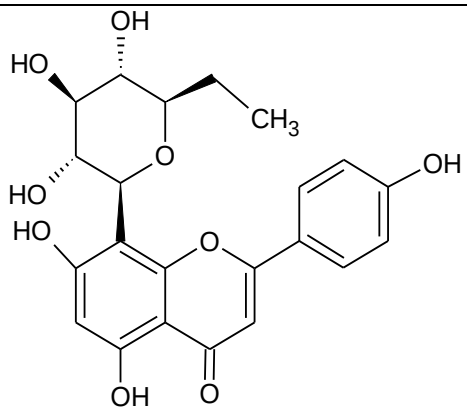
eksim dan kurap (Sudarsono *et al.,* 2002). Bunga dari *Vitex trifolia* dengan campuran madu dapat mengatasi demam yang disertai muntah (Bhattacharjee & De, 2005). Akarnya digunakan untuk antimetik, ekspektoran dan tonik. Buah dari tanaman ini juga sudah digunakan untuk *cephalic* dan peluruh haid (Kulkarni, 2011). Akarnya dapat sebagai antiemetik, ekspektoran dan tonik (Laxmikant, 2012). *Vitex trifolia* memiliki efek farmakologi yang dapat digunakan sebagai obat tradisional.

C. Fitokimia *Vitex trifolia*

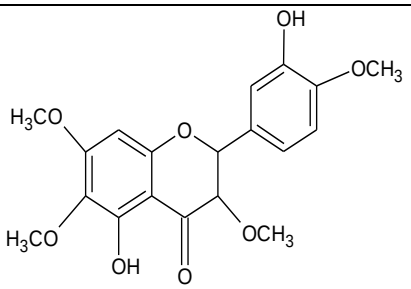
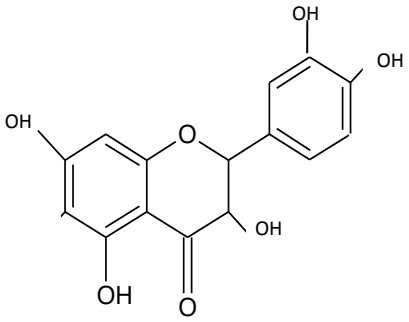
Penelitian terhadap spesies *Vitex trifolia* menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, fenol, saponin, gula, tannin, terpenoid, dan xantoprotein. Selain itu, pada ekstrak n- heksana dari daun dan batang *Vitex trifolia* juga ditemukan senyawa metabolit sekunder diantaranya fenolik, terpenoid, dan xantroprotein (Murugan & Mohan, 2012). Berdasarkan penelitian yang pernah di lakukan kandungan kimia dari buah maupun daun legundi yaitu senyawa golongan flavonoid (kastisin; 3,6,7-trimetil kuersetagetin; vitexin; artemetin; 5-metil artemetin; 7-desmetil artemetin; luteolin; luteolin-7-*O*-β-D-glukuronida; luteolin-3-*O*-β- D-glukuronida dan isoorientin), terpenoid, maupun sterol (β-sitosterol and β-sitosterol-β- D-glukosida (Nair *et al.*, 1975; Vedantham & Subramanian, 1976; Ramesh *et al.*, 1986; Zeng *et al.*, 1996). Selain itu, pada ekstrak n-heksana dari daun dan batang *Vitex trifolia* juga ditemukan senyawa metabolit sekunder diantaranya fenolik, terpenoid dan xantroprotein (Murugan & Mohan, 2012).

Senyawa golongan flavonoid adalah senyawa fenolik terbesar yang terdapat di alam. Senyawa ini merupakan zat yang berwarna merah, ungu, biru, ataupun kuning yang terdapat di dalam tumbuhan. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon,dimana dua cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propane (C_3), yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga, sehingga membentuk suatu susunan $C_6 - C_3 - C_6$ (Waji & Sugrani, 2009).

Tabel 2.Senyawa Golongan Flavonoid dari *Vitex Trifolia*

Nama Senyawa	Bagian Tumbuhan	Struktur Senyawa	Referensi
Artemetin ($C_{20}H_{20}O_8$)	Daun		Dheng *et al.*, 2011
Castisin ($C_{19}H_{20}O_8$)	Buah		Ganapaty & Vidyadhar, 2005
Luteolin ($C_{15}H_{10}O_6$)	-		Xin Li *et al.*, 2005
Viteksin ($C_{22}H_{22}O_9$)	Buah		El–Kousy *et al.*, 2012

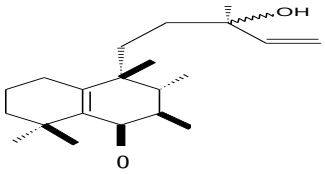
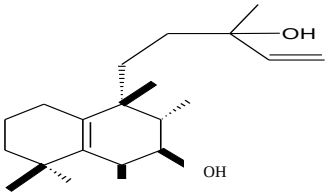
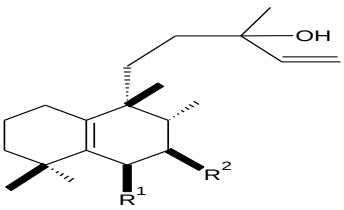
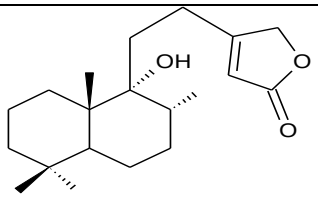
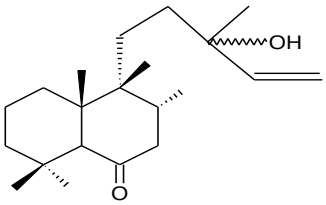
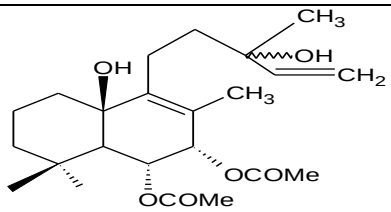
Tabel 3. Senyawa Golongan Flavonoid dari *Vitex Trifolia* (Lanjutan)

Nama Senyawa	Bagian Tumbuhan	Struktur Senyawa	Referensi
Viteksikarpin ($C_{19}H_{20}O_8$)	Daun		Ikawati, 2012
Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)	Daun		Mohamed *et al.*, 2012

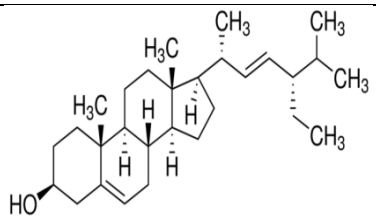
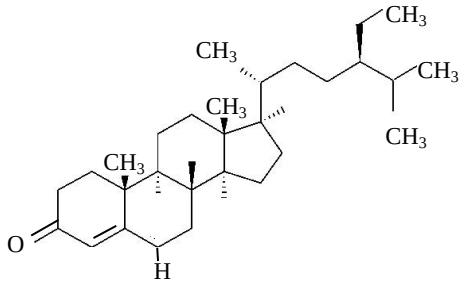
Terpenoid merupakan kelompok yang terbentuk secara alami dan menjadi senyawa mayoritas pada tanaman, beberapa terpenoid juga telah diperoleh dari sumber lain. Senyawa terpenoid adalah, senyawa metabolit sekunder yang kerangka dasar strukturnya tersusun atas karbon-karbon dengan jumlah kelipatan lima yang disebut isopren (Kristianti *et al.*, 2008). Terpenoid terdiri dari monoterpen, seskuiterpen, diterpen, triterpen, tetraterpen, dan politerpen. Senyawa golongan terpenoid dari ekstrak methanol daun *Vitex trifolia* asal India yang sudah di identifikasi pada table 4.

Steroid merupakan turunan dari senyawa jenuh siklo pentane perhidrofenantrena yang merupakan senyawa golongan lipid, yang memiliki inti 3 cincin sikloheksana terpada dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada cincin sikloheksana (Poedjiadi, 2004). Steroid tersusun dari isoprene-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar.

Tabel 4. Senyawa Golongan Terpenoid *Vitex Trifolia*

Nama Senyawa	Bagian Tumbuhan	Struktur Senyawa	Referensi
Vitetrifolin D ($C_{24}H_{28}O_5$)	Buah		Kiuchi *et al.*,2004
Vitetrifolin E ($C_{22}H_{36}O_4$)	Buah		Kiuchi *et al.*,2004
Vitetrifolin F ($C_{22}H_{36}O_4$)	Buah		Kiuchi *et al.*,2004
9- hidroksi-13(14)-labden-15,16-olide ($C_{20}H_{30}O_2$)	Daun		Tiwari *et al.*,2013
13-hidroksi-5(10),14-halimadien-6-on ($C_{20}H_{31}O_2$)	Daun		Tiwari *et al.*, 2013
6α,7α-diasetoksi-13-hidroksi-8(9),14-labdadien ($C_{24}H_{37}O_4$)	Daun		Tiwari *et al.*,2013

Tabel 5. Senyawa Golongan Steroid (Lanjutan)

Nama Senyawa	Bagian Tumbuhan	Struktur Senyawa	Referensi
Stigmasterol ($C_{29}H_{48}O$)	Buah		Tiwari *et al.*, 2013
β-sitosteron ($C_{29}H_{48}O$)	Daun		Tiwari *et al.*, 2013

Sebagian besar senyawa organik bahan alam adalah senyawa aromatik. Senyawa aromatik ini mengandung cincin karbon aromatik yang lazimnya tersubstitusi oleh satu atau lebih gugus hidroksil atau gugus lain yang ekuivalen di tinjau dari segi biogenetik. Senyawa bahan alam aromatik ini disebut senyawa fenol (Kristianti *et al.,* 2008).

D. Radikal Bebas dan Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda, menghambat atau mencegah oksidasi lipid atau molekul lain dengan menghambat inisiasi atau propagasi dari reaksi rantai oksidatif (Javanmardi *et al.,* 2003). Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil (2,01g/mol), tetapi mampu mengaktifasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel akan dihambat (Winarsi, 2011).

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis misalnya enzim superoksida dismute (SOD), katalase dan glutation peroksidase. Antioksidan non – enzimatis dibagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan larut lemak, seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin. Antioksidan non-nezimatis yang kedua adalah antioksidan larut air, seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein. Antioksidan enzimatis dan non-enzimatis bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan dalam tubuh. Terjadinya stress oksidatif dapat dihambat oleh kerja enzim-enzim antioksidan dalam tubuh dan antioksidan non-enzimatik (Winarsi, 2011).

Produksi antioksidan di dalam tubuh manusia terjadi secara alami untuk mengimbangi produksi radikal bebas. Antioksidan tersebut kemudian berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas, namun peningkatan produksi radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stress, radiasi UV, polusi udara dan lingkungan mengakibatkan sistem pertahanan tersebut kurang memadai,sehingga diperlukan tambahan antioksidan dari luar.

Antioksidan di luar tubuh dapat diperoleh dalam bentuk sintesis dan alami. 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 *butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *tertbutylhydroxyquinone* (TBHQ), asam galat dan propil galat. Antioksidan alami dapat diperoleh dari makanan sehari-hari seperti sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan dan tanaman lainnya yang mengandung antioksidan bervitamin (seperti vitamin A,C, dan E), asam – asam fenolat (seperti asam ferulat, asam klorogerat, dan asam kafeat) dan senyawa flavonoid seperti kuersetin, mirisetin,apigenin, luteolin, dan kaemferol (Rohdiana, 2001). Nutrien seperti Vitamin dan senyawa lain dapat menetralisir radikal bebas dan sebagai pertahanan tambahan.

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Clarkson and Thompson, 2000). Kebanyakan radikal bebas bereaksi secara cepat dengan atom

lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan, sehingga radikal bebas normalnya berdiri sendiri hanya dalam periode waktu yang singkat sebelum menyatu dengan atom lain. Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom (R·).ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* (O_2·), *hydroxyl radicals* (OH·), dan *peroxylradicals* (RO_2). Nonradikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* (ROOH) (Halliwell and Whiteman, 2004). Senyawa oksigen reaktif ini dihasilkan dalam proses metabolisme oksidatif dalam tubuh misalnya pada proses oksidasi makanan menjadi energi. ROS yang paling penting secara biologis dan paling banyak berpengaruh pada sistem reproduksi antara lain *superoxide anion* (O_2·$^-$), *hydroxyl radicals* (OH·), *peroxylradicals* (RO_2·) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2) (Tremallen, 2008). Bentuk radikal bebas yang lain adalah *hydroperoxyl* (HO2·), a*lkoxyl* (RO·), *carbonate* (CO_3·-), *carbon dioxide* (CO_2·-), *atomic chlorine* (Cl·), dan *nitrogen dioxide* (NO_2·) (Halliwell and Whiteman, 2004).

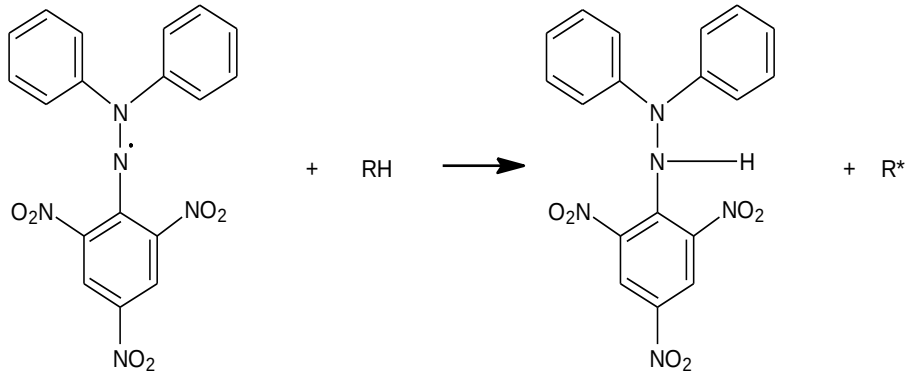
E. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517nm dengan warna violet gelap. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni, 2005).

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah 1,1-difenil- 2-pikrilhidrazil (DPPH) (Pratimasari, 2009). Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat, dan mudah untuk skrening aktivitas penangkap radikal beberapa senyawa (Koleva *et al* .,2001), selain itu metode ini terbukti akurat, reliabel dan praktis.Salah satu parameter untuk hasil dari metode DPPH, adalah konsentrasi efisien atau nilai EC_{50} (atau juga disebut nilai IC_{50})

Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Tingkat perubahan warna menunjukkan potensi antioksidan sampel. Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer, dan diplotkan terhadap konsentrasi penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH.

Peredaman warna DPPH terjadi disebabkan oleh adanya senyawa yang bisa memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2- pikrilhidrazin). Reaksi reduksi DPPH tersebut dapat dilihat pada reaksi berikut:



Gambar 3. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas (Prakash, 2001)

F. Pemisahan Senyawa secara Kromatografi

Kromatografi merupakan pemisahan suatu senyawa yang didasarkan atas perbedaan laju perpindahan dari komponen-komponen dalam campuran. Pemisahan dengan metode kromatografi dilakukan dengan cara memanfaatkan sifat-sifat fisik dari sampel, seperti kelarutan, adsorbsi, keatsirian dan kepolaran. Kelarutan merupakan kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan. Adsorpsi penjerapan adalah kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (Johnson & Stevenson, 2004). Berdasarkan jenis fasa diam dan fasa gerak yang dipartisi, kromatografi dapat digolongkan menjadi beberapa golongan (Tabel 6). Beberapa teknik kromatografi yang banyak digunakan antara lain kromatografi lapis tipis (KLT), Kromatografi kolom vakum (KVC), kromatografi kolom gravitasi, dan kromatotron.

Tabel 6.Penggolongan Kromatografi Berdasarkan Fasa Diam dan Fasa Gerak

Fasa diam	Fasa gerak	Sistem kromatografi
Padat	Cair	Cair – adsorpsi
Padat	Gas	Gas – adsorpsi
Cair	Cair	Cair – partisi
Cair	Gas	Gas – partisi

1. Kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk menentukan jumlah komponen suatu senyawa. Pemisahan terjadi karena suatu proses keseimbangan yang berturut-turut dari molekul komponen antara dua fasa, yaitu fasa diam dan fasa gerak. Perbedaan interaksi dari berbagai molekul komponen dengan fasa diam akan menyebabkan komponen bergerak dengan kecepatan yang berbeda, hingga komponen tersebut terpisah satu sama lain. Fasa diam yang biasa digunakan dalam KLT adalah serbuk silika gel, alumina, tanah diatomae, selulose dan lain-lain yang mempunyai ukuran butir sangat kecil yaitu 0,063–0,125 mm dan dilapiskan pada kaca, lembar Al atau plastik dengan ketebalan tertentu (Gritter *et al.*, 1991). KLT mempunyai dua tujuan dalam penggunaannnya. Pertama, KLT dipakai sebagai metode untuk mencari hasil kualitatif dan kuantitatif. Tujuan kedua untuk menjajaki pelarut yang akan dipakai pada kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi.

Pemilihan eluen yang cocok mendeteksi jumlah komponen yang berada dalam ekstrak kasar yang terpisah berdasarkan Rf dari masing-masing senyawa. Pemilihan eluen dimulai dari pelarut organik yang tidak polar seperti heksana kemudian meningkatkan kepolaran misalnya dengan etil asetat atau pelarut yang lebih polar lainnya. Sampel dalam jumlah sangat kecil ditotolkan menggunakan pipas kapiler di atas permukaan plat tipis fasa diam (adsorbent) di dalam analisis dengan KLT. Kemudian plat diletakkan dengan tegak dalam bejana pengembang yang berisi sedikit pelarut pengembang. Sifat-sifat pelarut juga merupakan faktor dominan dalam penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Umumnya kemampuan suatu pelarut untuk menggerakkan senyawa pada suatu adsorben berhubungan dengan polaritas pelarut. Kemampuan ini disebut kekuatan elusi, dan

urutan kekuatan elusi beberapa pelarut yaitu air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksan> petroleum eter. Identifikasi senyawa yang telah terpisah pada lapisan tipis dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi penampak noda maupun dideteksi menggunakan lampu UV (356nm) untuk senyawa-senyawa yang dapat menyerap warna. Metode sederhana dalam KLT adalah dengan menggunakan nilai Retardation faktor (Rf) yang didefinisikan dengan persamaan :

$$RF = \frac{Jarak\ yang\ digerakkan\ oleh\ senyawa}{Jarak\ yang\ digerakkan\ oleh\ permukaan\ pelarut}$$

Tetapi pada gugus-gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunannya mirip, seringkali harga Rf berdekatan satu sama lainnya.

1. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Teknik KCV dilakukan dengan suatu sistem yang bekerja pada kondisi vakum secara terus-menerus sehingga diperoleh kerapatan kemasan yang maksimum atau menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju alir fasa gerak.Urutan eluen yang digunakan dalam kromatografi cair diawali dari eluen yang mempunyai tingkat kepolaran rendah kemudian kepolarannya ditingkatkan secara perlahan-lahan.Urutan eluen yang digunakan dalam kromatografi diawali dari eluen yang mempunyai tingkat kepolaran rendah kemudian kepolarannya ditingkatkan secara perlahan-lahan.

Kromatografi vakum cair digunakan untuk fraksinasi ekstrak total secara cepat. Teknik ini dapat dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi yang dihubungkan dengan pompa vakum, dengan isian kolom silica gel (10-40µm). Hasil pemisahan dari kromatografi vakum cair adalah fraksi fraksi yang dapat dikelompokkan menjadi kelompok senyawa ”non polar, semi polar dan polar”. Kromatografi vakum cair merupakan modifikasi dari kromatografi kolom gravitasi. Metode ini lebih banyak digunakan untuk fraksinasi sampel dalam jumlah besar (10-50gram). Kolom yang digunakan biasanyan terbuat dari gelas dengan lapisan berpori pada bagian bawah.

Ukuran kolom bervariasi tergantung ukurannya. Kolom disambungkan dengan penampung eluen yang dihubungkan dengan pompa vakum. Pompa vakum akan menghisap eluen dalam kolom, sehingga proses pemisahan berlangsung lebih cepat. Penggunaan tekanan dimaksudkan agar laju aliran eluen meningkat sehingga meminimalkan terjadinya proses difusi karena ukuran silika gel yang biasanya digunakan pada lapisan kromatografi lapis tipis sebagai fasa diam dalam kolom yang halus yaitu 200-400mesh. Kolom yang digunakan berukuran lebih pendek dari pada kolom kromatografi gravitasi dengan diameter yang lebih besar (5-10cm). Kolom KVC dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Sampel yang akan dipisahkan biasanya sudah diadsorbsikan ke dalam silika kasar terlebih dahulu (ukuran silika kasar 30-70mesh) agar pemisahannya lebih teratur dan menghindari sampel langsung menerobos ke dinding kaca tanpa melewati adsorben terlebih dahulu, yang dapat berakibat gagalnya proses pemisahan. Pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap yang sebelumnya sudah dimasukkan sampel. Kolom dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dengan pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi, sehingga kromatografi vakum cair disebut juga kolom fraksinasi.

2. Kromatografi Radial (Kromatotron)

Kromatografi radial adalah salah satu teknik kromatografi klasik dengan aliran fasa gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Alat kromatografi radial yang sering dipakai adalah kromatotron. Kromatotron memiliki rotor yang miring dan pelat kaca bundar bergaris tengah 24 cm yang dilapisi dengan adsorben yang cocok sehingga terbentuk lapisan tipis untuk pemisahan preparatif. Oleh karena itu, teknik kromatografi radial ini mampu memisahkan sampel hingga benar-benar murni (Kristanti *et al.*, 2008). Rotor pada kromatotron terdapat dalam ruang yang tertutup pelat kaca kuarsa. Dengan adanya penutup ini memungkinkan untuk mengamati pita yang tak berwarna tetapi dapat menyerap sinar UV dengan

menggunakan lampu UV. Proses elusi akan menghasilkan pita-pita yang berupa lingkaran. Tepi pelat pita-pita akan terputar keluar dan ditampung dalam tabung penampung, kemudian dianalisis lebih lanjut (Kristanti *et al* ., 2008).

G. Identifikasi Senyawa dan Penentuan Struktur

Suatu senyawa bahan alam hasil isolasi akan diidentifikasi berdasarkan kimia, fisika dan identifikasi dengan spektroskopi. Dari isolasi yang dengan menggunakan metoda standar tidak semua senyawa akan secara utuh seperti yang terdapat dalam tumbuhan tersebut, karena sebagian senyawa ada yang terlarut dan terpecah selama proses isolasi dan hasil terjadi seperti putusnya ikatan glikosida membentuk aglikon dan gula dengan adanya air. Identifikasi senyawa metabolit sekunder dan elusidasi struktur senyawa ditemukan merupakan pekerjaan yang sangat menentukan dalam proses mengenal, mengetahui dan pada akhirnya menetapkan rumus molekul yang aebenarnya dari senyawa tersebut. Diantara metode identifikasi dan elusidasi struktur yang diperoleh dapat dilakukan dengan metoda standar yang sudah dikenal untuk menentukan senyawa kimia dan termasuk derivat-derivatnya antara lain: Metode Spektroskopi (Silverstein *et al.*, 1991)

Metoda spektroskopi saat ini sudah merupakan metoda standar dalam penentuan struktur senyawa organik pada umumnya dan senyawa metabolit sekunder pada khususnya. Metoda tersebut terdiri dari beberapa peralatan dan mempunyai hasil pengamatan yang berbeda, yaitu

1. Spektrum UV

   Merupakan metoda yang akan memberikan informasi adanya kromofor dari senyawa organik dan membedakan senyawa aromatik atau senyawa ikatan rangkap yang berkonjugasi dengan senyawa alifatik rantai jenuh.

2. Nuklir Magnetik Resunansi Proton

Metoda ini akan mengetahui posisi atom-atom karbon yang mempunyai proton atau tanpa proton. Disamping itu akan dikenal atom-atom lainnya yang berkaitan dengan proton

3. Nuklir Magnetik Kesonansi Isotop Karbon 13

Digunakan untuk mengetahui jumlah atom karbon dan menentukan jenis atom karbon pada senyawa tersebut.

4. Spektroskopi massa

Mengetahui berat molekul senyawa dan ditunjang dengan adanya fragmentasi ion molekul yang menghasilkan pecahan-pecahan spesifik untuk suatu senyawa berdasarkan m/z dari masing-masing fragmen yang terbentuk. Terbentuknya fragmen-framen dengan terjadinya pemutusan ikatan apabila disusun kembali akan dapat menentukan kerangka struktur senyawa yang diperik.

BAB III
METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia FMIPA UNJ Jakarta Timur, yang dilakukan mulai November 2016 sampai Juni 2017.

B. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi metode eksplorasi yang meliputi: partisi fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn dengan berbagai teknik kromatografi, antara lain kromatografi vakum cair (KVC) kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi radial (kromatotron). Senyawa murni yang di peroleh ditentukan struktur molekulnya dengan spektroskopi UV dan ^{1}H-NMR, lalu diuji aktivitas antioksidannya dengan metode penangkapan radikal DPPH.

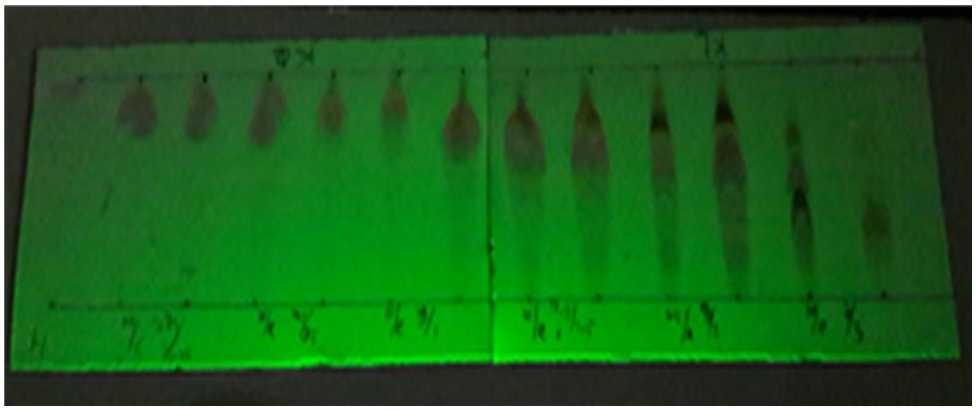
1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan yaitu, neraca analitik, peralatan Kromatografi Vakum Cair (KVC), alat penguap vakum putar/*rotary evaporator* (EYELA USA N-1001-S-WD, Cat Num 216959), *magnetic stirrer* (IKA C-MAG HS 7), lampu UV, peralatan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Instrumen yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu,UV Biospec-1601), Spektrometer ^{1}H-NMR (JEOL JMN A 5000, 500MHz) di Institut Teknologi Bandung, Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn. Yang diperoleh dari penelitian sebelumnya dengan massa total 10 gram. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, berbagai pelarut dengan kualifikasi teknis yang telah didestilasi (n-heksana, aseton, dan etil asetat), dan silika gel (Merck Cat. Num 105553) sebagai fasa diam dalam kromatografi. Uji aktivitas antioksidanmenggunakan reagen 1,1-difenil-pikrilhidrazil, asam askorbat (Merck milipore Cat. Num 1531) dan BHT (BratacoChem)

2. Prosedur Penelitian

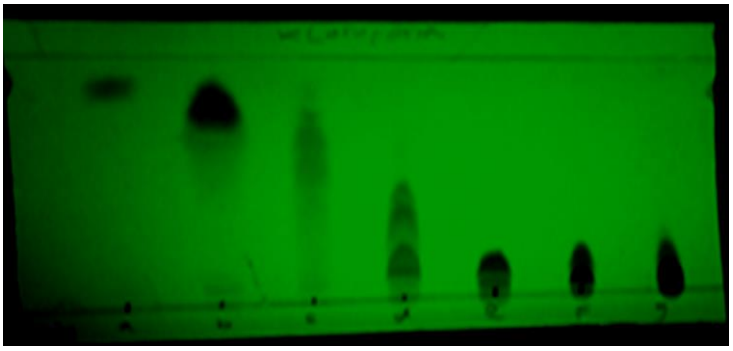
A. Pemisahan Fraksi N-Heksana

Fraksi N-Heksana daun *Vitex trifolia* dipisahkan dengan teknik Kromatografi Vakum Cair (KVC) menggunakan fasa diam berupa silica gel serta fasa geraknya berupa campuran eluen n-heksana : etil asetat yang dielusi secara SGP (*Step Gradient Polarity*) dari n-heksana 100%, n-heksana : etil asetat (9.75:0.25), n-heksana : etil asetat (9.5:0.5), n-heksana : etil asetat (9:1), n-heksana : etil asetat (8.5:1.5), n-heksana : etil asetat (8:2) dan n-heksana : etil asetat (7:3) sehingga di perolah 13 fraksi utama yaitu fraksi 1 (142,5mg); fraksi 2 (593,8mg); fraksi 3 (535,3mg); fraksi 4 (372,1mg); fraksi 5 (594,1mg); fraksi 6 (584,2mg); fraksi 7 (903,2mg); fraksi 8 (647,8 mg); fraksi 9 (972.2mg); fraksi 10 (522,7mg); fraksi 11 (752,4mg); fraksi 12 (491,6mg); fraksi 13 (867,5 mg). Hasil pemisahan dimonitoring dengan KLT dengan eluen kloroform 100%. Selanjutnya, fraksi-fraksi dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan menggunakan teknik kromatografi radial.



Gambar 4. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi N-Heksana *Vitex Trifolia*

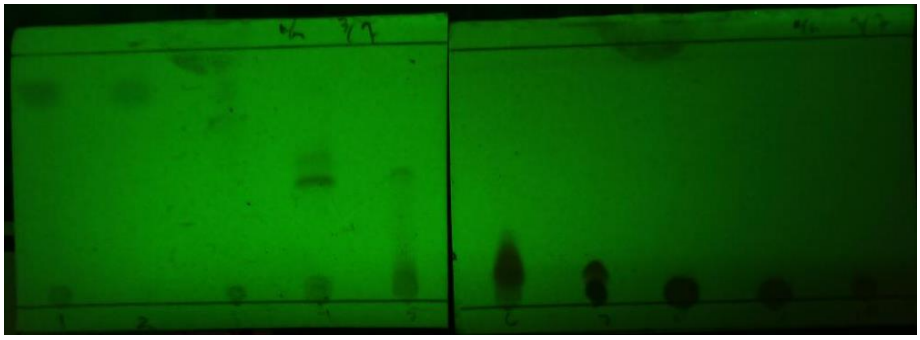
Kemudian berdasarkan nilai Rf yang sama dan dihasilkan 7 fraksi yaitu fraksi A (111,6mg) ; fraksi B (1.393,7mg); fraksi C (1.569,9mg); fraksi D (2.322,5mg); fraksi E (1.105,5mg); fraksi F (490,1mg); fraksi G (274,6mg). Kemudian hasil penggabungan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen K/H 1:1.



Gambar 5. Kromatogram Hasil Penggabungan Fraksi N-Heksana *Vitex Trifolia*

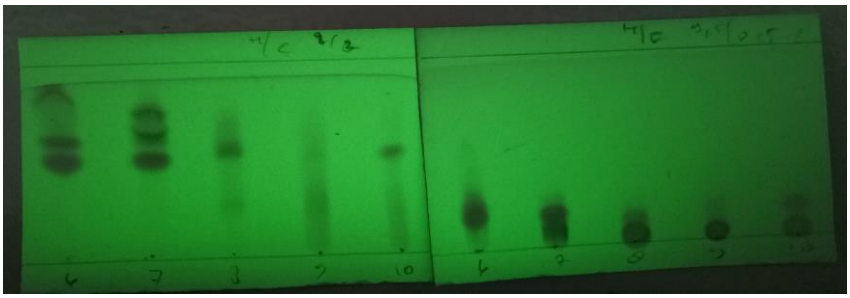
B. Pemisahan Fraksi E

Fraksi E (1.1055 g) selanjutnya di lakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi vakum cair (KVC). Pemisahan fraksi E menggunakan eluen Klorofrom : n-heksana (8:2) sampai dengan klorofrom : n-heksana (1:1) yang kepolarannya di tingkatkan secara perlahan. Hasil pemisahan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen klorofrom:n-heksana (3:7) dan menghasilkan 10 fraksi, yaitu E_1 (37,1mg); E_2 (38,7mg); E_3 (76mg); E_4 (5mg); E_5 (78 mg); E_6 (180,7mg); E_7 (307,6mg); E_8 (297,6mg); E_9 (207,1mg)' E_{10} (215,8mg).



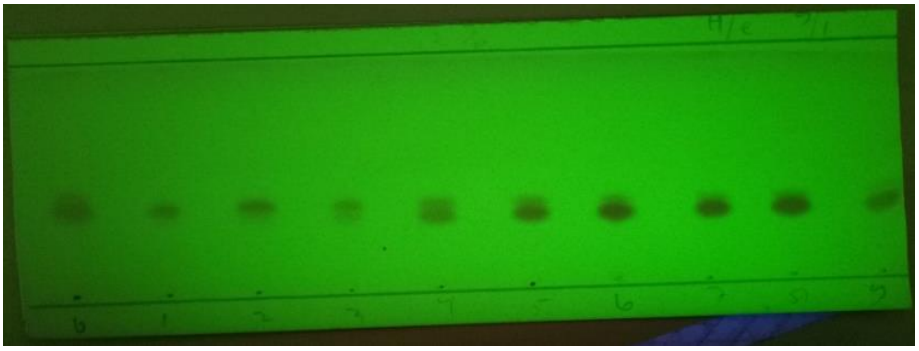
Gambar 6. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi E *Vitex Trifolia* dengan Eluen Klorofrom: N-Heksana (3:7)

Karena menggunakan eluen klorofrom : n-heksana tidak terjadi kenaikan maka eluen untuk KLT di ganti dengan n-heksana : etil asetat dan melakukan KLT ulang untuk fraksi E_6 - E_{10} dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:8).



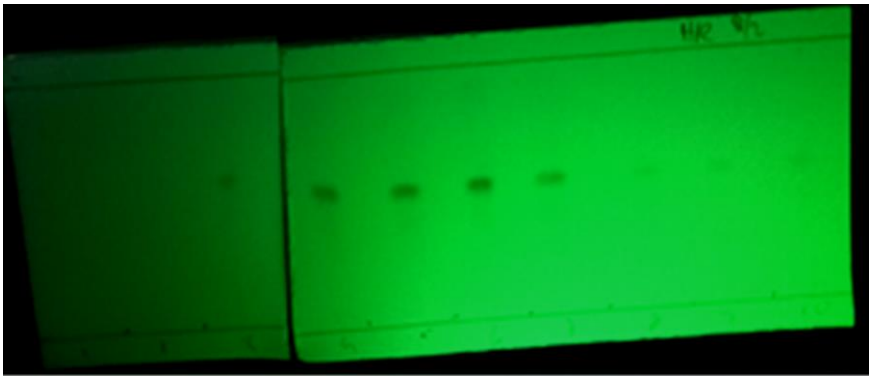
Gambar 7. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi E *Vitex trifolia* dengan Eluen Etil asetat N-Heksana (2:8)

Selanjutnya dilakukan pemisahan pada fraksi E_g dengan kromatografi radial menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (9.5:0.5). Hasil dari pemisahan dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) dan menghasilkan 10 fraksi yaitu E_{g1} (1,5mg); E_{g2} (5mg); E_{g3}(5,2mg); E_{g4} (1,5mg); E_{g5} (6,3mg); E_{g6}(16,8mg); E_{g7}(17,6mg); E_{g8}(17,4 mg); E_{g9}(46,8mg); E_{g10}(53,4mg).



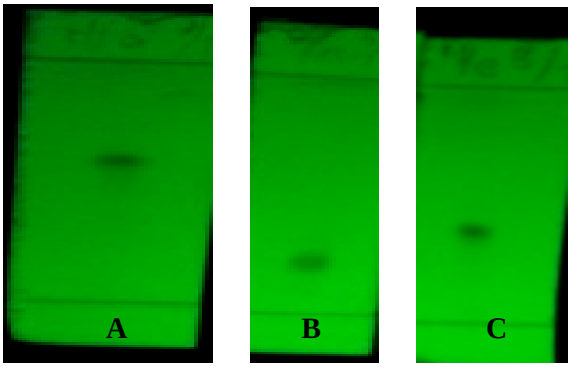
Gambar 8. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi Eg *Vitex Trifolia* dengan Eluen N- Heksana etil asetat (8:2)

Selanjutnya dari fraksi E_{g910} digabung untuk dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kromatografi radial dengan eluen n-heksana : etil asetat (9:1). Hasil dari pemisahan tersebut dimonitoring dengan KLT dengan eluen n-heksana: etil asetat (8,5:1,5) dan menghasilkan 10 fraksi utama, yaitu $E_{g\ 9\text{-}10a}$ (6.43mg); $E^{g}_{\ 9\text{-}10b}$ (7.18mg); $E_{g\ 9\text{-}10c}$ (7.86mg); $E_{g\ 9\text{-}10d}$ (8.20mg); $E_{g\ 9\text{-}10e}$ (8.35mg); $E_{g\ 9\text{-}10f}$ (6.35mg); $E_{g\ 9\text{-}10g}$ (6.56mg); $E_{g\ 9\text{-}10h}$ (7.19mg); $E_{g\ 9\text{-}10i}$ (8.18mg); $E_{g\ 9\text{-}10j}$ (6.54mg).



Gambar 9. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi Eg *Vitex Trifolia* dengan Eluen N-Heksana etil asetat (8:2)

Hasil kromatogram pada gambar menunjukkan fraksi $E_{g\ 9\text{-}10\ 7}$ (4.56mg) sudah memiliki spot tunggal, sehingga untuk memastikannya dilakukan uji kemurniandengan sistem 3 eluen dari fraksi-fraksi tersebut. Fraksi $E_{g\ 9\text{-}10\ 7}$ diuji dengan eluen n-heksana:klorofrom (7:3), n-heksana : etil asetat (8:2), n-heksana : aseton (9:1).



Gambar 10. Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Senyawa Isolat fraksi $E_{g9\text{-}107}$ dengan eluen a) N-Heksana : etil asetat (8:2), b) klorofrom : N-Heksana (7:3), c) N-Heksana:aseton (9:1).

3. Tahapan Identifikasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan data data spektroskopi UV-Vis, dan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* ^{1}H-NMR.

C, Teknik Pengumpulan dan Analisa Data

1. Nilai IC_{50}

Setelah persen aktivitas antioksidan di peroleh, selanjutnya ditentukan nilai IC_{50} pada semua sistem. Nilai IC_{50} dapat diketahui dengan membuat grafik hubungan antara log konsentrasi sampel dengan persen aktivitas antioksidan, dimana log Konsentrasi sampel (ppm) sebagai sumbu x dan persen antivitas antioksidan (%) sebagai sumbu y. Nilai IC_{50}, dapat ditentukan berdasarkan grafik dengan menggunakan program Interactive Chart Design Data VBA (Add-In Software For Microsoft Excel 2013).

2. Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil pikrilhidrazil). Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian dibuat dengan konsentrasi berbeda yaitu, 12,5ppm, 25ppm, 50ppm, dan 100ppm. Kemudian 1ml 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 di ukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 517nm. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Perlakukan yang sama juga dilakukan terhadap asam askorbat dan BHT sebagai control positif sedangkan untuk kontrol negatif campuran metanol tanpa sampel dengan DPPH. Data aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen yang dihitung dengan rumus sebagai berikut.

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

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

Tabel 7. Data Pengamatan Absorbansi Sampel dan Standar

Konsentrasi Asam Askorbat Standar (ppm)	**Abs**	**Konsentrasi BHT Standar(ppm)**	**Abs**	**Konsentrasi Sampel (ppm)**	**Abs**
10		10		10	
20		20		20	
40		40		40	
80		80		80	
Metanol					
DPPH					

Keterangan

Standar : BHT dan Asamaskorbat

Sampel : Larutan sampel dari senyawa murni hasil isolasi dari fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan

Pemisahan terhadap Fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi radial (kromatotron) dengan menggunakan eluen tertentu sehingga mendapatkan senyawa murni. Penentuan struktur terhadap senyawa hasil isolasi ditentukan dengan menganalisa data spektroskopi UV-Vis, ^{1}H-NMR. Dengan metode NMR akan mendapatkan informasi jumlah proton dan karbon.

1. Senyawa Isolat

Senyawa isolat yang diperoleh berupa kristal putih. Data spektrum UV senyawa isolat menunjukkan adanya serapan maksimum pada λ_{maks} $205nm - 270nm$ hal ini menunjukkan adanya sistem alkena yang tidak terkonjugasi. Hal ini diperkuat dengan hasil data ^{1}H-NMR.

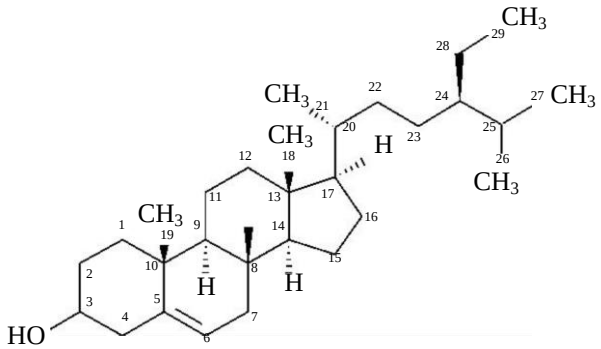
Data spektrum ^{1}H-NMR (500MHz) menggunakan pelarut $CDCL_3$. Menunjukkan adanya enam sinyal metil (CH_3) yang muncul sebagai dua metil singlet pada pergeseran δ_h 0,68 ppm dan pergeseran δ_h 1,01 ppm, tiga sinyal proton metil doublet (CH_3) yang muncul pada pergeseran δ_h 0.80 ppm, 0,83 ppm dan 0,94 ppm. Satu sinyal proton olefin (ikatan rangkap tak jenuh) pada pergeseran δ_h 5,36ppm (J=6.5Hz). Sinyal proton doublet pada pergeseran δ_h 3,52 ppm yang sesuai dengan proton pada gugus hidroksi di C-3. Sehingga dugaan sementara, Senyawa isolat memiliki 6 sinyal metil (CH_3) dan satu proton olefin (ikatan rangkap tak jenuh) pada cincin sikloheksana A senyawa steroid.

Data spektra UV senyawa isolat menunjukkan adanya serapan maksimum pada λ_{maks} $205nm - 270nm$. Untuk memperkuat dugaan bahwa senyawa isolat merupakan senyawa steroid, data ^{1}H-NMR senyawa dari hasil isolasi dibandingkan dengan senyawa β-Sitosterol dari Literatur.

Tabel 8. Perbandingan Data Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa Isolat

Posisi	Isolat	Literatur (Venkata *et al.*, 2012)
3	3.52 (d, 1H)	3.53 (tdd,1H,J=4.5, 4.2, 3.8Hz)
4	5.36(t, 1H, J=6.5Hz)	5.36 (t, 1H, J=6.4Hz)
19	0.93 (d, 3H,6.3Hz)	0.93 (d, 3H,J=6.5Hz)
24	0.84 (t, 3H,6.9Hz)	0.84 (t, 3H, J=7.2 Hz)
26	0.83 (d,3H, J=5.9Hz)	0.83 (d, 3H, J=6.4 Hz)
27	0.81 (d, 3H, J=6.0Hz)	0.81(d, 3H, J=6.4 Hz)
28	0.68 (s, 3H)	0.68 (s, 3H)
29	1.01 (s), 3H	1.01 (s, 3H)

Hasil perbandingan data ^{1}H-NMR dari senyawa hasil isolasi dan berdasarkan literature memperlihatkan data yang identik. Sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa β-Sitosterol.



Gambar 11. Struktur Senyawa Isolat (β-Sitosterol)

B. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap Senyawa Hasil Isolasi

1. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Uji Aktivitas Antioksidan yang dilakukan yaitu menggunakan radikal bebas 1,1-difenil pikrilhidrazil (DPPH). Metode ini sering digunakan karena sederhana,mudah,sensitif dan menggunakan sampel yang sedikit. Prinsip dari metode ini yaitu penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan sampel yang mentransferkan elektron ke radikal DPPH (2,2-difenil-1-Pikrilhidrazil) dan

mengubahnya menjadi molekul DPPH-H (difenil-1-pikrilhidrazil) yang stabil. Metode ini, dilakukan terhadap senyawa-senyawa hasil isolasi metabolit sekunder pada fraksi n-heksana.

Proses ini, senyawa isolat yang di dapatkan kemudian direaksikan dengan DPPH mengalami perubahan warna larutan setelah diinkubasi selama 30 menit. Setelah diinkubasi isolat akan mengalami perubahan warna larutan dari warna ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini terjadi karena DPPH bereaksi dengan senyawa isolat yang berperan sebagai antioksidan. Kemampuan sampel dengan donor elektron yang tinggi akan menghasilkan warna larutan yang semakin cerah, sebanding dengan kemampuan aktivitas antioksidannya yang semakin tinggi.

(a) (b)

Gambar 12. Warna Larutan Asam Askorbat pada 100ppm (a) Sebelum Inkubasi (b)Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 13. Warna Larutan Asam Askorbat pada 50 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 14. Warna Larutan Asam Askorbat pada 25ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 15. Warna Larutan Asam Askorbat pada 12,5ppm (a) Sebelum Inkubasi (b)Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 16. Warna Larutan BHT pada 100 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 17. Warna Larutan BHT pada 50 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

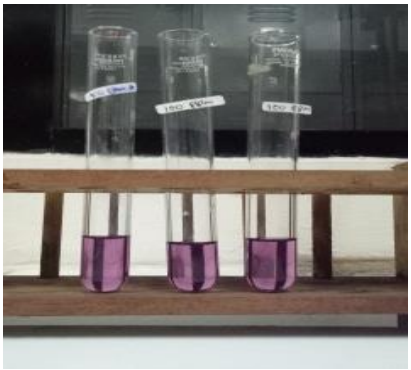
(a) (b)

Gambar 18. Warna Larutan BHT pada 25 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) **(b)**

Gambar 19. Warna Larutan BHT pada 12,5 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

Hasil dari uji DPPH yang sudah di lakukan pada larutan standar menunjukkan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning.Perubahan yang signifikan terjadi pada asam askorbat dan BHT. Hal ini terjadi kerena asam askorbat dan BHT memiliki kemampuan mendonor elektron yang lebih baik. Jika dibandingkan dengan asam askorbat dan BHT, intensitas warna yang dihasilkan asam askorbat lebih kuning dibandingkan BHT hal tersebut menandakan kemampuan aktivitas antioksidan berdasarkan transfer elektron asam askorbat lebih baik di banding BHT. Sedangkan hasil uji aktivitas antioksidan pada senyawa isolat dapat dilihat pada gambar selanjutnya.



(a) (b)

Gambar 20. Warna Larutan Isolat pada 100ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 21. Warna Larutan Isolat pada 50ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) (b)

Gambar 22. Warna Larutan Isolat pada 25ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

(a) **(b)**

Gambar 23. Warna Larutan Isolat pada 12,5 ppm (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi 30 menit

Jika di lihat dari perubahan warna yang terjadi pada sampel senyawa isolat tidak terjadi perubahan warna yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel isolat tidak berpotensi sebagai antioksidan. Selanjutnya dilakukan pengukuran data dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada sampel BHT, asam askorbat, senyawa isolat. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 517nm, sebagai panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Hasil dari pengukuran tersebut sebagai berikut:

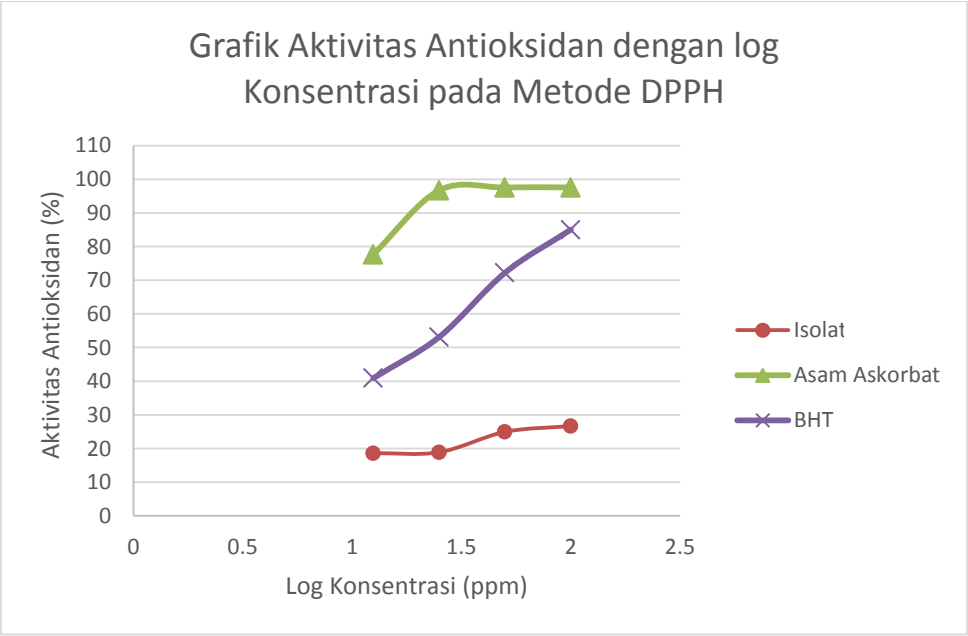
Tabel 9. Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan pada metode DPPH

Larutan	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Konsentrasi Rerata	Aktivitas Antioksidan (%)
		Abs1	Abs2	Abs3		
Kontrol					0.668	
Isolat	12.5	0.513	0.551	0.567	0.544	18.61
	25	0.523	0.546	0.556	0.542	18.91
	50	0.514	0.523	0.467	0.501	24.95
	100	0.544	0.472	0.453	0.490	26.70
Asam Askorbat	12.5	0.148	0.147	0.152	0.149	77.69
	25	0.028	0.022	0.016	0.022	96.71
	50	0.015	0.015	0.019	0.016	97.55
	100	0.014	0.020	0.015	0.016	97.55
BHT	12.5	0.403	0.387	0.394	0.395	40.92
	25	0.301	0.304	0.334	0.313	53.14
	50	0.230	0.150	0.177	0.186	72.21
	100	0.096	0.099	0.105	0.100	85.03

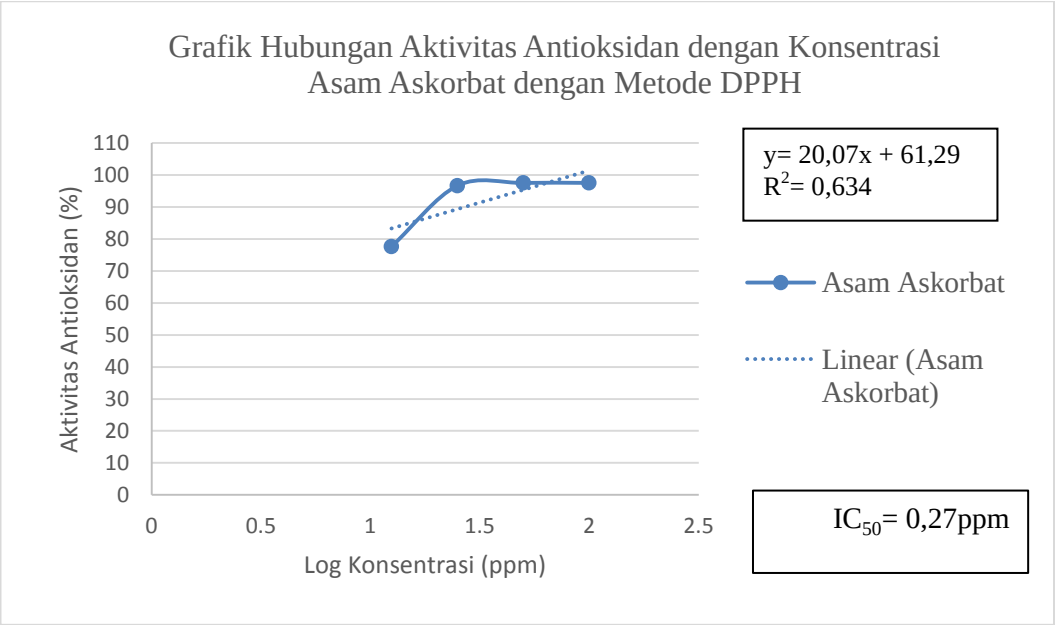
Tabel 9 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi pada sampel maka semakin kecil pula nilai absorbansi yang didapatkan. Nilai absorbansi yang kecil dikarenakan kemampuan sampel untuk mendorong elektronnya untuk mengubah radikal DPPH semakin kuat, sehingga semakin banyak senyawa DPPH-H yang terbentuk akan lebih stabil, dan membuat perubahan warna yang semakin cerah. Hasil dari perubahan tersebut terbukti dengan persentase uji aktivitas antioksidan yang semakin tinggi. Kemudian, dari data absorbansi dibuat grafik hubungan aktivitas antioksidan dengan persen aktivitas antioksidan pada sumbu x sedangkan log konsentrasi pada sumbu y. Hasil perbandingan tersebut ditunjukkan pada gambar 24.

Grafik tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan standar lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat. Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan juga dari nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration*). Kemudian untuk mengetahui nilai IC_{50} dari asam askorbat, BHT, senyawa isolat , diketahui dengan persamaan garis linier yang didapatkan. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi

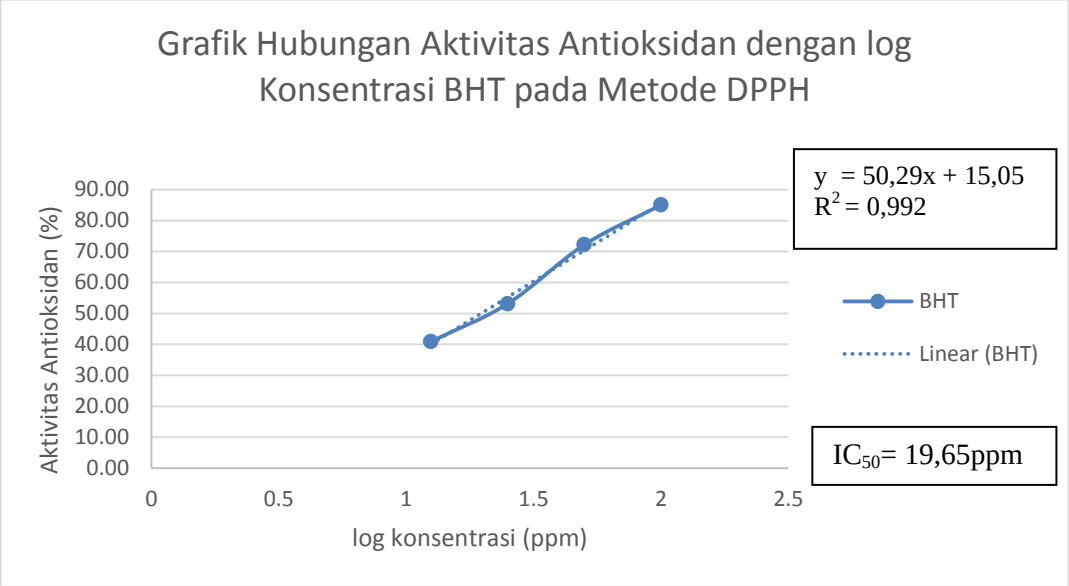
suatu zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan 50% radikal (Molyneux, 2004).



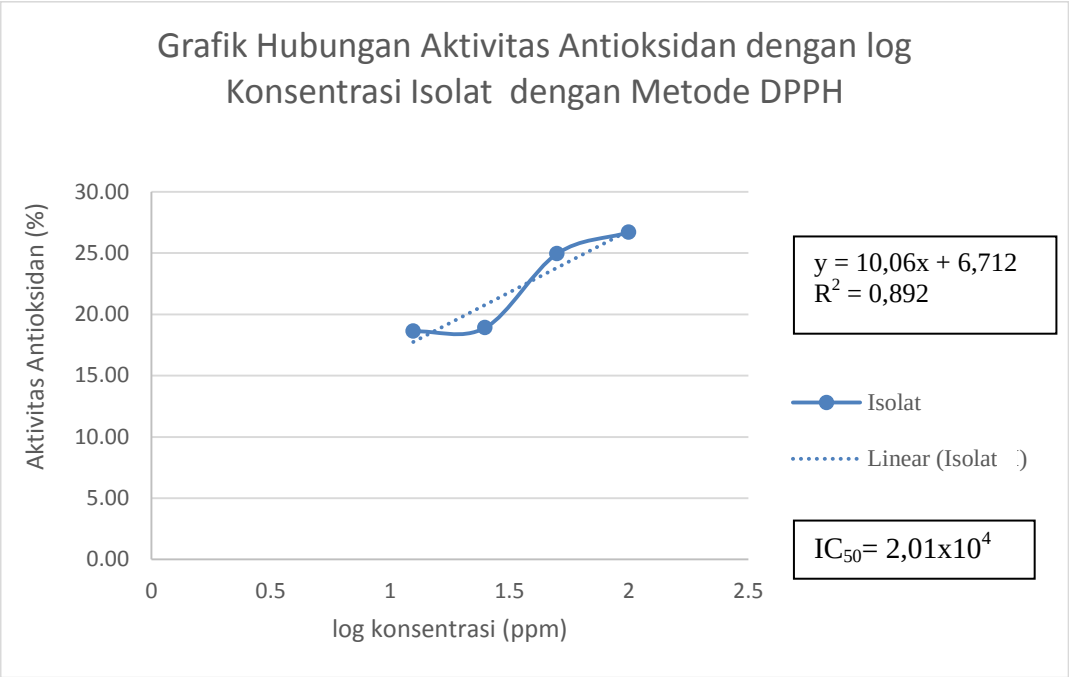
Gambar 24. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan log Konsentrasi Sampel pada Metode DPPH



Gambar 25. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Konsentrasi Asam Askorbat Pada Metode DPPH



Gambar 26. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi pada BHT Metode DPPH



Gambar 27. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi pada Metode DPPH

Berdasarkan persamaan regresi linier pada grafik aktivitas antioksidan dengan konsentrasi antara larutan standardan isolat pada metode DPPH, maka dapat diketahui nilai IC_{50} pada masing – masing sampel yaitu:

Tabel 10. Nilai IC_{50} pada sampel standar dan sampel

Sampel	**Nilai IC_{50} (ppm)**	**Potensi Antioksidan**
Asam Askorbat	0,27	Kuat
BHT	19.65	Kuat
Isolat	2.01×10^4	Lemah

Berdasarkan hasil nilai IC_{50} yang di dapatkan larutan standar yaitu asam askorbat dan BHT keduanya memiliki nilai IC_{50} yang kecil, maka semakin rendah nilai IC_{50} yang didapatkan maka semakin kuat kemampuan antioksidannya. Hal ini menunjukkan BHT dan asam askorbat kemampuan aktivitas antioksidannya yang sangat tinggi, sedangkan pada senyawa isolat memiliki nilai IC_{50} yang tinggi.

Tabel 11. Tingkat Kekuatan Antioksidan dengan Metode DPPH (Hidajat, 2005)

Nilai IC_{50}	Kekuatan Antioksidan
<50ppm	Kuat
50-100ppm	Sedang
>100ppm	Lemah

Urutan sampel yang memiliki potensi antioksidan diurutkan dari yang paling berpotensi yaitu:

Asam Askorbat > BHT > Isolat

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari fraksi n-heksana daun *Vitex trifolia* Linn Asal Demangan Baru Yogyakarta dapat diperoleh kesimpulan, yaitu:

1. Hasil Isolasi dan Analisis spektrum UV, dan ^{1}H-NMR diperoleh satu senyawa , yaitu β-Sitosterol
2. Hasil Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahan nilai IC_{50} dari isolat yaitu $2.01x10^{4}$ppm
3. Senyawa isolat yang didapatkan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat rendah.

B. Saran

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

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode lain untuk melihat potensi antioksidan senyawa isolat tersebut.
2. Perlu dilakukan uji bioaktivitas lain terhadap senyawa hasil isolasi yang diperoleh
3. Melakukan isolasi dari bagian lagi dari *Vitex trifolia* Linn

DAFTAR PUSTAKA

Arts, M. J., Haenen, G. R., Voss, H. P., Bast A. 2004. Antioxidant Capacity of Reaction Products Limits the Applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chem Toxicol* 42: 45–49.

Azhar-ul-Haq, A. M., Anwar-ul-haq, Khan, S. B., Ahmad, A., & Choudharya, M. I. 2006. Tyrosinase Inhibitory Lignans from the Methanol Extract of the Roots of *Vitex negundo Linn*. And Their Structure- Activity Relationship. *Phytomedicine* 13: 255-260.

Bhattacharjee, S.K and L.C De, 2005. Post-Harvest *Technology of Flowers and Ornamental Plants*. Pointer Publisher. Jaipur. 440p.

Clarkson, P.M, Thomson, H.S. 2000. *Antioxidants: What Role do they Play in Physical Activity and Health, Am J Clin Nutr*. 729 :637-346.

Dalimartha, S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Pustaka Bunda.

Dheng, Y., Chin, Y., Chai, H., De Blanco, EC., Kardono, L., Riswan, S., Soejarto, D., Farnsworth, N., Kinghom, A.2011. Phytochemical and Bioactivity Studies on Constituents of the Leaves of *Vitex trifolia. Phytochemistry Letters*, 4: 213-217

El-Kousy, S., Mohamed, M., Mohamed, S. 2012. Phenolic and Biological Activities of *Vitex trifolia* Aerials Parts. *Life Science Journal*. *9* (2), 670-677.

Ganapaty, S., Vidyadhar, K. 2005. Phytoconstituent and Biological Activities of Vitex – A Review. *Journal of Natural Remedies*, 5(2), 75- 95.

Gritter, R.J, Bobbit J.M, Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*, Ed.Ke-2. Kosasih Padmawinata., penerjemah. Bandung: ITB

Halliwel, B and Gutteridge, J.M.C. 2011. *Free Radikal in Biology and Medicine. 3rd ed.* Oxford University Press. Oxford, UK. 23-31. 105-115.

Halliwell, B., Whiteman, M. 2004. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should you do it and What do the Results Mean. *British Journal of Pharmacology.* 142: 231-255

Hariana, H. A. 2009. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya.* Jakarta: Penebar Swadaya.

Hidajat, B. 2005. *Penggunaan Antioksidan Pada Anak. Artikel Kimia.* Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Ikawati P. 2012. *Mengenal Legundi, Herbal Anti alergi.* http://www.asma.web.id/index.php/asma/44-artikel-kesehatan/120-mengenal-legundi-herbal-anti-alergi.html diakses tanggal [25 juni 2017]

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant Activity and total Phenolic Content of Iranian *Ocimum Accessions. J Agric Food Chem*. 83: 547-550.

Johnson, E.L., Stevenson, R., 2004, *Dasar Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Penerbit ITB Bandung.

Kiuchi, F., Matsuo, K., lto, M., Qui, T. K., & Honda, G. 2004. New Norditerpenoids with Trypanocidal Activity from *Vitex trifolia*. Chem.*Pharm Bull*, 52(12), 1492-1494.

Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. 2001 Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods, *Phytochem. Anal.*, 13, 8-17

Kristianti, Alfinda, N., Nanik, S.T, Mulyadi, T, Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia.* Surabaya: Airlangga University Press.

Kulkarni, L.A. 2011. Pharmacological Review of *Vitex trifolia Linn*. (Verbaeaceae). *Pharmacologyonline*. 3: 858-863.

Laxmikant, K. 2012. *Vitex trifolia* linn. (Verbeneaceae): A Review on Pharmacological and Biological Effect, Isolated and Known Potential Phytoconstituents of Therapeutic Importance. *Int. J. Res. Pharm.Sci.* 3(3): 441-445.

Lemmens, R.H, Bunyapraphatsara, L.S.2003. Plant Resources of South East Asia. Leiden: Backhuys Publishers. *Food Biotechnology* 19:227-246.

Lobo, V., Patil, A., Chandra, N. 2010. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. *Department of Botany*, 4 (8), 118-128.

Matsui, M., Hsia, A., Miller, J.D., Hanneman, K., Scull, H., Cooper, K.D. 2009. Non-Sunscreen Photoprotection. *Antioxidants Add Value to a Sunscreen, Department of Dermatology*, University Hospitals, Case Medical Center, Cleveland

Meena, A. K., Niranjan, 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.

Mohamed, M., Abdou,A., Hamed, M., Saad, A. 2012. Characterization of Bioactive Phytochemical from the Leaves of *Vitex trifolia. International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(4): 419-428.

Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Dyphenilpicryl-hydrazil(DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *J. Sci. Technol*, *26* (2): 211-219.

Murugan, M., Mohan V.R. 2012. Efficacy of Different Solvent Extracts of *Vitex trifolia* L and *Aristolochia indi* L. for Potential Antibacterial Activity. *Science Research Reporter*, 2(1), 110-114.

Nair, A.G.R., Ramesh, P., Subramanian, S., 1975. Two Unusual Flavones (Artemetin and 7-desmethyl artemetin) from the Leaves of *V. trifolia.*, *Curr. Sci*. 44(7) : 214–216.

NRCS, 2010, *Plants Database, Natural Resources Conservation Service United States Depart of Agriculture*, https://plants.usda.gov/java/ [10 juni 2017]

Nugroho, AE, Alam G. 2012. *Review Tanaman Obat Legundi* (*Vitex trifolia* L.) Jurusan Farmasi, Universitas Hasanudin Makassar

Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., Simons, A. 2009. *Agroforestree Database: A Tree Reference and Selection GuideVersion 4.0*. Kenya: World Agroforestry Centre.

Pratimasari, D. 2009. *Uji Aktivitas Penangkap Radikal buah Carica Papaya dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik serta Flavonoid Totalnya.* Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Prakash, A. 2001. “Antioxidant Activity”. *Medallion Laboratories Analitical Progress*, 19(2), 1-4

Poedjiadi, A., Supriyanti, T. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia* Edisi Revisi. Jakarta : UI-Press.

Purniawati. 2014. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Buah Ara atau Tin.* Lampung, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.

Ramesh, P., Nair, A.G.R., Subramanian, S.S., 1986. Flavone Glycosides of *V. trifolia., Fitoterapia,* LVII4, pp. 282–283.

Rohdiana, D. 2001. Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh, *Majalah Jurnal Indonesia* 12(*1*), 53-58.

Sahare, K., & Singh, V. 2013. Antifilarial Activity of Ethyl Acetate Extract of *Vitex negundo* Leaves in Vitro. *Asian Pasific Journal of Tropical Medicine,* 127: 689-692.

Silverstein, R.M., Bassler, G.C, Morril, C. 1991. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th Edition, John Wiley and Sons Inc., New York, 95, 181-189, 305.

Sudarsono, G.D., Wahyuono, S., Donatus, I. A., Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II (Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan),* 66- 68, Pusat Studi Obat Tradisional-Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Sunarni, T. 2005., Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa Kecambah dari Biji Tanaman Familia *Papilionaceae, Jurnal Farmasi Indonesia,* 2(2):53-61.

Tanobat. 2015. *Legundi – Ciri-Ciri Tanaman serta Khasiat dan Manfaatnya*. http://www.tanobat.com/search/Vitex-trifolia [20 Juni 2017]

Thenmozhi, S., Shanmuga, R., Jena P.K., Choudhuty, G.B. 2011. Pharmacognistical and Phytochemical Investigation on Leaves of Vitex trifolia linn.. *Journal of Pharmacy Researsh, 4* (4), 1259-1262.

Tiwari, N., Thakur, J., Saikia, D., Gupta, M.M. 2013. Antitubercular Diterpenoids from *Vitex trifolia. Phytomedine,* 20, 605-610.

Tremallen, K. 2008. Oxidative Stress and Male Infertility – A Clinical Perspective. *Human Reproduction Update,* 14, 243-258.

Venkata, S.P.C., Indra, P. 2012. Isolation of Stigmasterol and β-Sitosterol from the Dichloromethane Extract of *Rubus suavivvimus.Internasional Current Pharmaceutical Journal,* 1(9): 239-242

Vedantham, T.N.C., Subramanian, S.S., 1976. Non-flavonoid Components of *V. trifolia., Indian J. Pharmacol*., 38(1) : 13-17

Waji, R. A., Sugrani, A. 2009. *Makalah Kimia Organik Bahan Alam Flavonoid (Quercetin).*FMIPA : Universitas Hasanuddin.

Winarsi, H. 2011. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

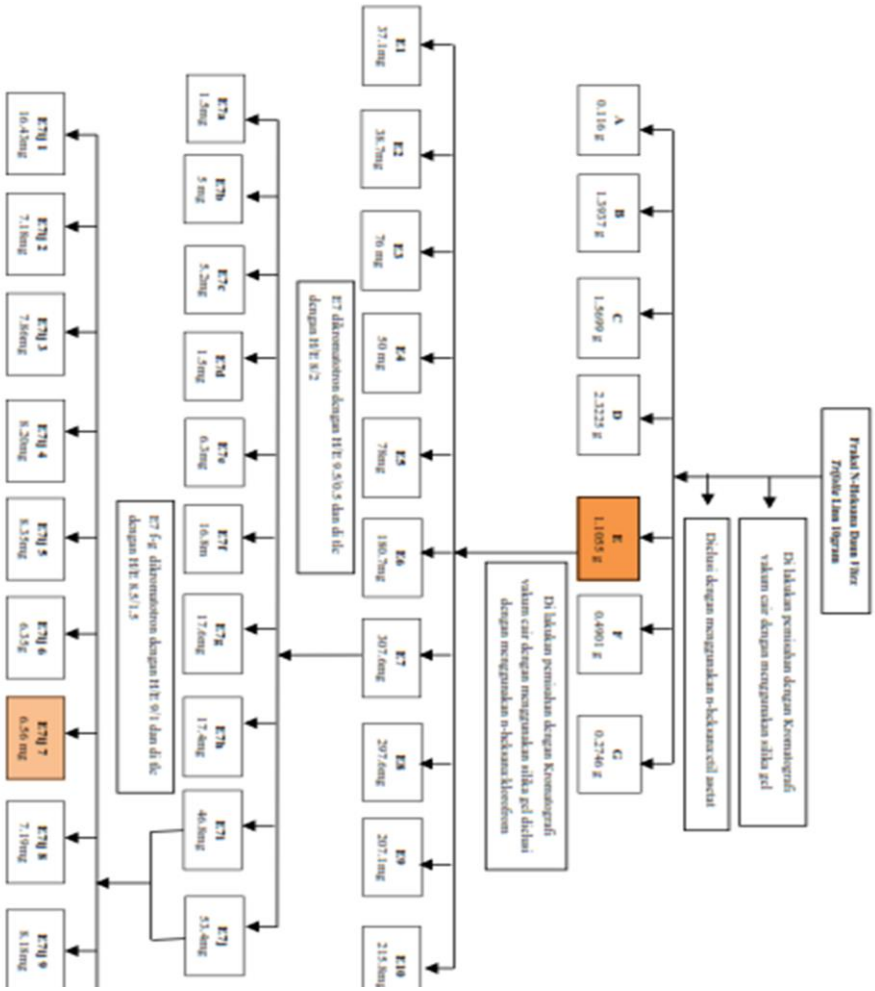
Xin Li, W., Bin Cui, C., Bing Cai., Yan Wang, H., Sheng Yao, X. 2005. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. Inhibit Cell Cycle Progression at G2/M Phase and Induce Apoptosis in Mammalian Cancer Cells. *Journal of Asian Natural Prodicts Research*, 7(4), 615-626.

Zheng, C.J., Tang, W.Z., Huang, B.K., Han, T., Zhang, H., Qin, L.P. 2009. Bioactivity Guided Fractination For Analgesic Properties and Constituents of *Vitex negundo* L. Seeds. *Phytomedicine*, 16.560-567.

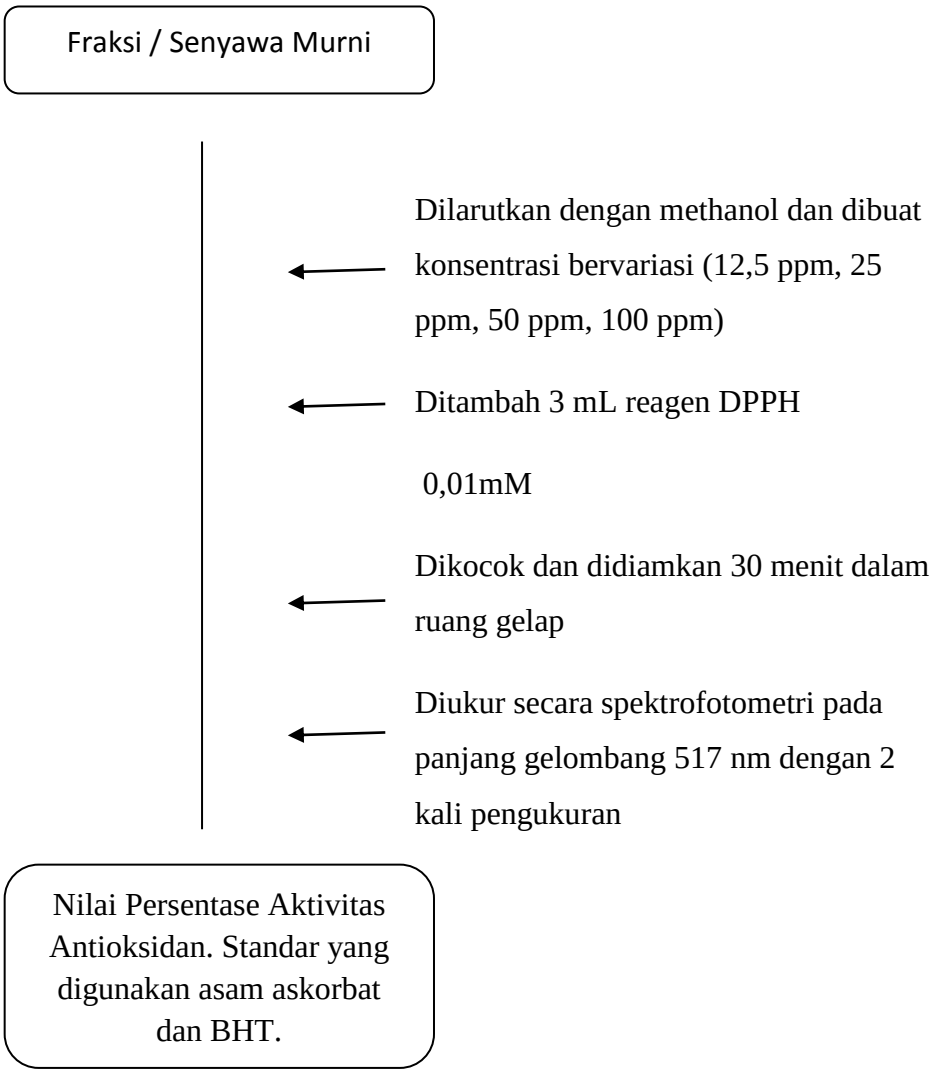
Zheng, X., Fang, Z., Wu, Y., Zhang, H., 1996, Chemical Constituents of the Fruits of *V. trifolia*, *Zhongguo Zhong* Yao Za Zhi., 21(3):167-168, 191.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Bagan Kerja Isolasi Senyawa β-Sitosterol dari Daun *Vitex Trifolia* L



Lampiran 2. Bagan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa β-Sitosterol dengan Metode DPPH



Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan

1. Pembuatan larutan induk senyawa Isolat (200 ppm)

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

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

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

Volume = 0,01 L = 10 mL

= 1,6 mg senyawa isolat dilarutkan dalam 10 mL metanol.

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

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

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

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

Volume = 0,01 L = 10 mL

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

3. Pengenceran Larutan Induk 200 ppm menjadi 100 ppm

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

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

$V_{larutan\ induk}$ = 5 mL

4. Pengenceran Larutan Induk 100 ppm menjadi 50 ppm

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

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

$V_{larutan\ induk}$ = 5 mL

5. Pengenceran Larutan Induk 50 ppm menjadi 25 ppm

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

$V_{larutan\ induk} \times 50$ ppm = 10 mL × 25 ppm

$V_{larutan\ induk}$ = 5 mL

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

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

   $V_{larutan\ induk} \times 25\ ppm = 10\ mL \times 12{,}5\ ppm$

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

7. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

   $$[\text{Larutan DPPH}] = \frac{Massa\ DPPH}{Mr\ DPPH} \text{x} \frac{1000}{V\ pelarut\ (mL)}$$

   $$0{,}0001\ \text{mol/L} = \frac{Massa\ DPPH}{394{,}32\ \frac{gram}{mol}} \text{x} \frac{1000}{50\ mL}$$

   Massa DPPH = 1,9716 mg

Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

a. Asam Askorbat

- Konsentrasi 12,5 ppm

$$\text{Aktivitasantioksidan (\%)} = \frac{(Absorbansi_{\ kontrol} - Absorbansi_{sampel})}{Absorbansi_{\ kontrol}} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0{,}668 - 0{,}149}{0{,}668} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 77.69%

- Konsentrasi 25 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0{,}668 - 0.022}{0{,}668} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 96.71%

- Konsentrasi 50 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0{,}668 - 0.016}{0{,}668} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan (%) = 97.55 %

- Konsentrasi 100 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0,668-0.016}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 97.55%

b. BHT

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0,668-0.395}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 40.92%

- Konsentrasi 25 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0,668-0.313}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 53.14%

- Konsentrasi 50 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0,668-0.186}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 72.21%

- Konsentrasi 100 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0,668-0.100}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 85.03%

c. Isolat $E^{g10}7$

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0.668 - 0,544}{0,668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 18.61%

d. Konsentrasi 25 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0{,}668 - 0.542}{0{,}668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 18.91%

e. Konsentrasi 50 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0{,}668 - 0.501}{0{,}668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 24.95%

f. Konsentrasi 100 ppm

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

Aktivitas antioksidan (%) = $\frac{0{,}668 - 0.490}{0{,}668} \times 100\%$

Aktivitas antioksidan (%) = 26.70%

Lampiran 5. Perhitungan Nilai IC_{50} pada Metode DPPH

1. Asam Askorbat

Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 20.074x + 61.294$

$50 = 20.074x + 61.294$

$\log x = 1.488$

$x = 0.27$ppm

2. BHT

Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 50.293x - 15.052$

$50 = 50.293x - 15.052$

$\log x = 1,29345$

$x = 19.654$ ppm

3. Isolat $E^{g\ 9\text{-}10}$ 7

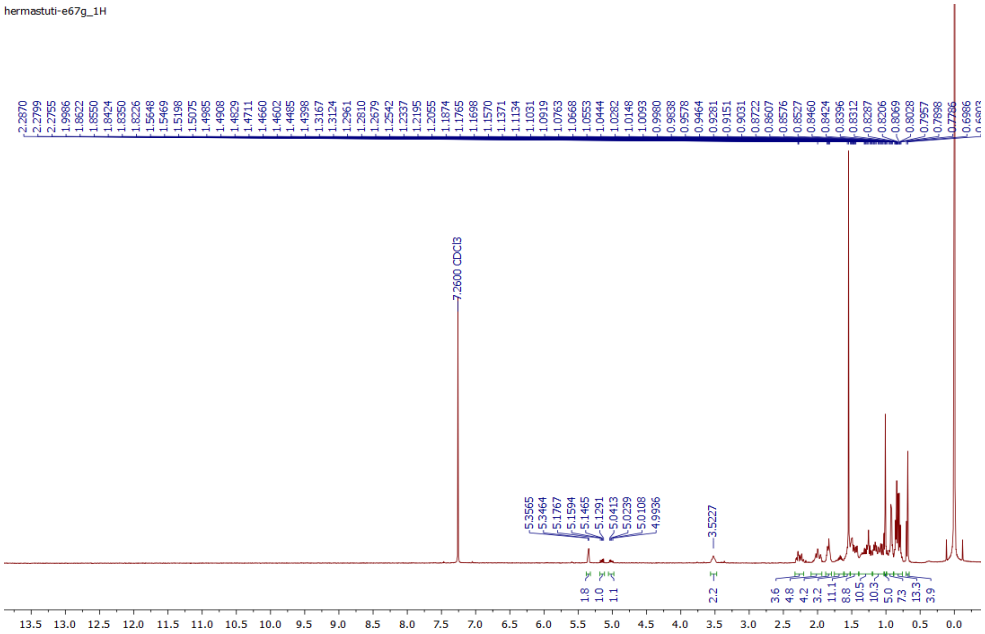
Persamaan regresi linear pada grafik : $y = 10.062x + 6.7125$

$50 = 10.062x + 6.7125$

$\log x = 4.3020$

$x = 2.01 \times 10^4$ ppm

Lampiran 6. Spektrum ^{1}H-NMR Senyawa Isolat



Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Senyawa Isolat

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

HERMASTUTI.Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 24 Agustus 1995. Anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Pargono dan Ibu Samini. Bertempat tinggal di Kp.Rawaterate RT 04/001 no.81 Kel.Rawaterate Kec.Cakung Jakarta Timur.

Pendidikan formal yang pernah di tempuh telah menyelesaikan taman kanak-kanak pada tahun 2001 di TK Harapan Restu Ibu Rawaterate, kemudian melanjutkan sekolah di SDN 03 Pagi Pulogadung dan lulus pada tahun 2007, selanjutnya menyelesaikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 90 Jakarta dan lulus pada tahun 2010, berikutnya melanjutkan Sekolah Menengah Atas di SMAN 83 Jakarta dan lulus pada tahun 2013, kemudian melanjutkan pendidikan di perguruan tinggi Universitas Negeri Jakarta, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Jurusan dan Program Studi Kimia melalui jalur SNMPTN.

Penulis pernah menjadi peserta dalam Kunjungan Industri ke PT. Krakatau Steel, PT. Asahimas Chemical, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), PT. Nippon Indosari Corpinda, PT Coca Cola Amatil Indonesia, dan PT.Semen Indonesia . Selain itu penulis pernah mengikuti kegiatan Kuliah Kerja Nyata di DesaCijunti, Purwakarta, Jawa Barat. Selain itu penulis pernah menjadi asisten dosen pada Praktikum Kimia Dasar, dan Praktikum Struktur Dan Fungsi Biomolekul.