

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
METABOLIT SEKUNDER DARI FRAKSI ETIL
ASETAT BATANG *Muntingia calabura* L. ASAL
SUKABUMI**

Skripsi

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



**Zahrah Nadia Putri
3325130977**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2017**



Lembar Persembahan

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, kupersembahkan kepada Allah swt. atas segala rahmat dan kesempatan untuk menyelesaikan tugas akhir ini sebagai tanggung jawabku dengan segala kekuranganku. Syukur aku ucapkan kepadaMu karena telah menghadirkan mereka yang selalu memberikan semangat dan doa disaat aku tertatih. KarenaMu lah tugas akhir ini terselesaikan.

Kupersembahkan karya kecilku ini kepada orang yang sangat kusayangi dan kukasihi

Mama dan Bapak Tercinta

Apa yang mama bapak berikan sesungguhnya belum tentu kakak bisa balas. Terimakasih telah menjadi sumber inspirasi, semangat, pendukung untuk kakak. Karya ini kakak persembahkan untuk mama dan bapak tercinta. Kakak tidak akan lupa semua pengorbanan, jerih payah, dan semua yang mama dan bapak kerahkan dan punya untuk Kakak menggapai cita-cita kakak. Sesungguhnya kakak percaya kesuksesan dan kemudahan yang kakak dapatkan merupakan doa mama dan bapak yang dikabulkan Allah swt. Semoga kakak bisa membahagiakan mama dan bapak. Aamiin.

Adikku Tercinta

Untuk adikku, Ria Shania. Terimakasih telah mendengarkan semua keluh kesah kakak saat menjalani perkuliahan dari kakak masuk sampai akhir. Terimakasih untuk semangat dan bantuan Shania.

Dosen Pembimbing Tugas Akhirku

Ibu Fera Kurniadewi serta Ibu Irma Ratna Kartika selaku dosen pembimbing tugas akhir saya dan juga orangtua kedua saya di perkuliahan. Terimakasih banyak ibu telah banyak membantu saya selama ini. Terimakasih atas semua nasihat, ilmu, dan kesabaran hingga akhirnya tugas akhir saya dapat terselesaikan. Sesungguhnya saya tidak bisa membalas jasa ibu. Terimakasih banyak ibu...





Lembar Persembahan

Zahrah Nadia Putri

Terimakasih karena tidak menyerah apapun keadaannya. Terimakasih untuk tetap bertanggung jawab dengan apa yang sudah dimulai, dan terimakasih karena tetap kuat.

Team Fitokimia 2013 dan 2012

Terkhusus untuk Rio, Tia, dan Tuti. Terimakasih telah menjadi team penelitian terbaik yang kupunya. Terimakasih untuk saling menyemangati, saling mengajari sesusah apapun.

If I could choose another partner, I would still choose all of you guys.

Terkhusus untuk kak Afifah, kak Baha, dan Kak Fanissa. Terimakasih telah mengajari dari yang kami tidak tahu sampai tahu hingga penelitian selesai.

Terimakasih kakak yang baiknya tidak terhingga.

Ilma Kharisma Delia dan Hilda

Teruntuk Ilma, Kharisma, Delia, dan Hilda. Terimakasih ya karena mau jadi teman Nadia selama perkuliahan. Terimakasih karena sudah menerima baik dan buruknya Nadia dan tetap berteman dengan Nadia. Terimakasih karena sudah mendengarkan segala keluhan Nadia dan telah memberikan semangatnya selama skripsi. Semoga kita berempat sukses bersama dan tetap berteman ya:”)

Kimia 2013

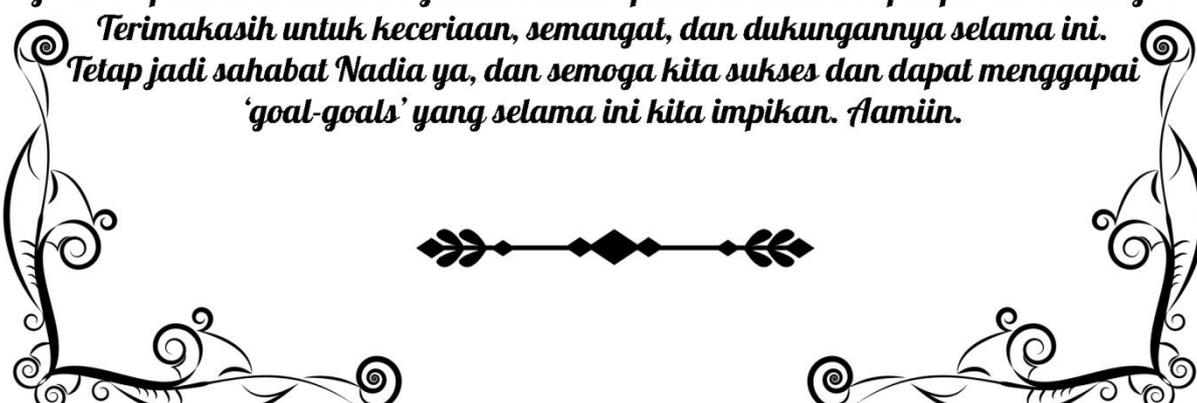
Terimakasih Kimia 2013 untuk empat tahun ter-rock nya, terdramanya, dan ter-gak kompaknya. Terimakasih karena memberikan pengalaman kuliah yang tidak bisa diganti dengan apapun. Semoga kita sekelas sukses bersama. Aamiin.

Anita Kiki dan Novia

Teruntuk Anita, Kiki, dan Novia, sahabatku sejak SMA, Terimakasih untuk selalu yakin kepadaku untuk menyelesaikan skripsi dan studi ini tepat pada waktunya.

Terimakasih untuk keceriaan, semangat, dan dukungannya selama ini.

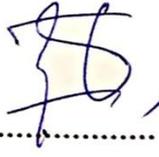
Tetap jadi sahabat Nadia ya, dan semoga kita sukses dan dapat menggapai 'goal-goals' yang selama ini kita impikan. Aamiin.



LEMBAR PENGESAHAN

Isolasi dan Uji Aktivitas Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Batang
Muntingia calabura L. Asal Sukabumi.

Nama Mahasiswa : Zahrah Nadia Putri
No. Registrasi : 3325130977
Program Studi : Kimia

Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab Dekan : <u>Prof. Dr Suyono, M.Si</u> 19671218 199303 1 005		21/08/2017
Wakil Penanggung Jawab Wakil Dekan I : <u>Dr. Muktiningsih N., M.Si</u> 19640511 198903 2 001		21/08/2017
Ketua : <u>Drs. Suhartono, M.Kes</u> 19550712 198303 1 001		16/08/2017
Sekretaris : <u>Dra. Zulmanelis, M.Si</u> 19560501 198803 2 001		16/08/2017
Anggota Penguji : <u>Dr. Moersilah, M.Si</u> 19580523 199703 2 001		14/08/2017
Pembimbing I : <u>Dr. Fera Kurniadewi, M.Si</u> 19761231 200112 2 002		21/08/2017
Pembimbing II : <u>Irma Ratna K., M.Sc.Tech</u> 19721204 200501 2 001		20/08/2017
Tanggal Lulus : Senin, 7 Agustus 2017		

LEMBAR PERNYATAAN

Saya menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul **“Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* L. Asal Sukabumi”** 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
RPP1DAEF360664872
6000
ENAM RIBURUPIAH

Zahrah Nadia Putri

ABSTRAK

ZAHRAH NADIA PUTRI. Isolasi dan Uji Aktivitas Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* L. Asal Sukabumi. Dibawah Bimbingan FERA KURNIADEWI, IRMARATNAKARTIKA

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui struktur metabolit sekunder dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. asal Sukabumi serta menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Dua senyawa turunan flavonoid yaitu 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon (**1**) dan 2',4'-dihidroksicalkon (**2**) telah diisolasi dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. Penentuan struktur senyawa hasil isolasi berdasarkan analisa spektrum UV-Vis, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Nilai IC₅₀ senyawa 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon (**1**) dan 2',4'-dihidroksicalkon (**2**) berturut-turut adalah 96,61 x 10¹ppm, dan 12,42 x 10³ppm, dimana kedua senyawa tersebut tidak aktif sebagai antioksidan.

Kata Kunci. *Muntingia calabura* L., Antioksidan, Flavonoid, 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon. 2',4'-dihidroksicalkon

ABSTRACT

ZAHRAH NADIA PUTRI. Isolation and Antioxidant Activity Test of Ethyl Acetate Fraction Secondary Metabolites from the Stems of *Muntingia calabura* L. from Sukabumi. Under Supervised by FERAKURNIADEWI, IRMARATNAKARTIKA

The purposes of this research were to determine the structure of secondary metabolite from ethyl acetate fraction from stems of *Muntingia calabura* L. from Sukabumi and to determine the antioxidant activity with DPPH method. Two flavonoid derivative compounds which are 5-hydroxy-3,7-dimethoxyflavone (**1**) and 2',4'-dihydroxychalcone (**2**) have been isolated from ethyl acetate fraction of the stems of *Muntingia calabura* L. The structure of these compounds were determined based on spectroscopic data, such as UV-vis, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. The antioxidant activity was determined by DPPH method. IC₅₀ value of 5-hydroxy-3,7-dihydroxyflavone (**1**) and 2',4'-dihydroxychalcone (**2**) were 96,61 x 10¹ppm, dan 12,42 x 10³ppm. Respectively, the result of antioxidant activity showed that 5-hydroxy-3,7-dihydroxyflavone and 2',4'-dihydroxychalcone are inactive as an antioxidant

Keywords. *Muntingia calabura* L., Antioxidant, Flavonoid. 5-hydroxy-dimethoxyflavone. 2',4'-dihydroxychalcone.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT. atas rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* Asal Sukabumi”.

Skripsi ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam jenjang Strata I Universitas Negeri Jakarta. Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari hambatan dan kesulitan, namun berkat bimbingan, bantuan, nasihat serta saran dari berbagai pihak. Segala hambatan tersebut dapat teratasi dengan baik.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, yaitu Ibu Dr. Fera Kurniadewi, M.Si. dan Ibu Irma Ratna Kartika, M.Sc.Tech, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, saran dan motivasi agar penulisan skripsi ini cepat terselesaikan. Selain itu, penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Ibu Dr. Yusmaniar, M.Si. selaku koordinator program studi kimia yang telah memberikan arahan serta saran dalam bidang akademik serta seluruh bapak, ibu dosen serta seluruh laboran di laboratorium Jurusan Kimia UNJ yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penulis.

Tak lupa penulis sampaikan rasa terimakasih yang paling dalam pada orang tua penulis Bapak Sri Cahyono dan Ibu Hairani serta adik penulis Ria Shania dan juga berbagai pihak yang telah memberikan bantuan, saran dan dorongan dalam penulisan skripsi ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini jauh dari sempurna sehingga penulis membutuhkan kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaannya. Penulis berharap skripsi ini dapat dijadikan sebagai sumber pengetahuan untuk kita semua.

Jakarta, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
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 KAJIAN PUSTAKA	3
A. Kajian Etnobotani <i>Muntingia calabura</i> L.	3
B. Kajian Fitokimia Tumbuhan <i>Muntingia Calabura</i>	4
C. Radikal Bebas dan Antioksidan	8
D. Isolasi Senyawa Bahan Alam	11
E. Metode Penentuan Struktur	14
F. Uji Aktivitas Antioksidan.....	15
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	18
A. Tempat dan Waktu Penelitian	18
B. Metode Penelitian	18
C. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan.....	27
B. Aktivitas Antioksidan terhadap Senyawa Hasil Isolasi dengan Metode DPPH.....	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	42
A. Kesimpulan.....	42
B. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Data Pengamatan Absorbansi Sampel dan Standar Konsentrasi	25
Tabel 2. Angka IC ₅₀ Sampel Dan Standar	25
Tabel 3. Data ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Senyawa I	28
Tabel 4. Korelasi HMBC Isolat II dalam Pelarut CDCl ₃	30
Tabel 5. Data ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR Isolat II dalam pelarut CDCl ₃	31
Tabel 6. Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	35
Tabel 7. Nilai IC ₅₀ Standar dan Isolat Metode DPPH.....	37
Tabel 8. Tingkat Kekuatan Antioksidan dengan Metode DPPH	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Berbagai Bagian <i>Muntingia calabura</i> L	4
Gambar 2. Kerangka Molekul Senyawa Golongan Flavonoid	5
Gambar 3. Senyawa Flavon Hasil Isolasi dari <i>Muntingia calabura</i> L.	6
Gambar 4. Senyawa Flavan Hasil Isolasi dari <i>Muntingia calabura</i> L.	7
Gambar 5. Senyawa Calkon Hasil Isolasi dari <i>Muntingia calabura</i> L.	8
Gambar 6. Senyawa Steroid Hasil Isolasi dari <i>Muntingia calabura</i> L.....	8
Gambar 7. Mekanisme Vitamin C sebagai Antioksidan	9
Gambar 8. Mekanisme Penangkapan Radikal ROS oleh Flavonoid	11
Gambar 9. Reaksi Uji DPPH	17
Gambar 10. Kromatogram Pemisahan Fraksi Etil Asetat	19
Gambar 11. Kromatogram Pemisahan Fraksi D _A <i>Muntingia calabura</i> L	20
Gambar 12. Kromatogram Pemisahan Fraksi D _{A1} <i>Muntingia calabura</i> L.....	21
Gambar 13. Kromatogram Uji Kemurnian Senyawa Isolat I (Fraksi D _{A12})	21
Gambar 14. Kromatogram Pemisahan Fraksi F <i>Muntingia calabura</i> L.....	22
Gambar 15. Kromatogram Pemisahan Fraksi F _G <i>Muntingia calabura</i> L.....	22
Gambar 16. Kromatogram Pemisahan Fraksi F _{G6} <i>Muntingia calabura</i> L.....	23
Gambar 17. Kromatogram Pemisahan Fraksi F _{G65} <i>Muntingia calabura</i> L	23
Gambar 18. Kromatogram Uji Kemurnian Senyawa Isolat II (Fraksi F _{G653})	24
Gambar 19. Struktur Senyawa Isolat I.....	29
Gambar 20. Korelasi HMBC Senyawa II.....	31
Gambar 21. Struktur Senyawa Isolat II	32
Gambar 22. Perubahan Warna Asam Askorbat dengan Metode DPPH.....	33
Gambar 23. Perubahan Warna BHT dengan Metode DPPH.....	33
Gambar 24. Perubahan Warna Isolat I dengan Metode DPPH.....	34
Gambar 25. Perubahan Warna Isolat II dengan Metode DPPH.....	34
Gambar 26. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi.....	36
Gambar 27. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	37
Gambar 28. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	38

Gambar 29. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	38
Gambar 30. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Diagram Alir Pemisahan dan Pemurnian <i>M. calabura</i> L.	49
Lampiran 2. Bagan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat.....	50
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan.....	51
Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH.....	53
Lampiran 5. Perhitungan Nilai IC ₅₀ pada Metode DPPH.....	56
Lampiran 6. Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Isolat I	57
Lampiran 7. Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Isolat I	57
Lampiran 8. HMQC Senyawa Isolat I	58
Lampiran 9. NOE Senyawa Isolat I	58
Lampiran 10. Spektra UV-vis Senyawa Isolat I	59
Lampiran 11. Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Isolat II.....	59
Lampiran 12. Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Isolat II.....	60
Lampiran 13. HMBC Senyawa Isolat II	60
Lampiran 14. HSQC Senyawa Isolat II	61
Lampiran 15. Spektra UV-vis Senyawa Isolat II	61

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Muntingia calabura L. atau kersen (Elaeocarpaceae) merupakan tanaman dengan bentuk seperti pohon yang rimbun. Tanaman ini termasuk kedalam spesies tunggal dalam genus *Muntingia*. *Muntingia calabura* L. merupakan tanaman asli dari Meksiko selatan. Meskipun demikian, tanaman ini telah banyak dibudidayakan dan ditemukan di daerah yang hangat di India dan Asia Tenggara seperti Malaysia, Indonesia, dan Filipina (Mahmood *et al.*, 2014). Masyarakat saat ini hanya mengetahui kersen sebagai pohon peneduh di pinggir jalan serta buahnya yang sering dikonsumsi oleh anak-anak karena rasanya manis. Padahal disamping itu semua, Kersen memiliki banyak manfaat dalam pengobatan tradisional. Daun, kulit, bunga dan akar tumbuhan kersen telah digunakan untuk mengobati demam, sakit kepala, penyakit hati, mengurangi radang pada kelenjar prostat serta sebagai antiseptik (Sufian *et al.*, 2013; Zakaria *et al.*, 2007). Daunnya juga sering dijadikan sebagai teh dan buahnya banyak dikonsumsi dalam bentuk selai.

Kersen merupakan salah satu tanaman yang memiliki banyak kandungan metabolit sekunder dan bermanfaat bagi kesehatan. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman *Muntingia calabura* L. kaya akan kandungan senyawa fenolik berupa flavonoid seperti flavon, flavanon, flavan, biflavan sebagai senyawa utama, serta senyawa metabolit sekunder lain seperti tanin, dan saponin yang menunjukkan efek sitotoksik, antiinflamasi, antimikrobia dan antioksidan (Chen *et al.*, 2004; Surjowardojo *et al.*, 2014; Sibi *et al.*, 2012; Kuo *et al.*, 2014).

Flavonoid yang menjadi kelompok senyawa metabolit sekunder utama dalam batang *Muntingia calabura* L. kaya akan manfaat bioaktivitas, salah satunya yaitu dapat dimanfaatkan sebagai zat antioksidan. Beragam kandungan metabolit sekunder yang dimilikinya berpotensi menjadi antioksidan alami sehingga

membuat senyawa-senyawa tersebut menarik untuk dijadikan pengganti dari antioksidan sintetik. Timbulnya efek samping dari antioksidan sintetik, seperti keracunan, resiko kerusakan hati, dan karsinogenik yang diujicobakan pada hewan di laboratorium, dan juga meningkatkan minat masyarakat untuk mengkonsumsi antioksidan alami yang berasal dari tanaman alami yang tidak beracun dengan dan harga yang relatif terjangkau.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa studi bioaktivitas antioksidan dari tanaman *Muntingia calabura* L. baru dilakukan pada bagian daun dan buah (Zakaria *et al.*, 2011; Preethi *et al.*, 2010). Namun untuk batang *Muntingia calibura* L. belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. dan menguji aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi tersebut.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan pembatasan masalah yang telah diuraikan di atas, maka masalah dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut: “Senyawa metabolit sekunder apa yang terdapat dalam fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. dan bagaimana aktifitas antioksidannya?”

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah, penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan struktur senyawa hasil isolasi dari *Muntingia calabura* L berdasarkan data spektroskopi.
2. Memperoleh data tentang bioaktivitas antioksidan dari metabolit sekunder fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi baru mengenai senyawa hasil isolasi dan batang *Muntingia calabura* L asal Sukabumi dan potensinya sebagai antioksidan.

BAB II KAJIAN PUSTAKA

A. Kajian Etnobotani *Muntingia calabura* L.

Kersen atau talok memiliki nama ilmiah *Muntingia calabura* L. merupakan tanaman yang sering digunakan anak-anak untuk bermain atau dimakan buahnya. Tanaman ini ternyata memiliki kandungan senyawa yang penting dan juga berkhasiat. Tanaman yang sekarang ini banyak dipakai hanya sebagai tanaman peneduh ini sebenarnya memiliki manfaat kesehatan yang sangat berguna. Buah kersen dipercaya dapat menyembuhkan penyakit-penyakit seperti hipertensi, asam urat dan diabetes mellitus. Beberapa kasus yang pernah ditemukan dalam masyarakat, orang yang mengkonsumsi buah kersen matang dapat mengobati penyakit asam urat dan diabetes mellitus. Selain buah, bagian-bagian dari pohon kersen juga bermanfaat seperti daunnya, kulit batang, dan bunganya (Pramono dan Santoso, 2014).

Tanaman kersen merupakan pohon rimbun yang tumbuh cepat dengan ketinggian mencapai sekitar 7.5-12 m dengan cabang menyebar yang hampir membentuk horisontal (Gambar 1a). Daun *M. calabura* memiliki panjang sekitar 5-12,5 cm, berbentuk lonjong, panjang menajam puncak, miring di bagian bawah dengan warna hijau gelap dan pada permukaan atas sedikit berbulu, atau coklat-berbulu di bagian bawah dengan gerigi yang tidak teratur (Gambar 1b). Bunga-bunganya memiliki bentuk melebar sekitar 1,25-2 cm; dengan lima kelopak hijau dan lima kelopak putih dan terdapat banyak benang sari kuning yang menonjol (Gambar 1c). Buahnya berlimpah dengan bentuk bulat, berdiameter sekitar 1-1,25 cm, dengan warna merah atau kuning, berkulit tipis, halus, kulit lembut dan berwarna coklat muda, lembut, dengan rasa manis seperti rasa buah ara, dan diisi dengan biji kekuningan yang sangat kecil (Gambar 1d) (Mahmood *et al.*, 2014).

Klasifikasi tumbuhan *Muntingia calabura* L. berdasarkan USDA (2016) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Malvales
 Famili : Elaeocarpaceae
 Genus : *Muntingia*
 Spesies : *Muntingia calabura* L.



Gambar 1. Berbagai bagian *M. calabura*. (A) Pohon *M. calabura*. (B) Daun *M. calabura*. (C) Bunga dari *M. calabura*. (D) Buah dari *M. calabura* (Mahmood *et al.*, 2014)

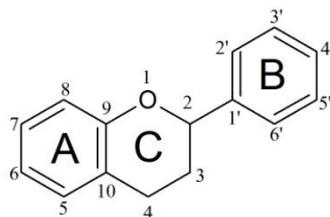
B. Kajian Fitokimia Tumbuhan *Muntingia Calabura*

Muntingia calabura L. (Elaeocarpaceae) adalah tanaman yang tumbuh di daerah tropis. Daun, bunga, kulit dan akar dari tanaman *Muntingia calabura* L. ini telah banyak digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati sakit kepala, dan demam. Tanaman ini telah dilaporkan memiliki banyak aktivitas farmakologis

yakni seperti antitumor (Kaneda *et al.*, 1991; Su *et al.*, 2003), antitoksik (Nshimo *et al.*, 1993), anti inflamasi, antibakteri (Zakaria, *et al.*, 2007), antiproliferatif, antioksidan (Zakaria *et al.*, 2011), kardioprotektif dan efek antipiretik (Sibi *et al.*, 2012).

Berbagai bagian dari tumbuhan *Muntingia calabura* L. seperti kulit kayu, akar, dan daun mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, calkon, terpenoid, saponin, tannin dan senyawa-senyawa fenolik (Preethi *et al.*, 2012; Surjowardojo *et al.*, 2014; Zakaria *et al.*, 2011). Namun di antara semua senyawa metabolit sekunder tersebut, flavonoid menjadi senyawa metabolit sekunder utama di dalamnya. Senyawa flavonoid yang sebelumnya dilaporkan telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi yakni seperti calkon, flavonol, flavon, flavanon, flavan, dan biflavan (Chen *et al.*, 2004; Nshimo *et al.*, 1993).

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna. Sebagai pigmen bunga, flavonoid jelas berperan menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid yang lain bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat antimikroba, antivirus, antiinsektisida. Telah banyak flavonoid yang diketahui memberikan efek fisiologis tertentu (Kristanti *et al.*, 2008).

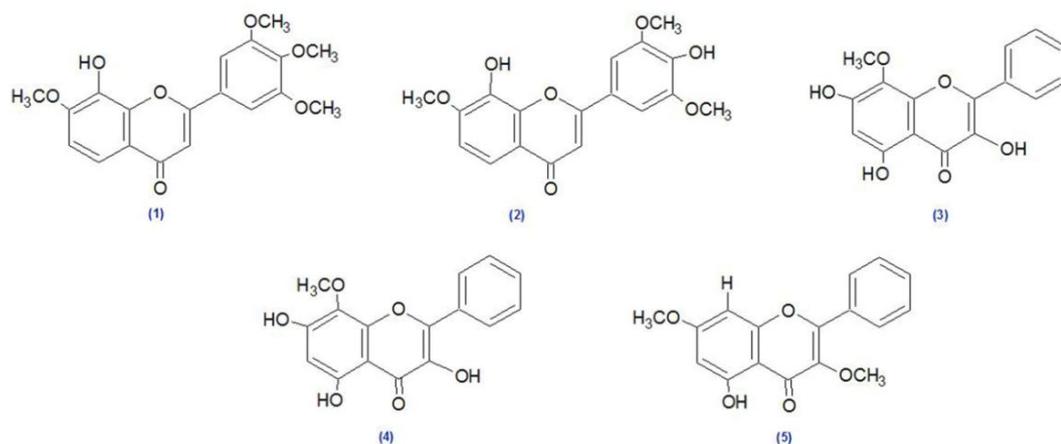


Gambar 2. Kerangka Molekul Senyawa Golongan Flavonoid

Golongan senyawa flavonoid yang menjadi senyawa utama dalam *Muntingia calabura* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Senyawa fenolik tersebut pada umumnya memiliki aktivitas antioksidan. Semakin banyak gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis akan semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya. Struktur kimia flavonoid seperti Gambar 2 didasarkan pada kerangka lima belas karbon yang terdiri dari dua cincin benzena (A dan B seperti yang ditunjukkan

pada Gambar 2) yang dihubungkan melalui cincin piran heterosiklik (C). Senyawa ini dapat dibagi menjadi berbagai kelas seperti flavon (misalnya, flavon, apigenin, dan luteolin), flavonol (misalnya, kuersetin, kaempferol, mirisetin, dan fisetin), flavanon (misalnya, flavanon, hesperetin, dan naringenin). Berbagai kelas flavonoid berbeda dalam tingkat oksidasi dan pola substitusi dari cincin C benzena, sedangkan senyawa individu dalam kelas berbeda dalam pola substitusi dari cincin A dan cincin B pada benzena (Kumar dan Pandey, 2013).

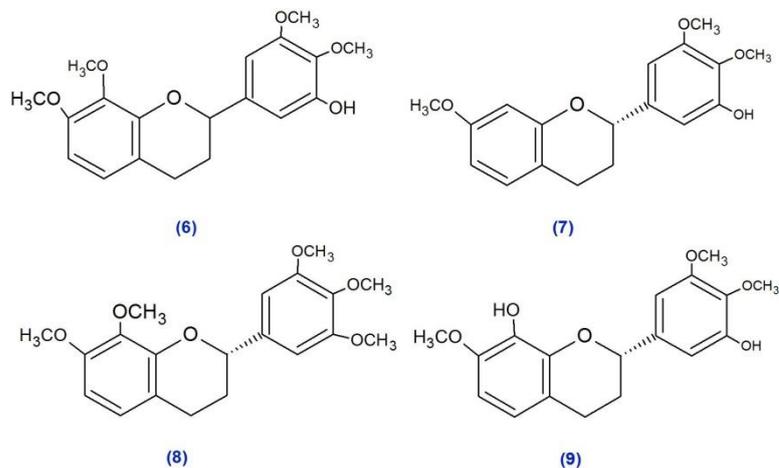
Senyawa-senyawa golongan flavonoid yang berhasil diisolasi di antaranya merupakan senyawa flavon yaitu 8-hidroksi-7,3',4',5'-tetrametoksiflavon (**1**), 8,4'-dihidroksi-7,3',5'-trimetoksiflavon (**2**) pada bagian kulit batang *Muntingia calabura* yang memiliki sifat aktivitas antitoksik yang baik (Chen *et al.*, 2004). Senyawa flavon lain yang telah berhasil diisolasi pada bagian kayu batang yaitu 4'-hidroksi-7,8,3',5'-tetrametoksiflavon (**3**), 5-hidroksi-7-metoksiflavon (**4**), dan 3,5,7,3',4'-pentahidroksiflavon (**5**) yang telah diuji aktivitasnya dalam respon neutrophil pro-inflamator.



Gambar 3. Struktur Senyawa Flavon Hasil Isolasi dari Kulit Batang (Chen *et al.*, 2004) dan kayu batang *Muntingia calabura* (Kuo *et al.*, 2014).

Senyawa flavonoid lain yaitu flavan telah diisolasi sebelumnya, di antaranya adalah (2S)-5'-hidroksi-7,8,3',4'-tetrametoksiflavan (**6**) yang diisolasi dari kulit batang *Muntingia calabura* (Chen *et al.*, 2004), (2S)-5'-Hidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavan (**7**), (2S)-7,8,3',4',5'-pentametoksiflavan (**8**), yang telah diisolasi dari akar tanaman *Muntingia calabura* yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap

sel kanker (Kaneda *et al.*, 1991), dan (2S)-8,5'-dihidroksi-7,3',4'-trimetoksiflavan (9) dari batang kayu *Muntingia calabura* (Kuo *et al.*, 2014).

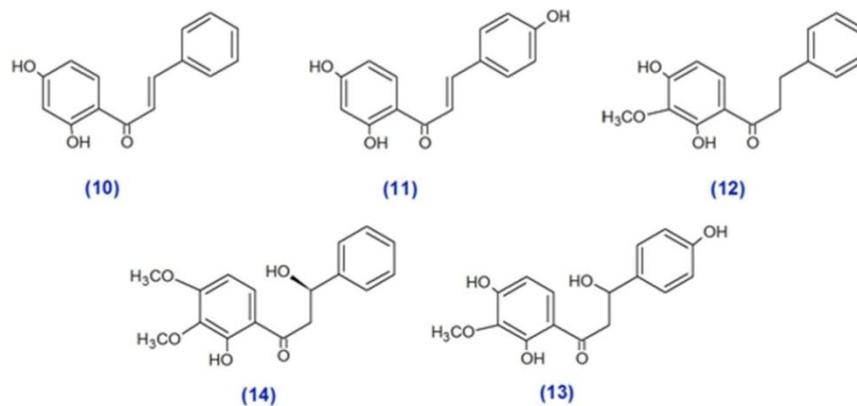


Gambar 4. Struktur Senyawa Flavan Hasil Isolasi dari Kulit Batang *Muntingia calabura* (Chen *et al.*, 2004) dan Batang Kayu *Muntingia calabura* (Kuo *et al.*, 2014).

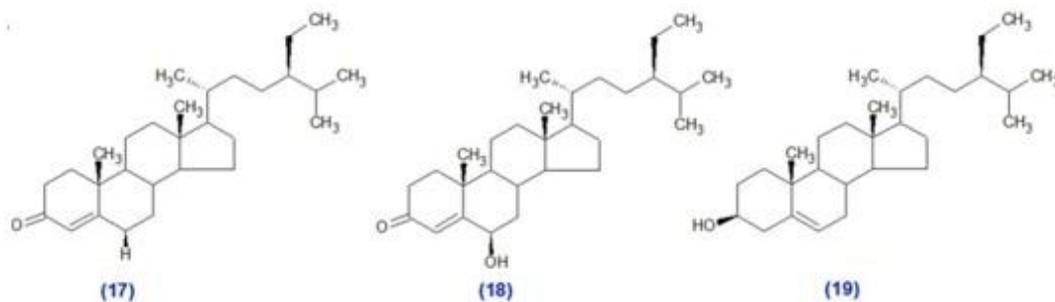
Senyawa calkon yang juga termasuk senyawa golongan flavonoid memiliki kerangka *trans*-1,3-diaril-2-propen-1-on, terdistribusi di akar, rizoma, batang, daun, bunga, dan biji. Senyawa calkon memiliki beragam kemampuan bioaktivitas seperti antioksidan, antitumor, antimutagenik, anti-inflamasi, analgesik, antibakteri, dan lainnya karena adanya keton α,β -unsaturated (Zhang *et al.*, 2013). Senyawa calkon yang berada pada tanaman *Muntingia calabura* yakni di antaranya adalah 2',4'-dihidroksicalkon (10), 4,2',4'-trihidroksicalkon (isoliquiritigenin) (11), 2',4'-dihidroksi-3'-metoksidihidrocalkon (12), (-)-3'-metoksi-2',4', β -trihidroksidi-hidrocalkon (13) yang diisolasi dari kulit batang dan daunnya. Senyawa-senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik yang baik terhadap sel kanker (Chen *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2003). Selain itu, senyawa calkon juga ditemukan pada bagian batang kayu dari *Muntingia calabura* seperti (R)-2', β -dihidroksi-3',4'-dimetoksidihidrocalkon (14) (Kuo *et al.*, 2014).

Ditemukan juga beberapa senyawa lain yang terkandung di dalam tumbuhan *Muntingia calabura* yaitu steroid. Steroid merupakan kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid atas kelompok senyawa yang pengelompokannya didasarkan pada efek fisiologis yang

dapat ditimbulkan yang terdiri atas kelompok sterol, asam-asam empedu, hormon seks dan adrenokortikoid, aglikon kardiak dan sapogein. Pengelompokan golongan senyawa ini juga ditinjau dari segi struktur (Achmad, 1986; Kristanti *et al.*, 2008). Senyawa steroid yang terdapat dalam tumbuhan *Muntingia calabura* di antaranya yaitu β -sitosteron (17), 6 β -hidroksistigma-4-en-3-on (18), dan β -sitosterol (19) yang telah diisolasi dari kulit batang *Muntingia calabura* (Chen *et al.*, 2004).



Gambar 5. Struktur Senyawa Calkon Hasil Isolasi dari Kulit Batang (Chen *et al.*, 2005) dan Daun *Muntingia calabura* (Su *et al.*, 2003).



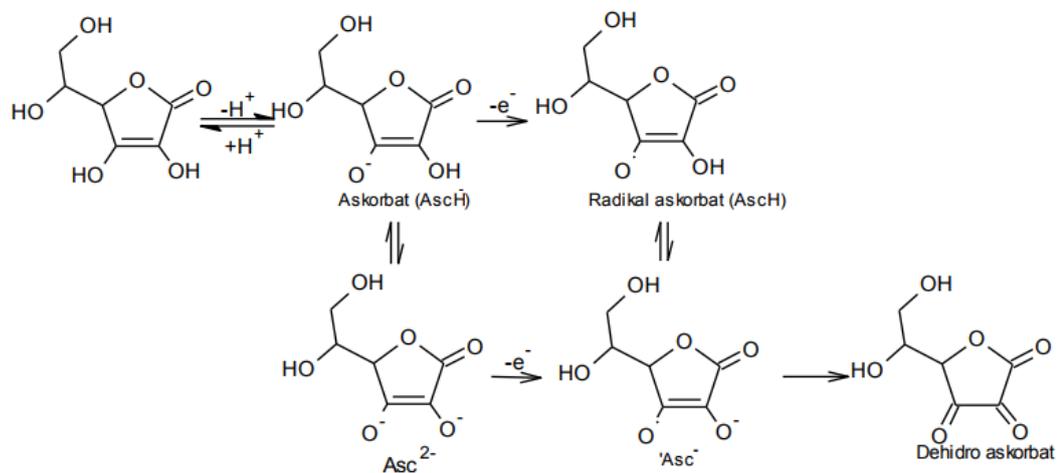
Gambar 6. Struktur Senyawa Steroid Hasil Isolasi dari Kulit Batang *Muntingia calabura* (Chen *et al.*, 2004)

C. Radikal Bebas dan Antioksidan

Antioksidan adalah setiap zat yang dapat mencegah, mengurangi, dan menstabilkan radikal bebas (ROS/RNS) yang dapat menimbulkan kerusakan pada biomolekul. Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Oleh karena itu, radikal bebas mempunyai sifat yang tidak stabil dan sangat reaktif. Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh

maupun dari luar tubuh (Kristanti *et al.*, 2008). Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa radikal bebas melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, maka kelebihanannya akan menyerang komponen lipid, protein maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut dengan stres oksidatif (Winarsi, 2007).

Antioksidan dapat berupa enzim (misalnya superoksida dismutase atau SOD, katalase dan glutathion peroksidase), vitamin (misalnya vitamin E, C, A, dan β -karoten), dan senyawa lain (misalnya flavonoid, albumin). Vitamin C merupakan salah satu antioksidan yang dapat disintesis dalam tubuh. Vitamin ini terdapat dalam seluruh jaringan makhluk hidup dan dapat mempengaruhi reaksi oksidasi-reduksi dalam jaringan. Vitamin C dapat memutus reaksi radikal yang dihasilkan melalui lipid peroksidasi (Sayuti dan Yenrina, 2015).



Gambar 7. Mekanisme Vitamin C sebagai Antioksidan (Huber *et al.*, 2007).

Sumber antioksidan lain yaitu senyawa fenolik seperti flavonoid. Senyawa fenolik adalah senyawa fitokimia sebagai senyawa antioksidan yang paling umum di dalam kingdom tanaman yang dapat digunakan sebagai antioksidan tambahan. Sekitar 5000 fenolat tanaman telah dikenal banyak menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan, baik aktivitas pemadaman oksigen tunggal maupun aktivitas radikal. Macam-macam tingkatan variasi antara senyawa fenolik yang berbeda dalam efektivitas senyawa tersebut sebagai antioksidan ditentukan oleh beberapa fitur struktural (Kristanti *et al.*, 2008).

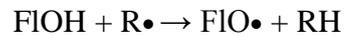
Jumlah dan posisi hidrogen yang akan disumbangkan pada gugus hidroksil pada cincin aromatik dari molekul fenolik mengontrol radikal bebas dan aktivitas antioksidan dari fenolat. Hal ini juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lain seperti glikosilasi aglikon dan gugus penyumbang H lainnya (-NH, SH). Asam fenolik (asam benzoat hidroksil, hidroksifenil asetat dan asam hidroksisinamat) dan turunan ester lainnya, aktivitas antioksidannya tergantung pada jumlah gugus hidroksil dalam molekul yang terpengaruh oleh halangan sterik dari gugus karboksilatnya. Aktivitas antioksidan asam fenolik meningkat dengan gugus hidroksil tambahan. Kedekatan dari gugus karboksilat dan gugus hidroksil pada cincin fenolik di asam hidroksibenzoat mempengaruhi kemampuan donor proton secara negatif.

Hubungan antara senyawa flavonoid dan aktivitas penangkapan radikal bebas ditentukan oleh gugus-gugus yang terikat pada inti flavonoid, terutama ditentukan oleh adanya gugus hidroksi OH pada posisi C-5 dan C-7 serta adanya ikatan rangkap pada posisi C-2 dan C-3. Aktivitas antiradikal bebas akan lebih tinggi apabila ada gugus hidroksi pada C-3, dan C-4. Semakin banyak gugus hidroksi yang terikat pada kerangka flavonoid, maka semakin tinggi pula aktivitas antiradikal bebas (Kristanti *et al.*, 2008).

Tindakan flavonoid melibatkan sebagian besar mekanisme aksi antioksidan yang mencakup (1) penekanan pembentukan ROS baik dengan menghambat enzim atau dengan mengkelasi elemen yang terlibat dalam regenerasi radikal bebas; (2) penangkapan ROS; dan (3) peningkatan regulasi atau perlindungan pertahanan antioksidan. Beberapa efek yang dimediasi senyawa tersebut mungkin hasil gabungan dari aktivitas antioksidan dan interaksi dengan fungsi enzim. Flavonoid menghambat enzim yang terlibat dalam regenerasi ROS, yaitu antara lain mikrosomal monooksigenase, glutathion S-transferase, mitokondria suksinoksidase, NADH oksidase.

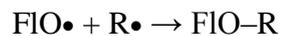
Sebagai senyawa polifenol, flavonoid memiliki kemampuan untuk bertindak sebagai antioksidan dengan mekanisme radikal bebas dengan pembentukan radikal phenoksil flavonoid yang kurang reaktif. Potensi tinggi senyawa flavonoid (FIOH) untuk menangkap radikal bebas ($R\bullet$) dapat dijelaskan oleh

kemampuannya untuk menyumbangkan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya dan dengan demikian menangkap radikal bebas

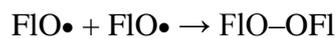


Reaksi penangkapan

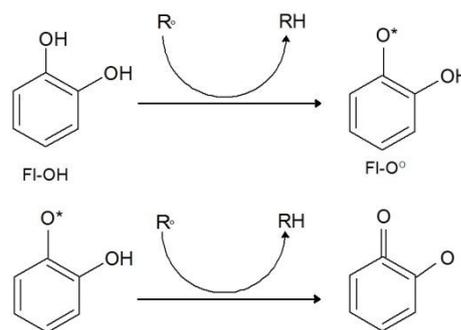
Reaksi diatas membentuk radikal phenoksil flavonoid (Fl-O•) dan molekul yang stabil (RH). Fl-O• kemudian mengalami perubahan pada struktur resonansi dengan mendistribusikan elektron yang tidak berpasangan pada inti aromatik. Dengan demikian, radikal phenoksil flavonoid menunjukkan reaktivitas jauh lebih rendah dibandingkan dengan R•. Fl-O• akan bereaksi lebih lanjut untuk membentuk senyawa aktif, mungkin dengan pemutusan radikal-radikal:



Reaksi kopling radikal-radikal



Reaksi kopling radikal-radikal



Gambar 8. Mekanisme Penangkapan Radikal ROS (R•) oleh Flavonoid (Fl-OH) (Kumar dan Pandey, 2013)

D. Isolasi Senyawa Bahan Alam

Senyawa bahan alam adalah senyawa kimia atau substansi yang diproduksi oleh organisme dan ditemukan secara alami di alam. Suatu metode pemisahan biasanya digunakan untuk mengisolasi dan memurnikan senyawa yang diinginkan dari tumbuhannya. Metode yang biasa digunakan yakni metode ekstraksi untuk mengisolasi senyawa bahan alam, metode kromatografi untuk memisahkan senyawa dari senyawa lainnya, dan metode rekristalisasi untuk pemurniannya.

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan kimia yang didasarkan pada adanya perbedaan partisi zat pada fasa diam (*stationary phase*) dan fasa gerak

(*mobile phase*). Kromatografi didasarkan pada distribusi analit yakni zat yang dipisahkan di antara dua fasa tersebut. Penelitian ini menggunakan beberapa metode kromatografi seperti Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Vakum Cair (KVC), dan Kromatografi Sentrifugal.

1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis yakni kromatografi planar yang fasa diamnya berbentuk lapisan tipis yang melekat pada gelas/kaca, plastik, aluminium sedangkan fasa geraknya berupa cairan atau campuran cairan, biasanya fase gerak berupa pelarut atau campuran pelarut. Pendekatan polaritas adalah yang paling sesuai untuk pemilihan pelarut. Senyawa polar akan lebih mudah terelusi oleh fase gerak yang bersifat polar dari pada fase gerak yang non polar. Sebaliknya, senyawa non polar lebih mudah terelusi oleh fase gerak non polar dari pada fase gerak yang polar.

Metode analisis rinci dari metabolit sekunder yang berada di dalam tanaman paling sering menggunakan metode kromatografi lapis tipis ini. Meskipun ada banyak teknik kromatografi, TLC adalah metode pilihan yang umum sebelum metode kromatografi modern seperti GC dan HPLC ditemukan. Bahkan saat ini, TLC masih sering digunakan untuk analisis produk herbal sebagai metode yang lebih mudah dari screening awal dengan evaluasi semi-kuantitatif bersama-sama dengan teknik kromatografi lainnya. Kesederhanaan, fleksibilitas, kecepatan tinggi, sensitivitas spesifik dan sederhana persiapan sampel adalah keuntungan menggunakan TLC untuk membangun sidik jari. TLC memiliki kelebihan kemungkinan berlipat ganda deteksi dalam analisis produk herbal (Kumar, 2016).

Beberapa tujuan penggunaan KLT adalah untuk mencari pelarut yang sesuai untuk kromatografi kolom, analisis fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, memonitor jalannya suatu reaksi kimia, dan identifikasi senyawa (uji kemurnian). Salah satu komponen penentu keberhasilan kromatografi adalah pelarut, eluen murni atau campuran yang akan mengelusi senyawa-senyawa dalam sampel sepanjang fasa diam (Kristanti *et al.*, 2008).

2. Kromatografi Vakum Cair

Kromatografi Vakum Cair merupakan salah satu kromatografi kolom khusus yang biasanya menggunakan silika gel sebagai adsorbennya. Salah satu perbedaan dengan kromatografi kolom yang menggunakan tekanan pada bagian atas kolom untuk meningkatkan laju aliran, pada kromatografi vakum cair, bagian atasnya terbuka sehingga mudah untuk mengotak-atik kolom atau penggantian pelarut. Langkah pemisahan menggunakan kromatografi vakum cair biasanya dilakukan pada tahap awal pemisahan (pemisahan terhadap ekstrak kasar yang diperoleh langsung dari proses ekstraksi) (Kristanti *et al.*, 2008).

Kromatografi vakum cair memiliki kelebihan dalam memisahkan campuran baik secara besar maupun kecil dengan efisien. Kromatografi vakum cair dapat menghasilkan resolusi secara singkat. Fakta bahwa sistem ini di bawah tekanan vakum menimbulkan pertanyaan tentang volatilitas pelarut, tidak hanya dengan hilangnya pelarut, tetapi juga dengan sehubungan dengan pembentukan gelembung dalam kolom itu sendiri yang akan mengganggu arus kolom. Namun pada kromatografi ini pelarut yang hilang sangat kecil bahkan untuk pelarut yang mudah menguap sehingga pendinginan tidak diperlukan (Targett *et al.*, 1979).

3. Kromatografi Sentrifugal

Kromatografi sentrifugal adalah kromatografi klasik yang berdasarkan pada aliran fasa gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Contoh alat kromatografi ini juga sering disebut sebagai kromatotron. Proses elusi pada kromatografi ini menggunakan pelat yang kemudian dipasang pada poros motor listrik yang 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. Elusi akan menghasilkan pita-pita yang berupa lingkaran. Tepi pelat pita-pita akan terputar keluar dan ditampung dalam tabung penampung kemudian dianalisis lebih lanjut.

Umumnya, sampel 50-500 mg dapat dipisahkan setebal 2 mm sepanjang R_f pada KLT biasa terletak antara 0,2-0,5 (Kristanti *et al.*, 2008).

Kelebihan kromatotron dibandingkan lainnya adalah cara kerjanya yang sederhana, proses pemisahan berlangsung cepat, tidak diperlukan tahapan pengerokan pita, hemat pelarut, rotor yang sudah dilapisi dapat dipakai kembali, pencemar yang ikut terekstraksi dari adsorben jauh lebih sedikit, dapat digunakan sistem eluen yang kepolarannya naik secara bertahap, dan senyawa yang berhasil dipisahkan dapat diperoleh kembali dengan lebih mudah. Namun, kekurangan yang ada adalah terbatasnya fasa diam yang dapat dipilih, tidak tersedianya rotor yang sudah siap pakai dalam perdagangan, daya pisah, dan cara pendeteksiannya yang terbatas (Kristanti *et al.*, 2008).

E. Metode Penentuan Struktur

Penentuan struktur molekul hasil isolasi yang digunakan pada penelitian ini adalah dengan metode spektroskopi menggunakan dua instrumen yaitu spektrofotometer UV-vis, dan NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*). Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direflesikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Apabila radiasi atau cahaya putih dilewatkan melalui larutan berwarna, maka radiasi pada panjang gelombang tertentu akan diserap (absorpsi) secara selektif dan radiasi lainnya akan diteruskan (transmisi). Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang dihamburkan diukur sebagai transmitansi (T) dinyatakan dengan hukum *Lambert Beer* yang berbunyi, “jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah, dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal kuvet larutan” (Neldawati *et al.*, 2013).

Salah satu cara standar yang lain untuk menentukan struktur suatu molekul organik adalah dengan menggunakan spektroskopi NMR. Spektroskopi NMR didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik bila molekul tersebut berada dalam medan magnet yang kuat..

Terdapat dua jenis spektroskopi NMR yaitu spektroskopi NMR proton dan spektroskopi NMR karbon-13. Spektroskopi NMR proton atau ^1H yang memberikan informasi struktural mengenai atom-atom hidrogen dalam sebuah molekul organik, sedangkan spektroskopi NMR karbon-13 atau ^{13}C menghasilkan informasi struktur mengenai karbon-karbon dalam sebuah molekul organik (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Metode spektroskopi NMR memberikan informasi jumlah serta lingkungan kimiawi proton dan karbon. Pergeseran kimia (δ ppm) dan pemecahan puncak dari NMR proton dan karbon kemudian membandingkannya dengan spektra dari suatu publikasi ilmiah seringkali sudah cukup untuk mengetahui struktur suatu senyawa. Kedua jenis spektra NMR merupakan sidik jari suatu molekul yang sangat otentik. Berdasarkan urutan bekerja, metode NMR memiliki dua macam yaitu satu dimensi (1D) dan dua dimensi (2D). 1D NMR terdiri dari ^1H dan ^{13}C NMR masing-masing untuk menentukan jumlah proton dan karbon serta basis lingkungan kimiawinya, sedangkan 2D NMR digunakan untuk menentukan secara detail lingkungan antara proton dan karbon serta atom lain (Saifudin, 2002).

F. Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan bergantung pada hidro/lipofilisitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman bergantung pada konsentrasi senyawa fitokimia antioksidan dan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi, dan juga pada bentuk persiapan. Kapasitas antioksidan untuk menilai kemampuan dalam menangkal efek dari berbagai radikal telah diperkenalkan dalam beragam macam metode uji. Pada pengujian aktivitas antioksidan dalam ekstrak etil asetat batang *Muntingia calabura* L, uji yang dilakukan yaitu metode DPPH.

Uji DPPH didasarkan pada reduksi DPPH \cdot yang berwarna ungu menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin dengan terjadinya perubahan warna. DPPH \cdot merupakan radikal bebas yang stabil dengan penyerapan karakteristik pada panjang gelombang 515 nm. Tingkat perubahan warna menunjukkan potensi antioksidan sampel. Antioksidan yang menyumbangkan proton untuk radikal ini menurunkan absorbansi. Penurunan absorbansi diambil sebagai tolak ukur tingkat

penangkapan radikal. Absorbansi yang lebih rendah pada 517 nm merepresentasikan tingginya aktivitas penangkapan DPPH.

Metode DPPH menunjukkan adanya penyerapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dikarenakan elektron bebas yang dimilikinya serta larutannya yang berwarna ungu gelap. Pada spektrofotometer UV-vis, warna yang diserap oleh suatu senyawa adalah warna komplementer dari warna yang teramati. Hal tersebut dapat diketahui dari larutan berwarna yang memiliki serapan maksimum pada warna komplementernya. DPPH memiliki warna ungu gelap yang menjadi warna komplementernya, sehingga DPPH akan menyerap sinar tampak berwarna hijau pada 517 nm secara maksimal. Penyerapan DPPH pada panjang gelombang tersebut akan mengalami penurunan seiring dengan perubahan warna serta elektron yang telah berpasangan sebagai akibat reaksi dengan antioksidan. Perubahan warna tersebut secara stoikiometri berhubungan dengan elektron yang diambil (Kedare dan Singh, 2011).

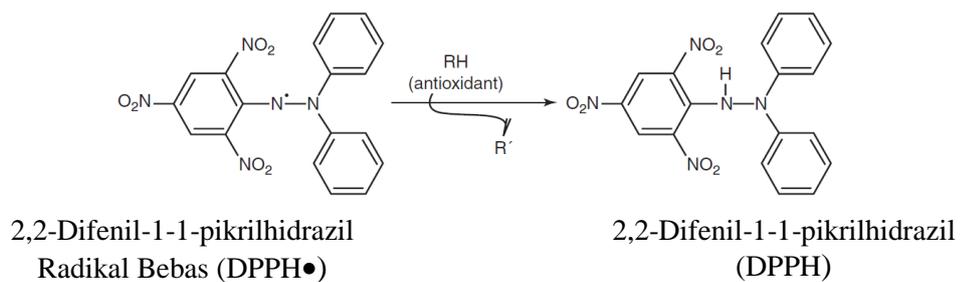
Konsentrasi DPPH yang akan diukur serapan sinarnya relatif encer sesuai dengan hukum *Lambert Beer*. Hukum *Lambert Beer* dapat menyatakan hubungan antara serapan cahaya dengan konsentrasi zat dalam larutan. Pada konsentrasi yang kental, dikhawatirkan hukum *Lambert Beer* sudah tidak berlaku karena indeks bias larutan ikut berpengaruh dalam penyerapan sinar. Selain itu dikhawatirkan linieritas percobaan menjadi berubah. Hasil pengukuran disajikan dalam bentuk konsentrasi sisa DPPH yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Hubungan hukum *Lambert Beer* (Molyneux, 2004) membentuk rumus:

$$A = \epsilon c l$$

Dimana ϵ adalah absorptivitas molar, c adalah konsentrasi zat terlarut dan l adalah panjang kuvet yang digunakan.

Metode DPPH ini digunakan karena sifatnya yang sederhana, mudah, cepat, dan peka, serta hanya memerlukan sedikit sampel. Selain itu, metode ini tidak terbatas hanya untuk senyawa yang larut dalam pelarut tertentu. Metode ini dapat menggunakan pelarut berair dan pelarut organik yang nonpolar serta dapat mengidentifikasi antioksidan hidrofilik maupun lipofilik (Hanani *et al.*, 2005; Kedare dan Singh, 2011). Uji DPPH memberikan gambaran umum tentang

kemampuan penangkapan radikal suatu senyawa (Kumar, 2016). Salah satu parameter untuk memperlihatkan hasil dari metode DPPH, adalah IC_{50} yang didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan hilangnya 50% dari aktivitas DPPH (warna) (Molyneux, 2004).



Gambar 9. Reaksi Uji DPPH (Kumar, 2016)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

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

B. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksplorasi yang meliputi: pemisahan atau partisi fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* dengan berbagai teknik kromatografi, antara lain Kromatografi Vakum Cair, Kromatografi Radial dan Kromatografi Lapis Tipis. Senyawa murni yang diperoleh ditentukan struktur molekulnya dengan Spektroskopi UV, ¹H-NMR, dan ¹³C-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, neraca analitik, peralatan Kromatografi Vakum Cair (KVC), alat penguap vakum putar/*rotary evaporator* (EYELA USA N-1001-S-WD, Cat Num 216959), lampu UV, peralatan kromatografi lapis tipis, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, UV Biospec-1601), Spektrometer ¹H-NMR (JEOL JMN A 5000, 500MHz) dan ¹³C-NMR (JEOL JMN A5000, 125 MHz) di Institut Teknologi Bandung.

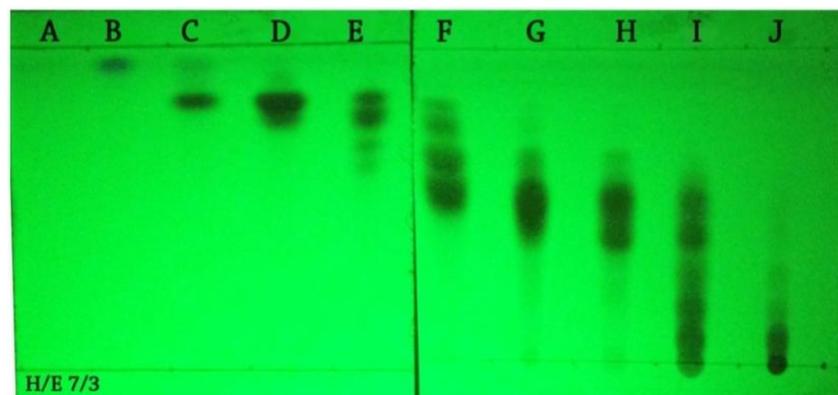
Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* kering yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Septianto (2017) yang memiliki massa 11,999 g. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, kloroform, dan berbagai 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 (DPPH), asam askorbat (Merck milipore Cat. Num 1531) dan BHT (Brataco Chem).

2. Prosedur Penelitian

a. Pemisahan Fraksi Etil Asetat

Fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* kering yang dihasilkan dari penelitian Septianto (2017) yang memiliki berat 11,999 g. Fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. dipisahkan dengan teknik KVC menggunakan fasa diam berupa silika gel serta fasa gerak berupa campuran eluen n-heksana : etil asetat yang dielusi secara SGP (*Step Gradient Polarity*) dari n-heksana : etil asetat (9,5 : 0,5), n-heksana : etil asetat (9 : 1), n-heksana : etil asetat (8 : 2), n-heksana : etil asetat (7 : 3), dan etil asetat 100%, sehingga diperoleh 10 fraksi utama yaitu Fraksi A (0,0066 g); B (0,0648 g); C (0,0484 g); D (0,3249 g); E (0,2586 g); F (0,8492 g); G (1,3291 g); H (0,9076 g); I (1,3626 g); J (0,96 g). Hasil pemisahan dimonitoring dengan KLT dengan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 7 : 3. Selanjutnya, fraksi-fraksi tersebut dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan teknik kromatografi radial serta kromatografi vakum cair.

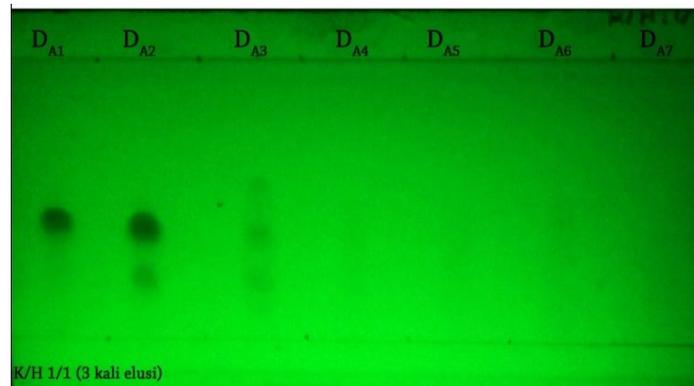


Gambar 10. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* L.

b. Pemisahan Fraksi D dan F

Fraksi D (0,3249 g) kemudian dilarutkan dengan etil asetat. Fraksi ini membentuk dua fasa yaitu fasa yang larut dalam etil asetat dengan fasa kemudian dipisahkan menjadi fraksi D_A yang larut dalam etil asetat dan fraksi D_B yang tidak larut dalam etil asetat. Fraksi D_A kemudian dipisahkan dengan kromatografi radial. Pemisahan fraksi D_A menggunakan eluen n-heksana: kloroform (7: 3).

Hasil pemisahan fraksi D_A menghasilkan 7 fraksi yaitu, D_{A1} (0,0811 g); D_{A2} (0,0299 g); D_{A3} (0,0107 g); D_{A4} (0,0062 g); D_{A5} (0,0038 g); D_{A6} (0,007 g) dan D_{A7} (0,0045 g). Ketujuh fraksi ini kemudian dimonitoring dengan eluen n-heksana: kloroform (1: 1).



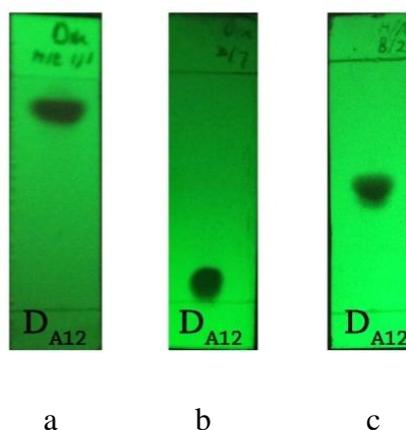
Gambar 11. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi D_A *Muntingia calabura* L. dengan eluen n-heksana : kloroform (1 : 1)

Fraksi D_{A1} yang berbentuk kristal kemudian direkristalisasi dengan menggunakan eluen n-heksana : kloroform (2 : 8) sebanyak 2 mL dan dihasilkan fraksi yang terlarut dan fraksi yang tidak terlarut dalam eluen. Fraksi tersebut kemudian dipisahkan dan dihasilkan fraksi D_{A11} (0,02 g) dan D_{A12} (0,0227 g).

Hasil kromatogram pada Gambar 11 menunjukkan bahwa fraksi D_{A12} (0,02 g) sudah memiliki spot tunggal. Uji kemurnian dengan menggunakan tiga eluen yang berbeda kemudian dilakukan untuk memastikan lebih lanjut apakah fraksi tersebut telah murni. Fraksi D_{A12} diuji dengan eluen n-heksana : etil asetat (1 : 1), n-heksana : kloroform (7: 3) dan n-heksana : aseton (8 : 2).

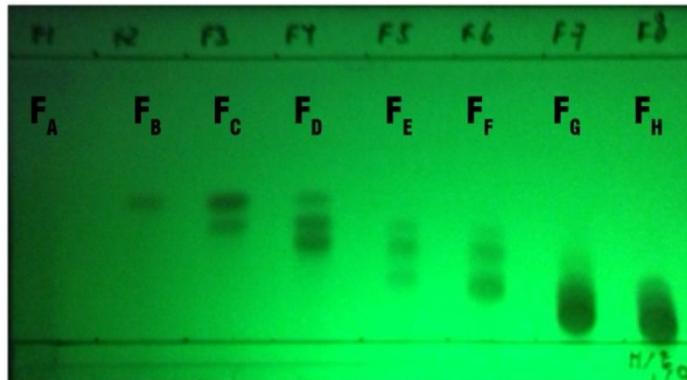


Gambar 12. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi D_{A1} *Muntingia calabura* L. dengan eluen n-heksana : kloroform (7 : 3).



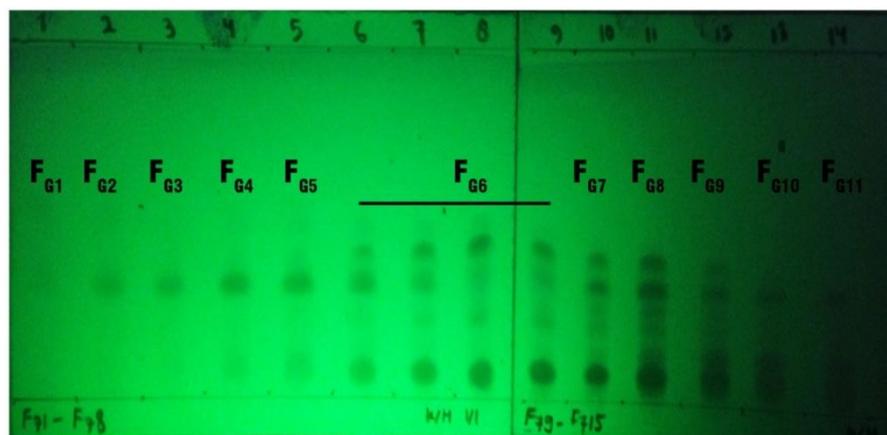
Gambar 13. Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Senyawa Isolat I (Fraksi D_{A12}) dengan eluen a) n-Heksana : Etil Asetat (1 : 1), b) n-Heksana : Kloroform (7 : 3), dan c) n-Heksana : Aseton (8 : 2)

Fraksi F (849,2 mg) kemudian dipisahkan dengan menggunakan KVC dengan eluen n-heksana : etil asetat (9,5 : 0,5) n-heksana : etil asetat (9,25 : 0,75) dua kali elusi, n-heksana : etil asetat (9 : 1) dua kali elusi, dan n-heksana : etil asetat (8 : 2) dua kali elusi. Pemisahan fraksi F menghasilkan 8 fraksi yaitu F_A (10,7 mg); F_B (1,9 mg); F_C (14,3 mg); F_D (39,6 mg); F_E (45,7 mg); F_F (53,8 mg); F_G (303,8 mg); F_H (231,4 mg).



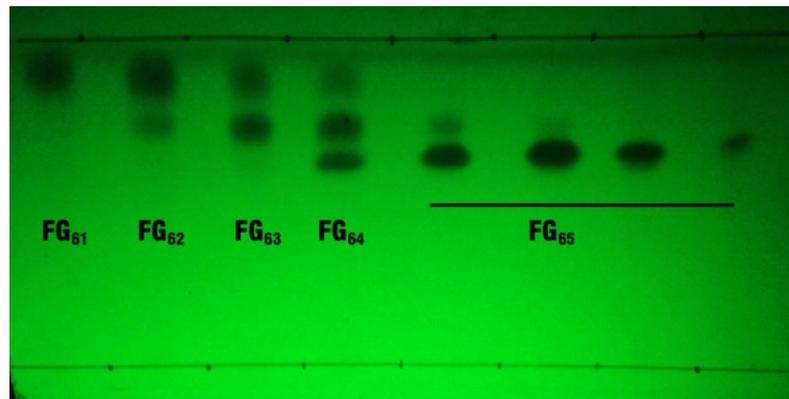
Gambar 14. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi F *Muntingia calabura* L. dengan Eluen Kloroform : n-Heksana (1 : 1)

Fraksi F_G kemudian dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi radial dengan eluen n-heksana : etil asetat (7,5 : 2,5). Hasil pemisahan tersebut yang menghasilkan fraksi dengan Rf yang sama kemudian digabung menghasilkan 11 fraksi yaitu F_{G1} (0,8 mg); F_{G2} (6,7 mg); F_{G3} (1,2 mg); F_{G4} (11,5 mg); F_{G5} (23,4 mg); F_{G6} (178,1 mg); F_{G7} (14,3 mg); F_{G8} (15,1 mg); F_{G9} (13,9 mg); F_{G10} (7,1 mg); F_{G11} (10,6 mg).



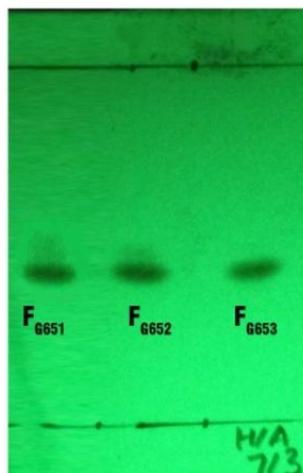
Gambar 15. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi F_G *Muntingia calabura* L. dengan Eluen Kloroform : n-Heksana (1 : 1)

Fraksi F_{G6} (178,1 mg) kemudian dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi radial dengan eluen kloroform : metanol (9,5 : 0,5). Hasil dari pemisahan fraksi F_{G6} yang memiliki Rf yang sama kemudian digabung dan dihasilkan 5 fraksi yaitu F_{G61} (6,4 mg); F_{G62} (13,2 mg); F_{G63} (1,2 mg); F_{G64} (14,9 mg); F_{G65} (39,3 mg).

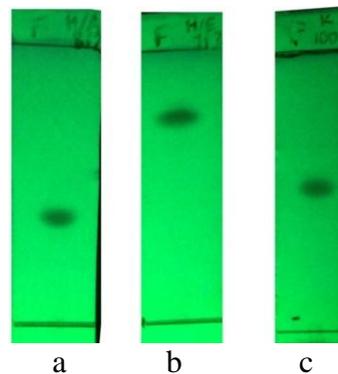


Gambar 16. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi F_{G6} *Muntingia calabura* L. dengan Eluen Kloroform : Metanol (9,25 : 0,75)

Hasil pemisahan F_{G65} dipisahkan kembali menggunakan kromatografi radial dengan eluen n-heksana : aseton (8 : 2). Hasil dari pemisahan fraksi F_{G65} menghasilkan tiga fraksi yaitu F_{G651} (10,2 mg); F_{G652} (1,6 mg); F_{G653} (8,1 mg). Hasil kromatogram pada Gambar 16 menunjukkan bahwa fraksi F_{G653} sudah memiliki spot tunggal, sehingga untuk memastikannya dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan sistem tiga eluen yaitu eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3), n-heksana : aseton (8 : 2), dan kloroform (100%).



Gambar 17. Kromatogram Hasil Pemisahan Fraksi F_{G65} *Muntingia calabura* L. dengan Eluen n-Heksana : Aseton (7 : 3)



Gambar 18. Kromatogram Uji Kemurnian Sistem 3 Eluen Senyawa Isolat II (Fraksi F_{G653}) dengan Eluen a) n-Heksana : Aseton (8 : 2), b) n-Heksana : Etil Asetat (7 : 3) c) Kloroform (100%)

c. Tahap Identifikasi

Senyawa murni hasil isolasi ditentukan struktur molekulnya menggunakan data spektroskopi dari spektrofotometer UV-Vis, dan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (¹H-NMR dan ¹³C-NMR).

C. Teknik Pengumpulan dan Analisis Data

1. Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil pikrilhidrazil). Senyawa murni hasil isolasi dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* dilarutkan dalam pelarut metanol kemudian dibuat konsentrasi bervariasi yaitu 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Masing-masing 1ml larutan uji ditambahkan 3ml larutan DPPH 0,1Mm 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 3 kali perlakuan yang sama (*triplo*). 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 (Kumar, 2016) 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 1.

Tabel 1. Data Pengamatan Absorbansi Sampel dan Standar Konsentrasi

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	
Methanol					
DPPH					

Keterangan

Standar : BHT dan Asam askorbat

Sampel : Larutan sampel dari senyawa murni hasil isolasi dari fraksi etil asetat *Muntingia calabura*

2. Nilai IC₅₀

Persen aktivitas antioksidannya yang sudah diperoleh selanjutnya ditentukan nilai IC₅₀ pada semua sistem. Nilai IC₅₀ 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 IC₅₀, 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).

Tabel 2. Angka IC₅₀ Sampel Dan Standar

Jenis Larutan	IC ₅₀	Jenis Standar	IC ₅₀
Sampel		Asam Askorbat	
		BHT	

Keterangan

Standar : BHT dan Asam askorbat

Sampel : Larutan sampel dari senyawa murni hasil isolasi dari fraksi etil
asetat .

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan

Pemisahan fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. dilakukan dengan menggunakan teknik KVC dan kromatografi radial. Kedua teknik tersebut menggunakan eluen tertentu sehingga dihasilkan tiga senyawa isolat murni. Penentuan struktur terhadap senyawa hasil isolasi ditentukan dengan menganalisa data spektroskopi UV-Vis, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR.

1. Identifikasi Senyawa Isolat I

Senyawa isolat I yang berasal dari fraksi E₆₁ larut dalam etil asetat. Data spektrum UV untuk senyawa isolat I dalam pelarut metanol (MeOH) yang telah dioptimasi pada rentang panjang gelombang 190 nm sampai 400 nm menunjukkan adanya serapan maksimum pada gelombang 265 nm dan 211nm. Panjang gelombang tersebut merupakan spektrum khas senyawa golongan flavonoid dimana spektrumnya terdiri atas dua panjang gelombang maksimum yang berada pada rentang antara 240-285 nm untuk pita II dan 300-550 nm untuk pita I. Berdasarkan spektrum UV, senyawa isolat I diduga merupakan senyawa turunan flavonoid.

Data ¹H-NMR dengan menggunakan pelarut CDCl₃ menunjukkan adanya intensitas proton dengan multiplisitas singlet (6H) pada pergeseran kimia δ_H 3,86 ppm yang mengindikasikan adanya gugus metoksi (-OCH₃). Di daerah pergeseran aromatik, sepasang sinyal proton dengan masing-masing pergeseran kimia δ_H 6,44 ppm dan δ_H 6,35 ppm serta multiplisitas doublet yang berkopling meta ($J= 2,3$ Hz) tersebut pada sinyal proton aromatik H-6 dan H-8 pada cincin A. Hal tersebut dibuktikan karena konstanta kopling keduanya bernilai 2,2 Hz dimana konstanta kopling untuk meta 1-3 Hz. Hal ini juga membuktikan bahwa pada cincin A terdapat dua substituen yang berposisi pada C-5 dan C-7. Sinyal proton yang menunjukkan adanya cincin benzena beresonansi pada pergeseran kimia δ_H 7,51 ppm (3H, m, H-1', H-3', dan H-

5'), dan δ_H 8,07 ppm (2H, m, H-2', H-6'). Sinyal proton yang multiplet tersebut menunjukkan cincin benzena yaitu pada cincin B termonosubstitusi.

Berdasarkan analisa HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) pada Lampiran 8. Sinyal pada δ_H pada 3,86ppm (6H, s) merupakan gugus metoksi pada δ_H 6,44 ppm (1H, $J= 2,3\text{Hz}$) dan δ_H 6,35 ppm (1H, $J= 2,3\text{ Hz}$) berkorelasi dengan dua sinyal δ_C 97,94 ppm dan δ_C 92,17 ppm pada spektrum HMQC. Sinyal ini menghubungkan H-3 dan H-7 pada cincin A ke posisi C-3 dan C-7. Sinyal pada pergeseran kimia δ_H 6.44 ppm yang berkorelasi dengan C-6, δ_H 6.35 ppm yang berkorelasi dengan C-8, δ_H 8.08 ppm yang berkorelasi dengan C-2' dan C-6', serta δ_H 7.51 ppm yang berkorelasi dengan C-1', C-3' dan C-5' dimana semuanya menunjukkan karbon metin (-CH) pada cincin A dan cincin B.

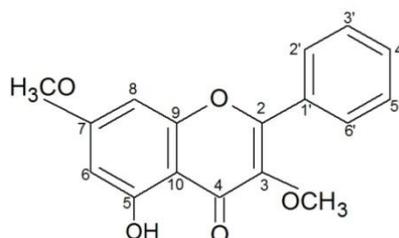
Berdasarkan semua data yang diperoleh, diduga bahwa senyawa isolat I yang didapat dari hasil pemisahan merupakan senyawa 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon ($C_{17}H_{14}O_5$). Pembuktian lebih lanjut maka dilakukan perbandingan data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ antara senyawa isolat I dengan senyawa 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon yang telah diisolasi sebelumnya dari daun *Muntingia calabura* L. (Yusof *et al.*, 2013).

Tabel 3. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa I

Posisi	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)		$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	
	Isolat II	Literatur (Yusof <i>et al.</i> , 2013)	Isolat II	Literatur (Yusof <i>et al.</i> , 2013)
2	-	-	155.88	155.9
3	-	-	139.65	139.6
7	-	-	165.5	165.5
4	-	-	178.92	178.9
5	-	-	161.99	162.0
6	6.44(1H,d, $J= 2,3\text{ Hz}$)	6.46(1H,d, $J=2,1\text{ Hz}$)	97.94	97.9
8	6.35(1H,d, $J=2,3$ Hz)	6.37(1H,d, $J=2,1\text{ Hz}$)	92.17	92.2
9	-	-	156.87	156.8
10	-	-	106.16	106.1
1'	7.51(3H, m)	7.53(3H, m)	130.9	130.9
3' dan 5'	7,53 (3H, m)	7,53 (3H, m)	128,75	128,6

Tabel 3. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa I (Lanjutan)

Posisi	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)		$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)	
	Isolat II	Literatur (Yusof <i>et al.</i> , 2013)	Isolat II	Literatur (Yusof <i>et al.</i> , 2013)
2' dan 6'	8,08 (2H, m)	8,08 (2H, m)	128,53	128,3
4'	-	-	130.4	130.4
3-OCH ₃	3.86(6H,s)	3.88(6H,s)	60.36	60.4
7-OCH ₃			55.8	55.8
5-OH	12.57(1H,s)	12.65(1H,s)	-	-

**Gambar 19.** Struktur Senyawa Isolat I

2. Identifikasi Senyawa Isolat II

Senyawa isolat II yang berasal dari fraksi E₆₁ larut dalam aseton. Data spektrum UV untuk senyawa isolat II dengan pelarut MeOH yang telah dioptimasi sebelumnya pada rentang 190 nm sampai 400 nm menunjukkan adanya serapan maksimum pada gelombang 315,6 nm; 304,2 nm; dan 211 nm. Data spektrum ini merupakan spektrum khas untuk senyawa flavonoid yang terdiri atas dua panjang gelombang maksimum yang berada pada rentang antara 240-285 nm untuk pita II dan 300-350 nm untuk pita I. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat II diduga merupakan senyawa turunan flavonoid.

Berdasarkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan adanya sinyal proton singlet pada pergeseran kimia δ_{H} 13,35 (1H) yang menunjukkan adanya gugus hidroksil bebas. Sinyal proton multiplet yang berada pada kisaran δ_{H} 7,43 ppm dan δ_{H} 7,65 ppm menunjukkan terdapat cincin benzena termonosubstitusi. Adanya dua sinyal proton yang doublet yang khas pada pergeseran kimia δ_{H} 7,57 ppm ($J= 15,5$ Hz) dan δ_{H} 7,88 ppm ($J= 15,45$ Hz) merujuk pada adanya H _{α} serta H _{β} pada struktur isolat II. Konstanta kopling

(J) yang berada antara dikisaran 15-16,1 Hz menandakan sistem vinilik pada H_α dan H_β .

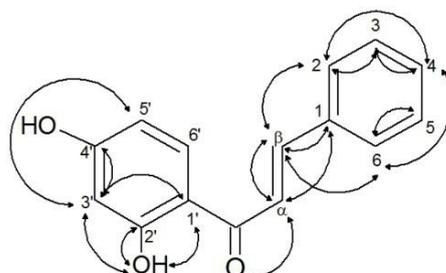
Berdasarkan data ^{13}C -NMR dari senyawa isolat II dalam pelarut CDCl_3 menunjukkan adanya 15 sinyal karbon yang berhasil teridentifikasi. Sinyal-sinyal karbon tersebut antara lain sinyal karbon pada pergeseran kimia δ_{C} 192,07 ppm merujuk pada adanya gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$), 6 sinyal karbon metin ($-\text{CH}$) aromatik pada δ_{C} 134,92 ppm, 128,69 ppm, dan 129,02 ppm, serta sinyal karbon olefinik pada δ_{C} 120,46 ppm dan δ_{C} 144,67 ppm yang menyatakan adanya C- α dan C- β .

Tabel 4. Korelasi HMBC Isolat II dalam Pelarut CDCl_3

Posisi C	^1H -NMR (ppm)	
	δ_{C}	HMBC
1	134,92	α -H, β -H,
2,6	128,69	β , 3, 4, 5
3,5	129,02	4
4	130,83	2, 6,
α -C	120,46	β -H
β -C	144,67	α -H
C=O	192,07	α -H
1'	114,52	3', OH-2
2'	166,63	OH-2
3'	103,90	OH-2
4'	163,21	3', OH-2
5'	108,01	3'
6'	132,12	-

Analisa lebih lanjut menggunakan spektra 2D NMR yaitu HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) yaitu spektra pengimpitan horizontal vs vertikal antara sinyal ^1H -NMR dengan ^{13}C -NMR. Berdasarkan spektra HMBC pada Tabel 4, sinyal pada pergeseran kimia δ_{H} 13,35 ppm berkorelasi baik jarak dekat maupun jarak jauh dengan δ_{C} 114,52 (C-1), 166,63 (C-2), 103,90 (C-3), 163,21 (C-4) yang menunjukkan adanya gugus hidroksil. Selain itu, sinyal pada pergeseran kimia δ_{H} 7,88 berkorelasi dengan δ_{C} 120,46 (C-1) yang menandakan adanya H- α , dan sinyal proton pada δ_{H} 7,57 ppm berkorelasi dengan karbon pada δ_{C} 144,67 ppm dan δ_{C} 192,07 ppm

yang menandakan adanya H- β . Hal ini merujuk pada kemungkinan senyawa isolat II merupakan senyawa calkon dengan dua gugus hidroksil pada cincin A.



Gambar 20. Korelasi HMBC Senyawa II

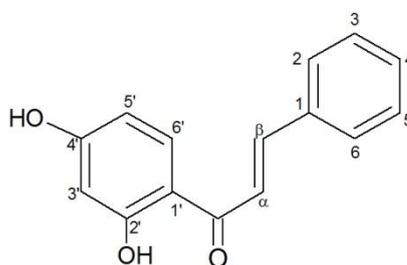
Dugaan bahwa senyawa isolat II merupakan senyawa calkon didukung perbandingan data senyawa isolat dengan data yang telah dipublikasikan (Sufian *et al.*, 2013). Struktur ini memiliki dua gugus hidroksi (-OH) yang berada pada posisi 2' dan 4' pada cincin A, serta memiliki C- α dan C- β yang khas. Untuk pembuktian lebih lanjut maka dilakukan perbandingan data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ antara senyawa isolat II dengan senyawa 2',4'-dihidroksicalkon ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3$) yang telah diisolasi sebelumnya dari daun *Muntingia calabura* L. (Sufian *et al.*, 2013).

Tabel 5. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Isolat II dalam pelarut CDCl_3

Posisi	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$	
	Isolat II	Literatur (Sufian <i>et al.</i> , 2013))	Isolat II	Literatur (Sufian <i>et al.</i> , 2013)
1	-	-	134,92	134,70
2,6	7,65 (m)	7,65 (m)	128,69	128,54
3,5	7,43 (m)	7,43 (m)	129,02	128,99
4			130,83	130,72
1'	-	-	114,52	114,45
2'	-	-	166,63	166,42
4'	-	-	163,21	162,76
3'	6,44 (d, J = 2,3Hz)	6,44 (d, J = 2,1Hz)	103,90	103,75
5'	6,45 (dd, J= 8,2hz, 2,3Hz)	6,47 (dd, J = 9,3Hz, 2,1Hz)	108,01	107,79
6'	7,83 (d= 8,7Hz)	7,83 (d =9,3)	132,12	132,01
α	7,57 (d, J=15,5Hz)	7,57 (d, J=15,6Hz)	120,46	120,21

Tabel 5. Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Isolat II dalam Pelarut CDCl_3 (Lanjutan)

Posisi	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$	
	Isolat II	Literatur (Sufian <i>et al.</i> , 2013))	Isolat II	Literatur (Sufian <i>et al.</i> , 2013)
β	7,88 (d, $J=15,45\text{Hz}$)	7,88 (d, $J=$ 15,6Hz)	144,67	144,61
C=O	-	-	192,07	191,95
OH-2'	13,35(s)	13,43 (s)	-	-

**Gambar 21.** Struktur Senyawa Isolat II

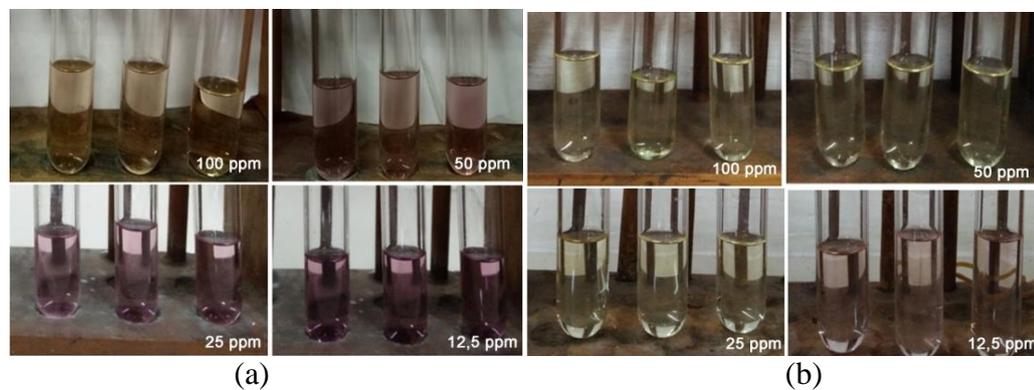
B. Aktivitas Antioksidan terhadap Senyawa Hasil Isolasi dengan Metode DPPH

Uji antioksidan yang dilakukan untuk mengukur aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi adalah menggunakan metode DPPH (difenil pikril hidrazil hidrat). Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan ketiga senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. dalam menghambat radikal bebas DPPH.

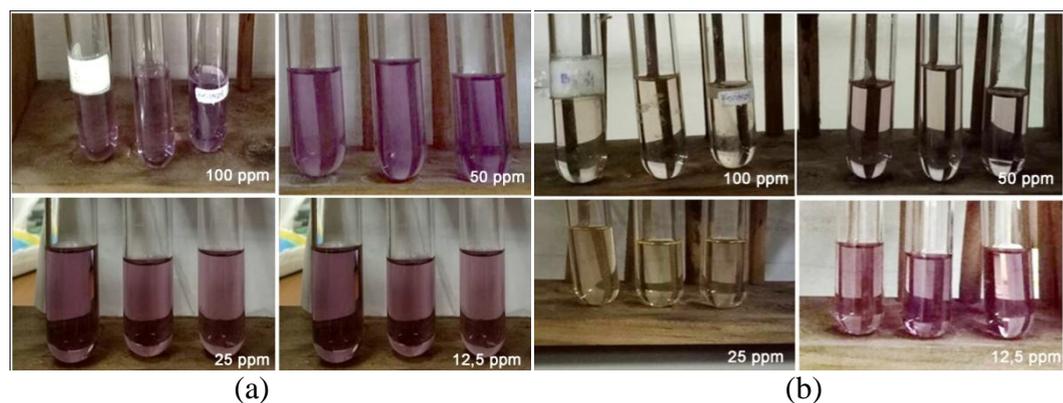
DPPH yang dilarutkan dalam alkohol akan menghasilkan radikal bebas yang aktif. Pada bentuk radikal tersebut, DPPH^\bullet memiliki pita penyerapan pada 515nm yang mana akan menghilang karena reduksi dari senyawa antiradikal atau senyawa antioksidan (Bohm dan Schlesier, 2004). Prinsip metode DPPH adalah penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan sampel mentransferkan atom hidrogen. Hal ini menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning.

Uji antioksidan dilakukan menggunakan dua standar sebagai kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah larutan vitamin C dan BHT (*Butylated Hydroxyl Toluene*) yang dicampurkan dengan larutan DPPH untuk menunjukkan

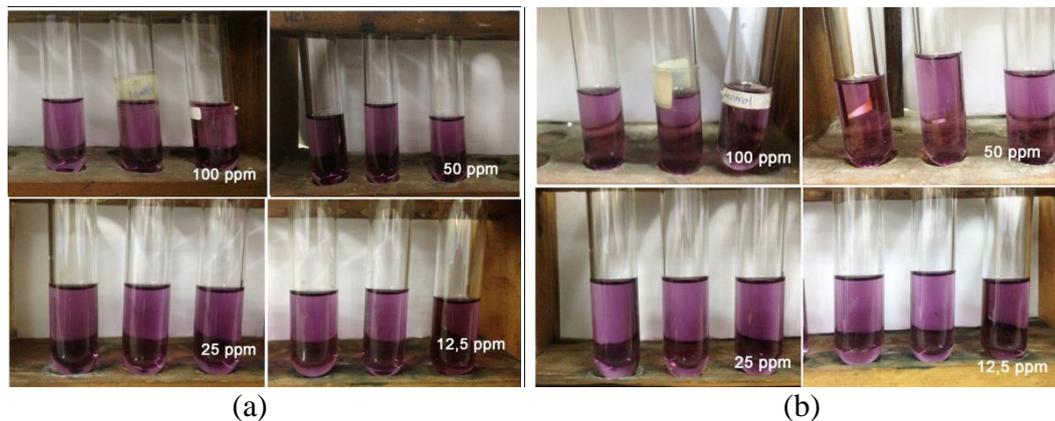
perubahan warna saat hasil uji positif. Vitamin C dan BHT digunakan sebagai kontrol karena kedua larutan ini telah terbukti memiliki aktivitas terhadap DPPH[•]. Kedua senyawa ini digunakan untuk mewakili antioksidan alami dan sintetik. Vitamin C bekerja sebagai antioksidan sekunder yang menghambat aktivitas radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai, sedangkan BHT bekerja dengan memberikan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi senyawa yang lebih stabil. Kedua senyawa ini biasa digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan secara kualitatif dan kuantitatif (Kumar, 2016).



Gambar 22. Perubahan Warna Asam Askorbat dengan Metode DPPH (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi Selama 30 menit



Gambar 23. Perubahan Warna BHT dengan Metode DPPH (a) Sebelum Inkubasi (b) Sesudah Inkubasi Selama 30 menit



Gambar 24. Perubahan Warna Isolat I dengan Metode DPPH (a) Sebelum Inkubasi (b) Setelah Inkubasi Selama 30 menit



Gambar 25. Perubahan Warna Isolat II dengan Metode DPPH (a) Sebelum Inkubasi (b) Setelah Inkubasi Selama 30 menit

Isolat dan standar yang telah diukur dengan uji DPPH menunjukkan adanya perubahan warna. Perubahan warna yang signifikan dari ungu menjadi kuning terjadi pada pengamatan standar asam askorbat dan BHT yang telah dicampurkan dengan DPPH (Gambar 20 dan Gambar 21), namun perubahan warna kurang signifikan terjadi pada senyawa isolat I, isolat II (Gambar 23 dan 24). Kedua senyawa isolat memiliki intensitas warna kurang lebih sama dari sebelum dan sesudah inkubasi. Kemungkinan hanya sedikit elektron dari kedua senyawa isolat yang dapat berikatan dengan radikal DPPH, sehingga kurang memiliki kemampuan aktivitas antioksidan apabila dibandingkan dengan kedua standar. Hal tersebut mengakibatkan intensitas warna DPPH radikal sisa yang belum

bereaksi dengan antioksidan masih banyak sehingga warna ungu dari DPPH memiliki intensitas warna yang tinggi.

Isolat dan standar yang telah diuji kemudian diukur aktivitas antioksidannya dengan mengukur absorbansinya melalui spektrofotometri dengan panjang gelombang 517 nm. Hasil dari pengukurannya adalah sebagai berikut:

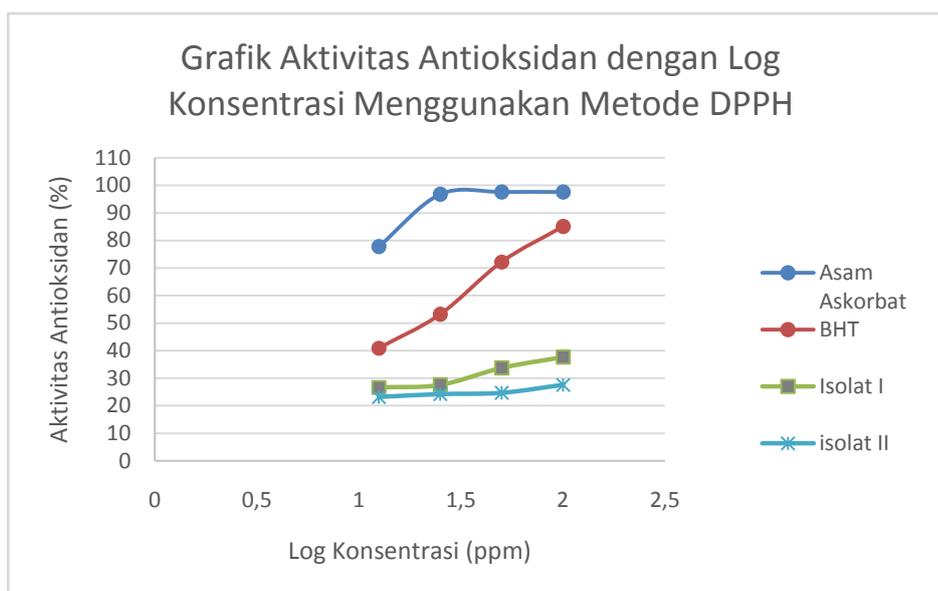
Tabel 6. Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Larutan	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Absorbansi Rerata	Aktivitas Antioksidan (%)
		Abs 1	Abs 2	Abs 3		
Kontrol					0,668	
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
Isolat I	12,5	0,489	0,485	0,496	0,490	26,65
	25	0,484	0,495	0,474	0,484	27,50
	50	0,457	0,458	0,414	0,443	33,68
	100	0,433	0,403	0,414	0,417	37,62
Isolat II	12,5	0,516	0,489	0,534	0,513	23,20
	25	0,504	0,512	0,503	0,506	24,20
	50	0,526	0,505	0,479	0,503	24,65
	100	0,47	0,491	0,490	0,484	27,59

Pengukuran data absorbansi dari asam askorbat, BHT, dan ketiga senyawa isolat dilakukan dengan tiga kali replikasi. Tabel 5 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi sampel maka semakin kecil nilai absorbansi. Hal ini sejalan dengan berkurangnya warna ungu dari radikal DPPH[•] akibat adanya donasi proton dari sampel sehingga menghasilkan DPPH-H yang lebih stabil. Persentase aktivitas antioksidan yang semakin tinggi juga membuktikan adanya perubahan tersebut. Sehingga, penurunan absorbansi inilah yang menjadi ukuran seberapa besar sampel berpotensi untuk menangkap radikal (Kumar, 2016). Data absorbansi yang telah didapat kemudian dibuat grafik hubungan aktivitas

antioksidan dengan konsentrasi, yang mana persentase aktivitas antioksidan sebagai nilai pada sumbu x dan log konsentrasi sebagai nilai pada sumbu y. Hasil perbandingan tersebut ditunjukkan pada Gambar 25.

Nilai IC_{50} menyatakan nilai konsentrasi efektif larutan uji yang diperlukan untuk menurunkan 50% aktivitas DPPH. Nilai IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linier antara konsentrasi larutan sampel terhadap persen inhibisi sebagai persen aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004). Sehingga aktivitas antioksidan dapat diketahui dari nilai IC_{50} . Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar senyawa berpotensi sebagai zat antioksidan. Berdasarkan persamaan regresi yang didapatkan dari grafik hubungan antara persentase aktivitas antioksidan dengan log konsentrasi, maka nilai IC_{50} dari setiap standar dan senyawa isolat dapat diketahui, yakni berdasarkan Gambar 26 sampai dengan Gambar 29.



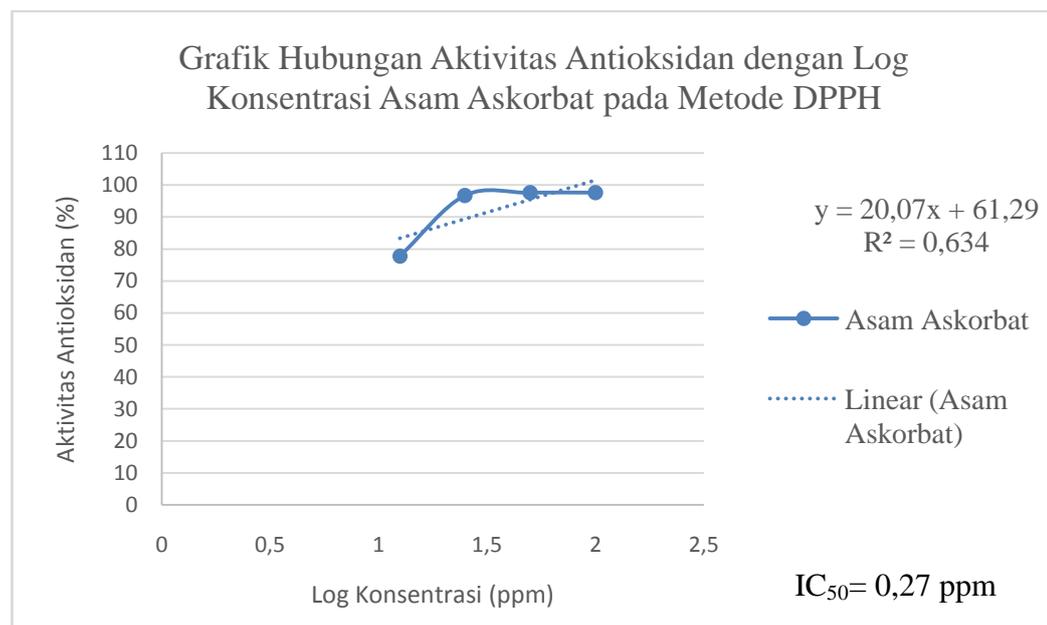
Gambar 26. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi Sampel Menggunakan Metode DPPH

Nilai IC_{50} berdasarkan persamaan regresi linier dari grafik antara persentase aktivitas antioksidan dengan konsentrasi isolat dan standar pada metode DPPH yakni sebagai berikut:

Tabel 7. Nilai IC_{50} Standar dan Isolat Metode DPPH

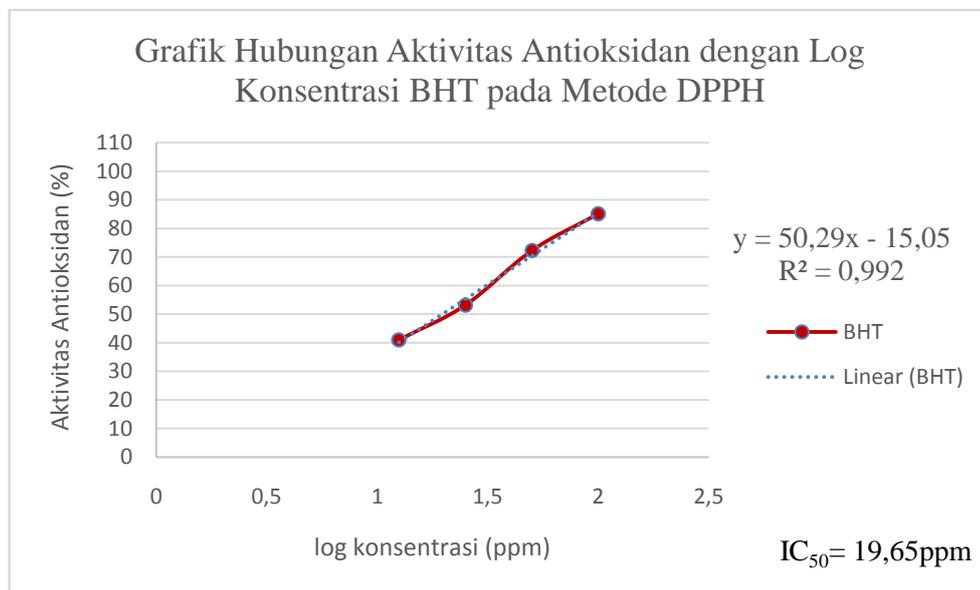
Sampel	Nilai IC_{50} (ppm)	Potensi Antioksidan (Winata, 2011)
Asam Askorbat	0,27	Sangat Aktif
BHT	19,65	Sangat Aktif
Isolat I	$96,61 \times 10^1$	Tidak Aktif
Isolat II	$12,42 \times 10^3$	Tidak Aktif

Berdasarkan data pada Tabel 7, aktivitas antioksidan larutan sampel yang berisi standar dan isolat dapat dikategorikan tingkat kekuatan antioksidannya menjadi berbagai intensitas yang digolongkan menurut masing-masing nilai IC_{50} (Winata, 2011). Asam askorbat dan BHT yang digunakan sebagai standar pada metode ini merupakan antioksidan yang sangat aktif dengan nilai IC_{50} yang kurang dari 50 ppm, sedangkan isolat I dan isolat II digolongkan tidak aktif dengan nilai diatas 500 ppm.

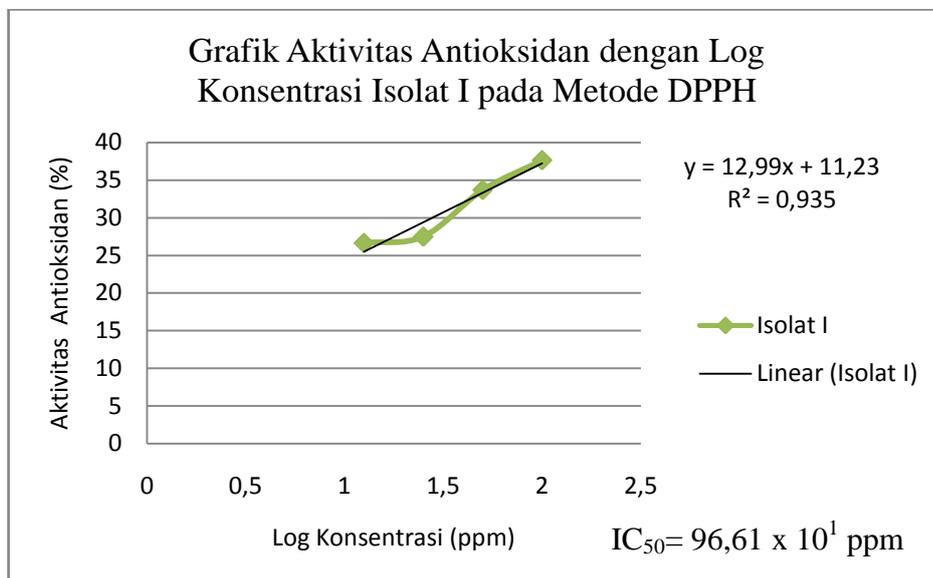
**Gambar 27.** Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi Asam Askorbat pada Metode DPPH

Berdasarkan data grafik pada Gambar 27. Asam askorbat yang digunakan sebagai standar pada log konsentrasi 1 atau konsentrasi sebesar 12,5 ppm menginhibisi DPPH sebesar 77,69%. Berdasarkan literature, DPPH memiliki IC_{50} sebesar 11,8 ppm (Kumar, 2016). Kurva baku yang didapatkan adalah $y = 20,07x$

+ 61,29 dan dengan linearitas 0,634. Hal ini kurang baik karena linearitasnya tidak mendekati satu.



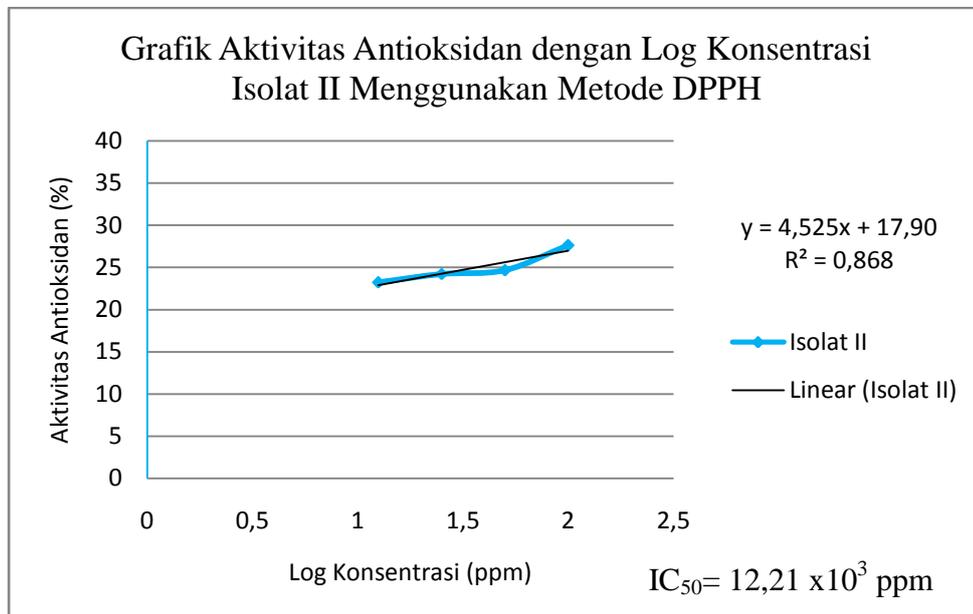
Gambar 28. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi BHT pada Metode DPPH



Gambar 29. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi Isolat I pada Metode DPPH

Berdasarkan data pada Gambar 29. Sampel pada log konsentrasi 2 atau konsentrasi sebesar 100 ppm, isolat I menghambat DPPH sebesar 37,62%. Hal ini

dikarenakan antioksidan dipengaruhi oleh konsentrasi. Konsentrasi isolat I yang digunakan untuk menghambat DPPH sebesar 50% harus melebihi 100 ppm.



Gambar 30. Grafik Aktivitas Antioksidan dengan Log Konsentrasi Isolat II pada Metode DPPH

Berdasarkan data pada Gambar 29. Sampel pada log konsentrasi 2 atau konsentrasi sebesar 100 ppm, isolat II menghambat DPPH sebesar 27,59%. Konsentrasi yang digunakan untuk menghambat DPPH melebihi konsentrasi isolat I, sehingga aktivitas antioksidan dari isolat II lebih lemah dibandingkan isolat I. Konsentrasi isolat II yang digunakan untuk menghambat DPPH sebesar 50% harus melebihi 100 ppm. Berdasarkan Tabel 8, aktivitas antioksidan standar dan isolat dapat diurutkan sebagai berikut:

Asam askorbat > BHT > Isolat I > Isolat II

Tabel 8. Tingkat Kekuatan Antioksidan dengan Metode DPPH (Winata, 2011)

Nilai IC_{50} (ppm)	Tingkat Kekuatan Antioksidan
< 50ppm	Sangat Aktif
50-100ppm	Aktif
101-250ppm	Sedang
250-500ppm	Lemah
< 500 ppm	Tidak Aktif

Kemampuan flavonoid untuk berpotensi menjadi antioksidan dipengaruhi oleh beberapa hal yang salah satunya adalah substituen yang ada didalamnya. Jumlah dan letak gugus hidroksil dalam cincin benzena (cincin A-, B-, dan C) (Gambar 1) pada struktur senyawa flavonoid menjadi hal yang penting dan mempengaruhi kekuatannya sebagai antioksidan. Gugus hidroksil pada cincin B sangat penting untuk kemampuannya dalam memtransfer hidrogen. Gugus o-dihidroksi (gugus katekol) memiliki kestabilan lebih tinggi saat menjadi struktur radikal dan berperan dalam delokalisasi elektron. Struktur senyawa flavonoid dan aktivitasnya sebagai antioksidan ditentukan oleh gugus hidroksi (-OH) pada posisi C-5 dan C-7, serta adanya ikatan rangkap pada posisi C-2 dan C-3. Adanya cincin hidroksil pada cincin A dengan posisi C-5 meningkatkan kapasitas antioksidan untuk senyawa tersebut karena letaknya yang berdampingan dengan gugus 4-okso. Hal tersebut karena delokalisasi elektron dari cincin A yang didorong oleh ikatan ganda pada C-2 dan C-3 yang dikombinasikan dengan gugus 4-okso pada cincin piran (cincin C). Adanya substituen lain mempengaruhi kemampuan aktivitas antioksidan dari flavonoid. Metilasi dari gugus hidroksil bebas menurunkan kemampuan antioksidan senyawa flavonoid. Hal ini juga bergantung pada kombinasi dari gugus hidroksil dan posisi gugus metoksi pada flavonoid (Plaza *et al.*, 2014). Semakin banyak gugus hidroksil yang terikat pada kerangka flavonoid, maka semakin tinggi pula aktivitas antiradikal bebas.

Hasil pengujian antioksidan dengan menggunakan metode DPPH pada senyawa hasil isolat menunjukkan perbedaan kemampuan yang signifikan. Hal ini sejalan dengan strukturnya, dimana isolat I yang merupakan senyawa 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavin hanya memiliki 1 gugus hidroksil yang berada pada cincin A. Sehingga kemampuannya untuk mendonorkan atom H atau elektron sangat lemah. Dibandingkan dengan senyawa 5,7,3',4'-tetrahidroksiflavone (luteolin) yang memiliki 4 gugus hidroksi dan memiliki IC_{50} sebesar 1,8 μM pada metode DPPH dapat dikategorikan aktif sebagai antioksidan (Furusawa *et al.*, 2005). Oleh karena itu, banyaknya gugus hidroksi pada senyawa flavon meningkatkan aktivitas antioksidannya.

Calkon yang juga merupakan salah satu senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan. Hal ini karena calkon memiliki ikatan rangkap yang terkonjugasi dan sistem elektron- π yang terdelokalisasi pada kedua cincin benzena sehingga besar kemungkinan untuk melakukan reaksi transfer elektron. Potensinya sebagai zat antioksidan juga dipengaruhi oleh struktur senyawa itu sendiri.

Senyawa calkon dengan pola substitusi orto- (2,3- dan 3,4-) dan para- (2,5-) pada cincin B yang terdihidroksilasi memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik (80-90% kontrol pada konsentrasi 50 μm). Struktur dengan pola substitusi meta (2,4- dan 3'-5'-) menurunkan aktivitas antioksidan secara drastis sekitar 25% kontrol pada konsentrasi 200 μm ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{m}$) (Patil *et al.*, 2009). Sehingga, pola substitusi dari dua gugus hidroksil menjadi faktor yang penting bagi senyawa ini untuk meningkatkan aktivitasnya dalam menangkap radikal bebas.

Isolat II yaitu 2'4'-dihidroksicalkon merupakan salah satu senyawa golongan calkon. Senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang bahkan lebih lemah dibandingkan isolat I. Hal ini dipengaruhi karena kedua substituenya yang berada di cincin A. Pola substituen pada cincin A tidak mempengaruhi aktivitas antioksidan senyawa calkon, sehingga tidak berkontribusi dalam aktivitas antioksidan. Isolat II memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah apabila dibandingkan senyawa 2',4',3,4-tetrahidroksicalkon atau butein. Butein memiliki 4 gugus hidroksi dimana 2 gugus hidroksi terletak pada cincin A dan 2 gugus hidroksi katekol terletak pada cincin B. IC_{50} senyawa tersebut sebesar 0,27 μM (Kozlowski *et al.*, 2007). Hal tersebut karena adanya gugus katekol (gugus hidroksi dengan struktur orto) pada cincin B dan banyaknya gugus hidroksi yang terdapat dalam senyawa tersebut.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil isolasi, penentuan struktur, dan uji aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari fraksi etil asetat batang *Muntingia calabura* L. yang berasal dari Sukabumi, Jawa Barat, maka diperoleh kesimpulan, yaitu:

1. Hasil isolasi dan analisis spektrum UV, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR diperoleh dua senyawa dengan golongan flavonoid, yaitu 5-hidroksi-3,7-dimetoksiflavon (C₁₇H₁₄O₅) (**1**) dan 2',4'-dihidroksicalkon (C₁₅H₁₂O₃) (**2**).
2. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari isolat I, dan II masing-masing adalah 96,61 x 10¹ ppm (**1**), dan 12,42 x 10³ ppm (**2**).
3. Kedua senyawa isolat memiliki aktivitas antioksidan yang rendah dan dikategorikan sebagai senyawa antioksidan yang tidak aktif.

B. Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

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. Perlu dilakukan isolasi dari bagian lain dari tumbuhan *Muntingia calabura* seperti akar dan kulit batang serta dilakukan uji bioaktivitas yang beragam.
4. Perlu dilakukannya karakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui lebih pasti jenis senyawa hasil isolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A. 1986. *Buku Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Penerbit Karu.
- Bohm, V., Schlesier, K. 2004. *Methods to Evaluate the Antioxidant Activity*. In Dris, R., Jain, S.M, (Ed). *Production Practices and Quality Assesment of Food Crops*. 3rd Volume. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Chen, J. J., Lin, R. W., Duh, C. Y., Huang, H. Y., Chen, I. S. 2004. Flavones and Cytotoxic Constituents from the Stem Bark of *Muntingia Calabura*. *Journal of Chinese Chemical Society*, 51(3), 665–670.
- Chen, J. J., Lee, H. H., Duh, C. Y, Chen I. S. 2005. Cytotoxic Chalcones and Flavonoids from the Leaves of *Muntingia calabura*. *Planta Medica*, 71(10), 970–973.
- Fessenden, R. J., Fessenden J. S. 1986. *Organic Chemistry 3rd Edition*. Massachuset: Wadsworth Inc.
- Furusawa, M., Tanaka, T., Ito, T., Nishikawa, A., Yamazaki, N., Nakaya, K., Matsuura, N., Tsuchiya, H., Nagayama, M., Iinuma, M. 2007. Antioxidant Activity of Hydroxyflavonoids. *Journal of Health Science*, 51(3), 376-378.
- Hanani, E., Mun'im, A., Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia sp* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3), 127–133.
- 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*. 2 (3), 77-102.
- Kaneda, N., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N. R. 1991. Plant Anticancer Agents, XLVII. New Cytotoxic Flavonoids from *Muntingia calabura* Roots. *Journal of Natural Products*, 54(1), 196–206.

- Kedare, S. B., Singh, R. P. 2011. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal Food and Science Technology*, 48(4), 412-422.
- Kozłowski, D., Trouillas, P., Calliste, C., Marsal, P., Lazzaroni, R., Duroux, J. 2007. Density Functional Theory Study of the Conformational, Electronic, and Antioxidant Properties of Natural Chalcones. *Journal of Physical Chemistry*, 111(6), 1138-1145.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar, S. 2016. *Analytical Techniques for Natural Product Research*. Boston: CABI.
- Kumar, S., Pandey, A. K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 4(2), 32-48.
- Kuo, W. L., Liao, H. R., Chen, J. J. 2014. Biflavans, Flavonoids, and Dihydrochalcone from the Stem Wood of *Muntingia calabura* and Their Inhibitory Activities on Neutrophil Pro-Inflammatory Responses. *Molecules*, 19(12), 20521-20535.
- Mahmood, N. D., Nasir, N. L. M., Rofiee, M. S., Tohid, S. F. M., Ching, S. M., Teh, L. K., Salleh, M. Z., Zakaria, Z. A. 2014. *Muntingia calabura*: A Review of its Traditional Uses, Chemical Properties, and Pharmacological Observations. *Pharmaceutical Biology*, 52(12), 1598-1623.
- Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Neldawati, Ratnawulan, Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillar of Physics*, 2(1), 76-83.
- Nshimo, C. M., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N. R. 1993. Cytotoxic Constituents of *Muntingia calabura* Leaves and Stems Collected

in Thailand. *International Journal of Pharmacognosy*, 31(1), 77–81.

Patil, C. B., Mahajan, S. K., Katti, S. A. 2009. Chalcone: A Versatile Molecule. *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 1(3): 11–22.

Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Ara, K. Z. G., Turner, C., Karlsson, E. N. 2014. Substituent Effects on in Vitro Antioxidizing Properties, Stability, and Solubility in Flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62(15), 3321–3333.

Pramono, V. J., Santoso, R. 2014. Pengaruh Ekstrak Buah Kersen (*Muntingia calabura*) Terhadap Kadar Gula Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotocin (STZ). *Jurnal Sain Veteriner*, 32(2), 218–223.

Preethi, K., Premasudha, P., Keerthana, K. 2012. Anti-Inflammatory Activity of *Muntingia calabura* Fruits. *Pharmacognosy Journal*, 4(30), 51–56.

Preethi, K., Vijayalakshmi, N., Shamna, R., Sasikumar, J. M. 2010. In Vitro Antioxidant Activity of Extracts from Fruits of *Muntingia calabura* Linn. from India. *Pharmacognosy Journal*, 2(14), 11–18.

Saifudin, Azis. 2002. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish

Sayuti, K., Yenrina, R. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.

Septianto, M.B. 2017. *Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -Glukosidase Ekstrak Metanol, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-Heksana Daun dan Kulit Batang Kersen (*Muntingia calabura* L.) Asal Sukabumi, Jawa Barat*. Skripsi. Jakarta: Universitas Negeri Jakarta.

Sibi, G., Naveen, R., Dhananjaya, K., Ravikumar, K. R., Mallesha, H. 2012. Potential Use of *Muntingia calabura* L. Extracts Against Human and Plant Pathogens. *Pharmacognosy Journal*, 4(34), 44–47.

- Su, B. N., Park, E. J., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. 2003. Activity-Guided Isolation of the Chemical Constituents of *Muntingia calabura* Using a Quinone Reductase Induction Assay. *Phytochemistry*, 63(3), 335–341.
- Sufian, A. S., Ramasamy, K., Ahmat, N., Zakaria, Z. A., Yusof, M. I. M. 2013. Isolation and Identification of Antibacterial and Cytotoxic Compounds from the Leaves of *Muntingia calabura* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 198–204.
- Surjowardojo, P., Sarwiyono, Thohari, I., Ridhowi, A. 2014. Quantitative and Qualitative Phytochemicals Analysis of *Muntingia calabura*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(16), 84–89.
- Targett, N. M., Kilcoyne, J. P., Green, B. 1979. Vacuum Liquid Chromatography: An Alternative to Common Chromatographic Methods. *Journal of Organic Chemistry*, 44(26), 4962–4964.
- USDA. 2016. *Natural Resources Conservation Service*. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=MUCA4> diakses tanggal 30 Juli 2017, pukul 21.22 WIB.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi, dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Winata, H. 2011. *Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Kimiawi Ekstrak Daun Wungu (Graptophyllum pictum L.Griff)*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Yusof, M. I. M., Salleh, M. Z., Teh, L. K., Ahmat, N., Azmin, N. F. N., Zakaria, Z. A. 2013. Activity-Guided Isolation of Bioactive Constituents with Antinociceptive Activity from *Muntingia calabura* L. Leaves Using the Formalin Test. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013(1), 1–27.
- Zakaria, Z. A., Hazalin, N. A. M. N., Zaid, S. N. H. M., Ghani, M. A., Hassan, M. H., Gopalan, H. K., Sulaiman, M. R. 2007. Antinociceptive, Anti-Inflammatory and Antipyretic Effects of *Muntingia calabura* Aqueous

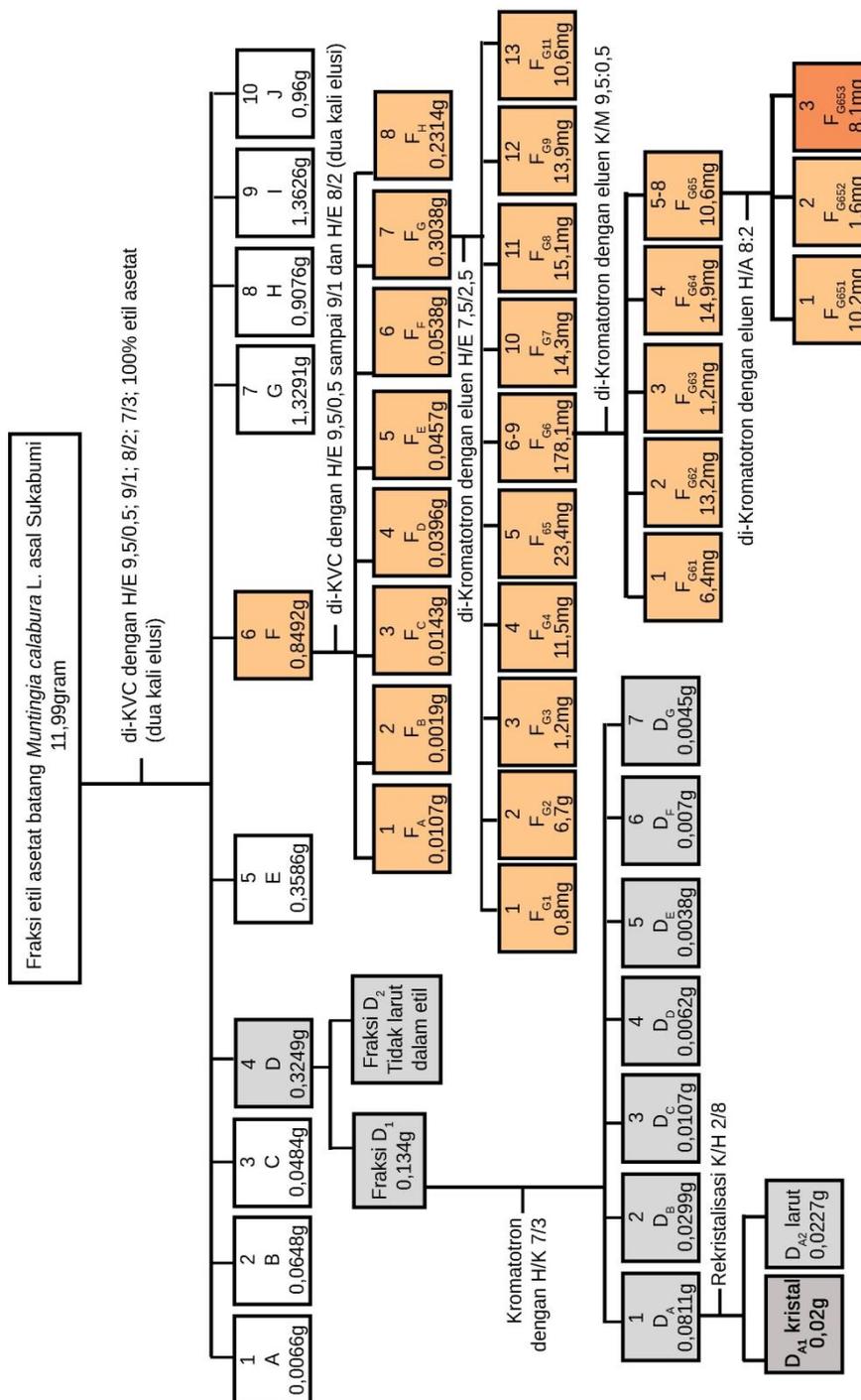
Extract in Animal Models. *Journal of Natural Medicine*, 61(4), 443–448.

Zakaria, Z. A., Mohamed, A. M., Jamis, N. S. M., Rofiee, M. S., Hussain, M. K., Sulaiman, M. R., Teh, L. K., Salleh, M. Z. 2011. In Vitro Antiproliferative and Antioxidant Activities of the Extracts of *Muntingia calabura* Leaves. *The American Journal of Chinese Medicine*, 39(1), 183–200.

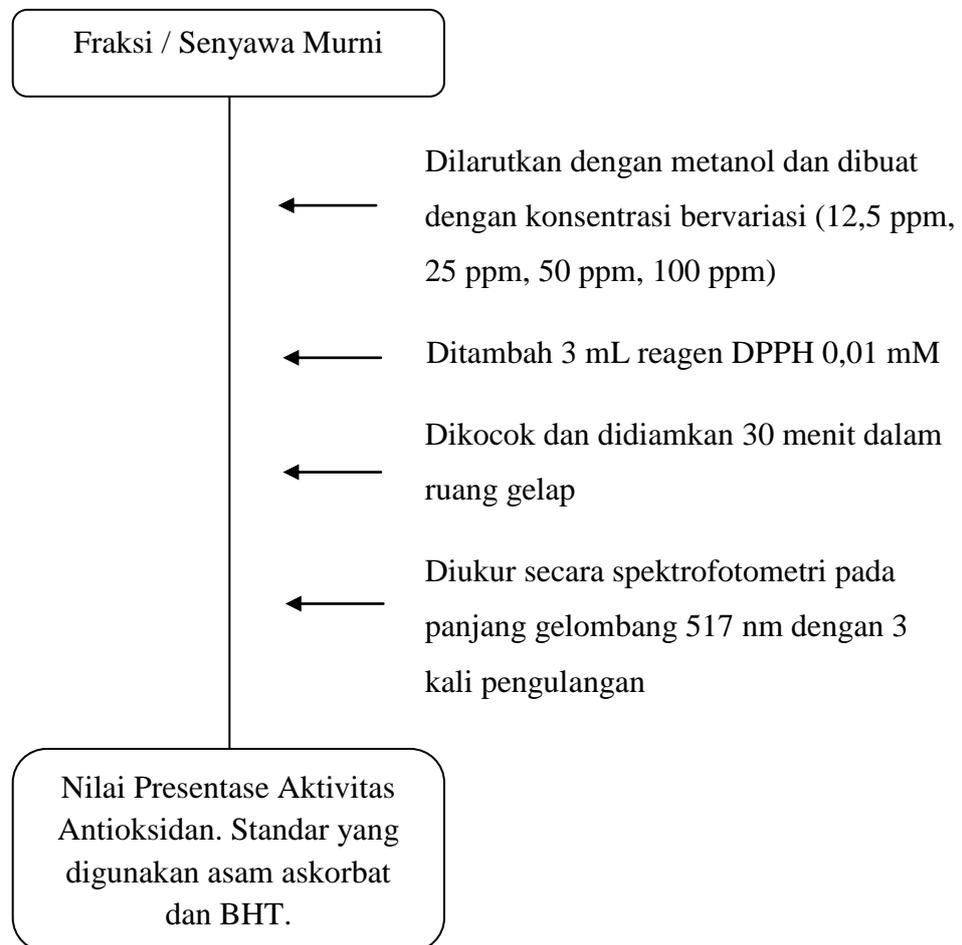
Zhang, J., Fu, X. L., Yang, N., Wang, Q. A. 2013. Synthesis and Cytotoxicity of Chalcones and 5-Deoxyflavonoids. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 1–6.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Pemisahan dan Pemurnian Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* L.



Lampiran 2. Bagan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Batang *Muntingia calabura* L. dengan Metode DPPH



Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Larutan

1. Pembuatan larutan induk senyawa Isolat (200 ppm)

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

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

$$200 \text{ ppm} = \frac{1,2 \text{ mg}}{0,0008 \frac{\text{Kg}}{\text{L}} \times \text{Volume (L)}}$$

$$\text{Volume} = 0,0075 \text{ L} = 7,5 \text{ mL}$$

= 1,2 mg senyawa isolat dilarutkan dalam 7,5 mL metanol.

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

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

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

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

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

= 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

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

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

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

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

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

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

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

7. Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

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

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

$$\text{Massa DPPH} = 1,9715 \text{ mg}$$

Lampiran 4. Perhitungan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

a. Asam Askorbat

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 77,69$$

- Konsentrasi 25 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,022}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 96,71 \%$$

- Konsentrasi 50 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,016}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 97,55 \%$$

- Konsentrasi 100 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,016}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 97,55 \%$$

b. BHT

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,395}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 40,92 \%$$

- Konsentrasi 25 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,313}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 53,14 \%$$

- Konsentrasi 50 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,186}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 72,21 \%$$

- Konsentrasi 100 ppm

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

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 85,03 \%$$

c. Isolat D₇₉₁

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,490}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 26,65 \%$$

- Konsentrasi 25 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,484}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 27,50 \%$$

- Konsentrasi 50 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,443}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 33,68 \%$$

- Konsentrasi 100 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,417}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 37,62 \%$$

d. Isolat F_{G653}

- Konsentrasi 12,5 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,513}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 23,20 \%$$

- Konsentrasi 25 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,506}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 24,20 \%$$

- Konsentrasi 50 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,503}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 24,65 \%$$

- Konsentrasi 100 ppm

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

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{0,668 - 0,484}{0,668} \times 100\%$$

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = 27,59 \%$$

Lampiran 5. Perhitungan Nilai IC₅₀ pada Metode DPPH

1. Asam Askorbat

$$\text{Persamaan regresi linear pada grafik : } y = 20,07x + 61,29$$

$$50 = 20,07x + 61,29$$

$$\log x = -0,562$$

$$x = 0,27 \text{ ppm}$$

2. BHT

$$\text{Persamaan regresi linear pada grafik : } y = 50,29x - 15,05$$

$$50 = 50,29x - 15,05$$

$$\log x = 1,293$$

$$x = 19,65 \text{ ppm}$$

3. Isolat D_{A12}

$$\text{Persamaan regresi linear pada grafik : } y = 12,99x + 11,23$$

$$50 = 12,99x + 11,23$$

$$\log x = 2,985$$

$$x = 96,61 \times 10^1 \text{ ppm}$$

4. Isolat F_{G653}

$$\text{Persamaan regresi linear pada grafik : } y = 4,525x + 17,90$$

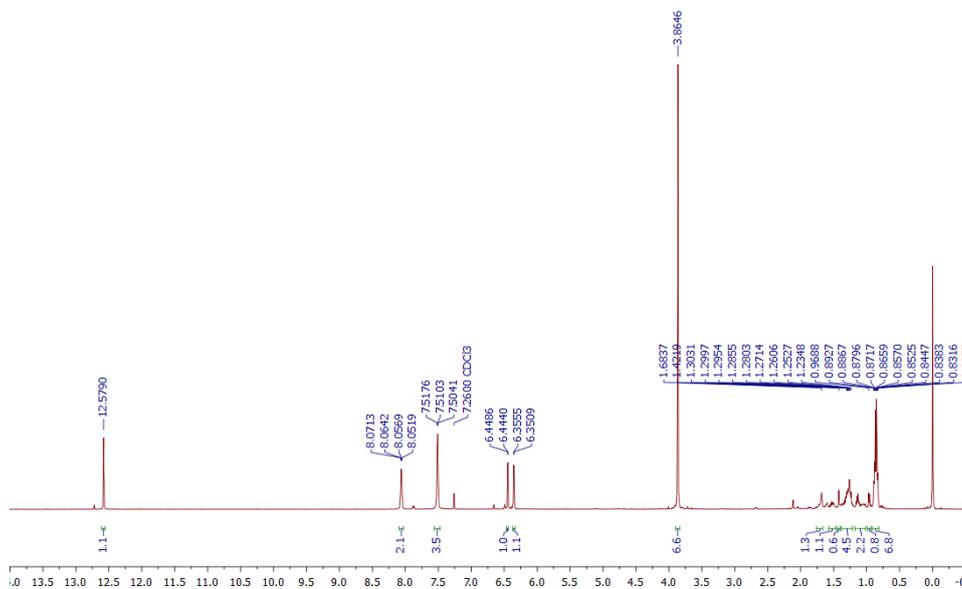
$$50 = 4,525x + 17,90$$

$$\log x = 7,094$$

$$x = 12,42 \times 10^3 \text{ ppm}$$

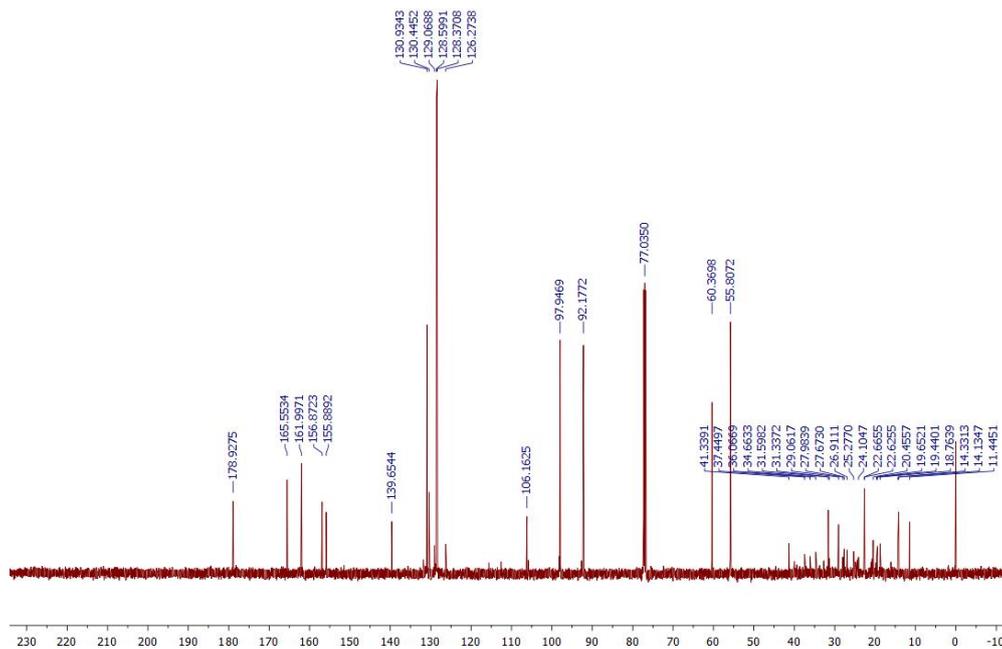
Lampiran 6. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Isolat I

Fera-MunCal_1H

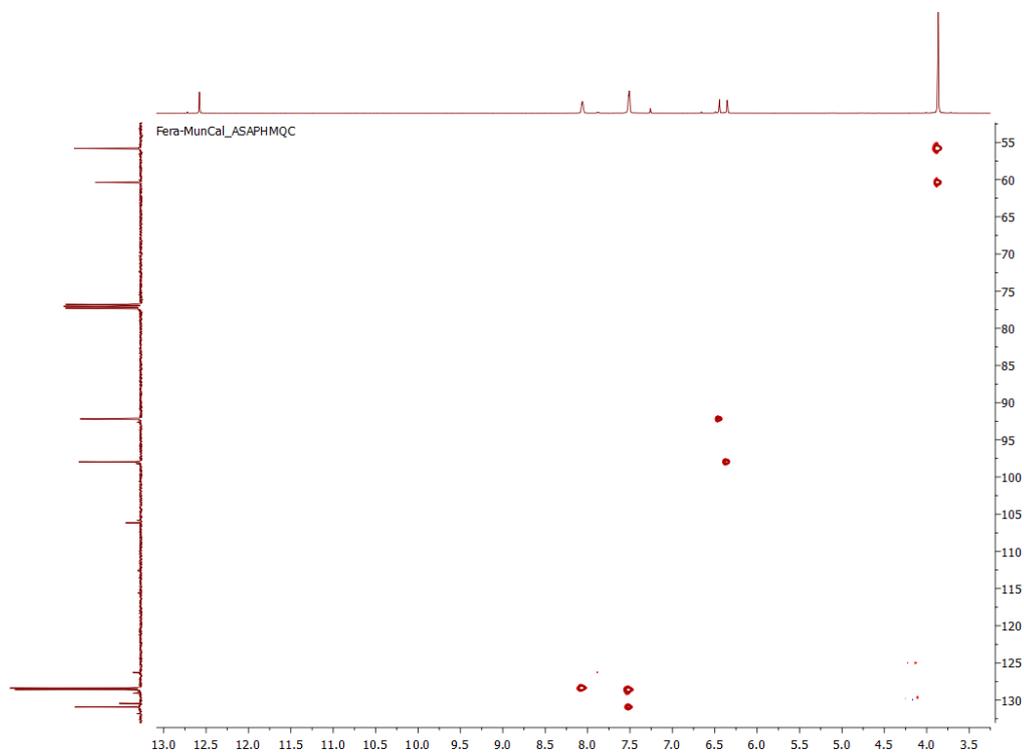


Lampiran 7. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Isolat I

Fera-MunCal_13C

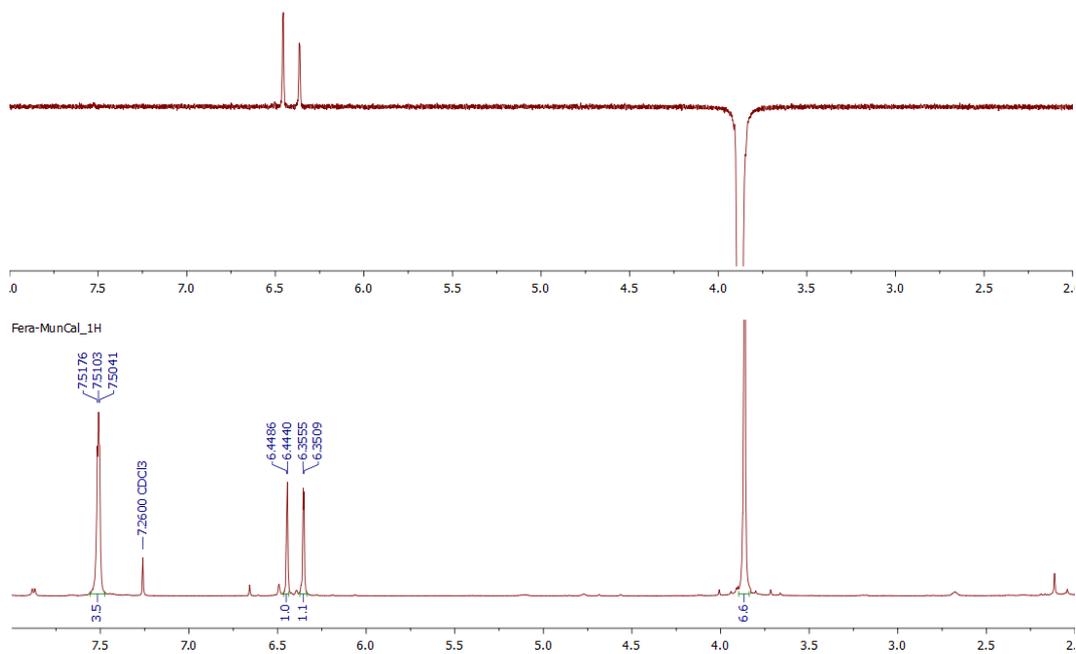


Lampiran 8. HMQC Senyawa Isolat I

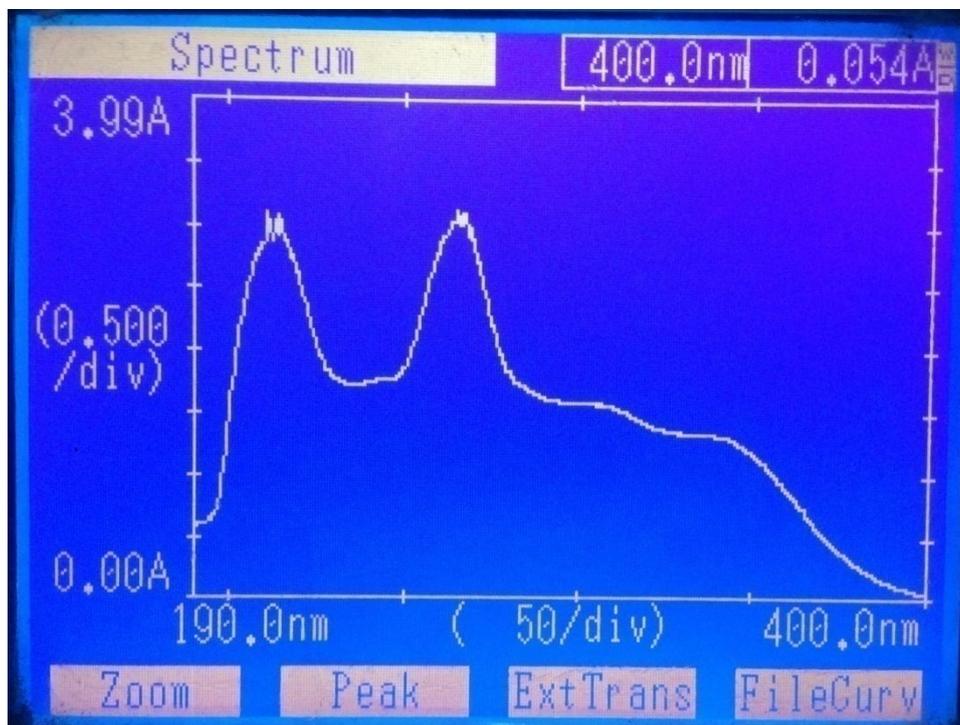


Lampiran 9. NOE Senyawa Isolat I

Fera-MunCaL_NOE1D1

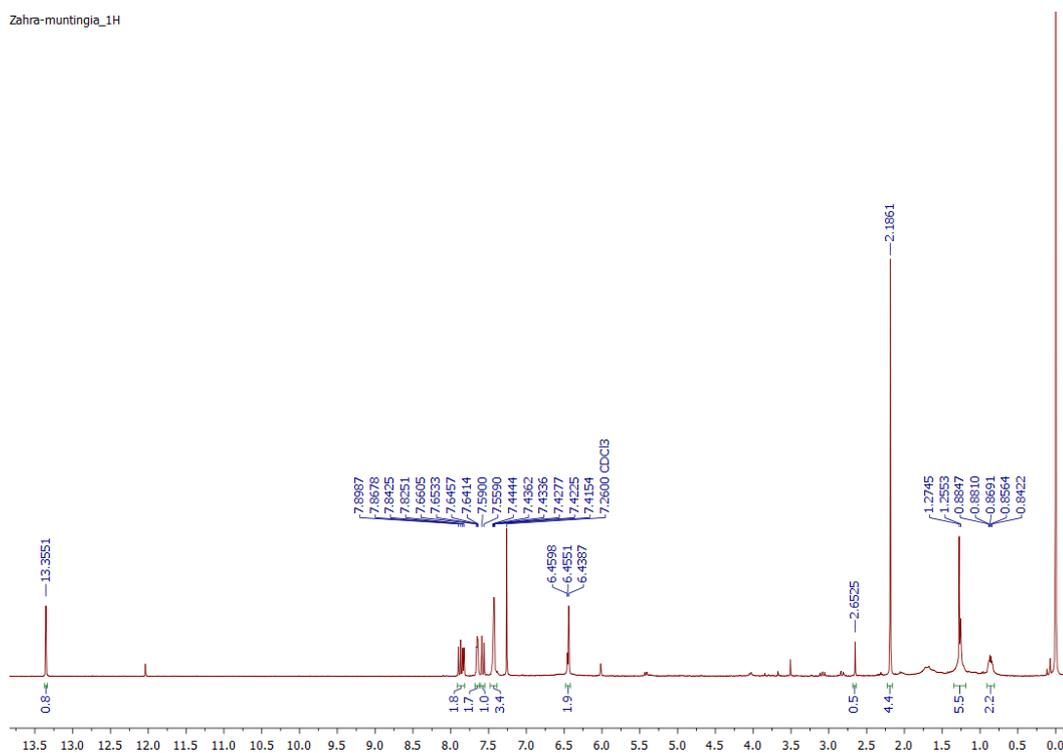


Lampiran 10. Spektra UV-vis Senyawa Isolat I



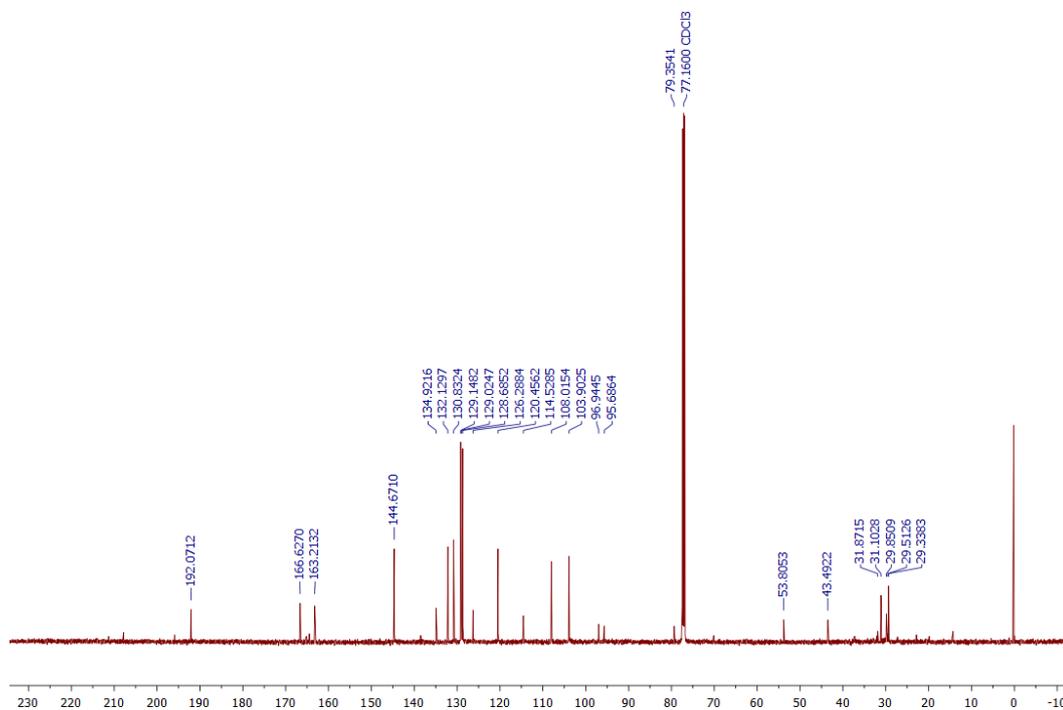
Lampiran 11. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Isolat II

Zahra-muntingia_1H

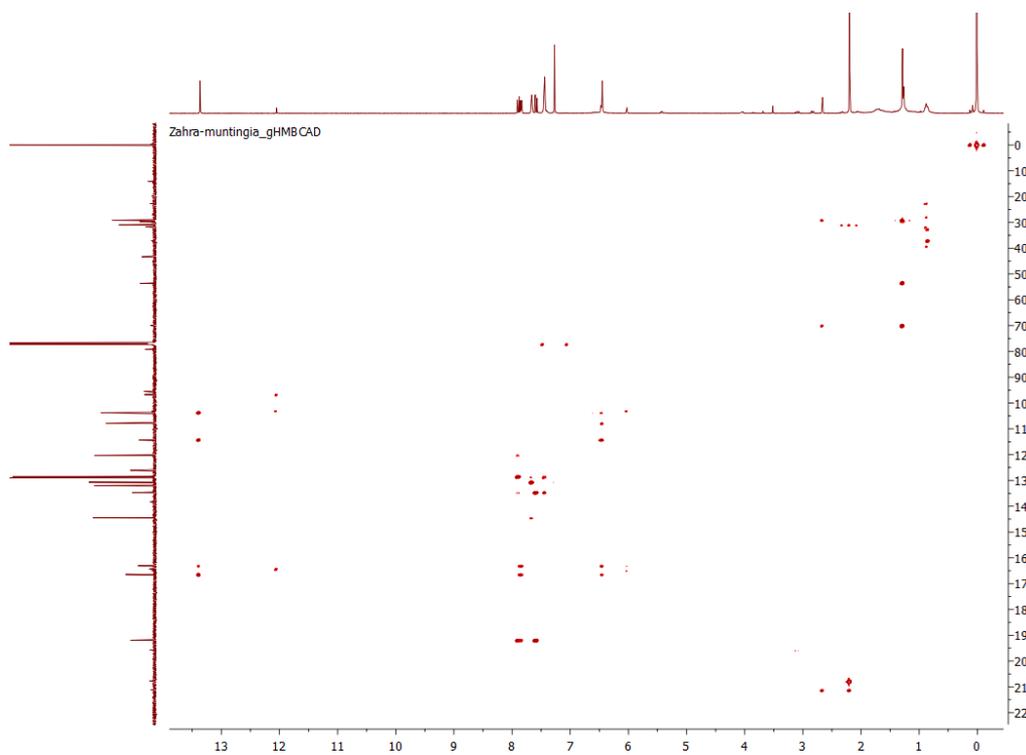


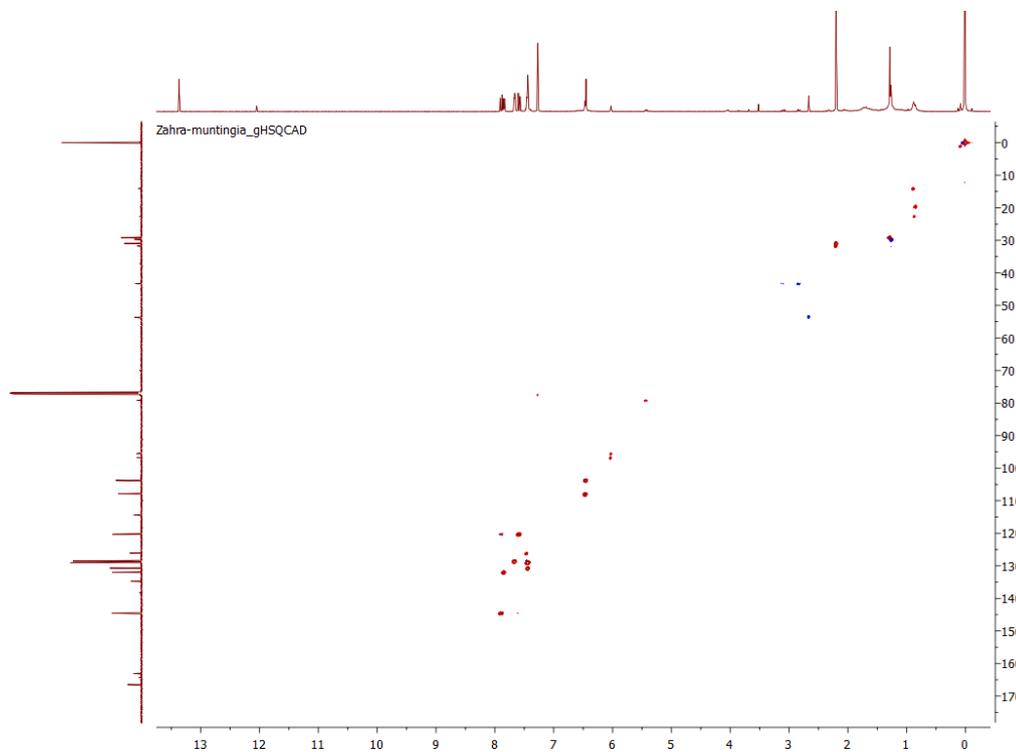
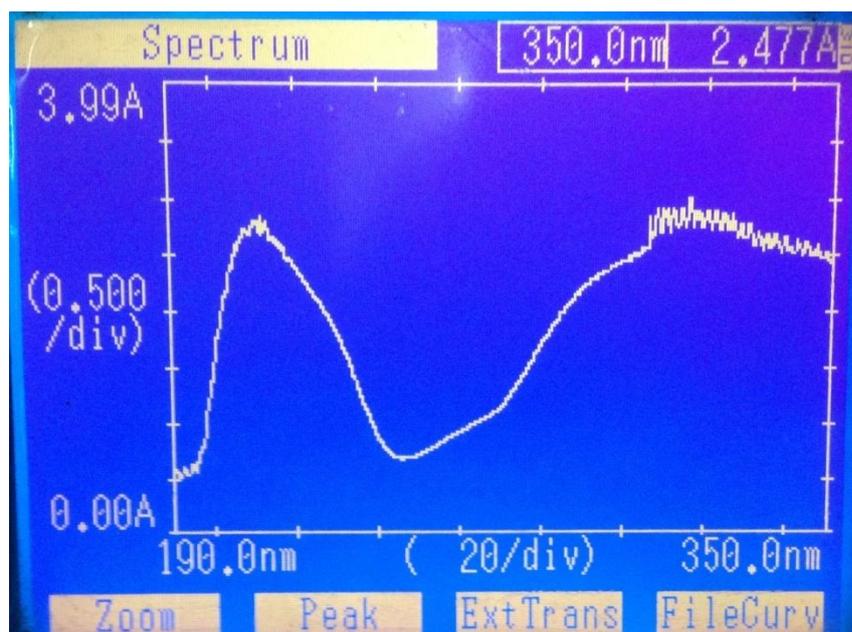
Lampiran 12. Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa Isolat II

Zahra-muntingia_13C



Lampiran 13. HMBC Senyawa Isolat II



Lampiran 14. HSQC Senyawa Isolat II**Lampiran 15. Spektra UV-vis Senyawa Isolat II**

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



ZAHRAH NADIA PUTRI. Dilahirkan di Jakarta pada tanggal 15 Januari 1996. Anak pertama dari dua bersaudara, dari pasangan Bapak R. Sri Cahyono dan Ibu Hairani. Bertempat tinggal di Jalan Sumber Pelita No. 4, Sumur Batu, Kemayoran, Jakarta Pusat. Pendidikan formal yang pernah ditempuh telah menyelesaikan Taman kanak-kanak pada tahun 2001 di TK Irsyadiyah. Sekolah di SD Sumur Batu 01 Pagi dan lulus pada tahun 2007, kemudian melanjutkan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 10 Jakarta dan lulus pada tahun 2010. Tahun 2013 lulus dari Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 5 Jakarta, kemudian melanjutkan pendidikan di Perguruan Tinggi Universitas Negeri Jakarta, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Studi Kimia.

Pengalaman Kunjungan Kerja Lapangan dan Kunjungan Industri yang pernah diikuti adalah ke PT. Krakatau Steel Indonesia, PT. Indonesia Power, PT. Nippon Corpindo, PT. Coca-cola Amatil Indonesia, PT. Semen Indonesia Tuban.

Selama kuliah pernah menjadi Penanggung Jawab mata kuliah Sintesis Kimia Organik, Kimia Bahan Alam, dan Praktikum Kimia Anorganik II serta menjadi Asisten Dosen untuk mata kuliah Praktikum Identifikasi Senyawa Organik dan Struktur dan Fungsi Biomolekul.