



**UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN**

TESIS

**KARAKTERISASI DAN UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN
CANTIGI (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.)
TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210**

OLEH

**ANA YULYANA
NPM: 5413221046**

**Disusun Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada
Universitas Pancasila**

**JAKARTA
2016**

PERNYATAAN TESIS DAN SUMBER INFORMASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini menyatakan bahwa tesis dengan judul “Karakterisasi dan Uji Sitotoksik Ekstrak Daun Cantigi (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.) Terhadap Sel Leukemia L1210” adalah karya saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik, baik di Universitas Pancasila maupun di Perguruan Tinggi lain. Informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah dicantumkan dalam daftar rujukan yang dituliskan dalam tesis ini.

Jakarta, Februari 2016

Ana Yulyana
NPM: 5413221046



UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PERSETUJUAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

NAMA : ANA YULYANA
NPM : 5413221046
JUDUL TESIS : KARAKTERISASI DAN UJI SITOTOKSIK
EKSTRAK DAUN CANTIGI (*Vaccinium
varingiaefolium* Miq.) TERHADAP SEL
LEUKEMIA L1210

DISETUJUI OLEH

Pembimbing



(Dr. Hendig Winarno, M.Sc)

Pembimbing



(Drs. Kosasih, M.Sc., Apt.)

UNIVERSITAS PANCASILA
PROGRAM MAGISTER ILMU KEFARMASIAN

PENGESAHAN TESIS
MAGISTER FARMASI
PEMINATAN: OBAT BAHAN ALAM

KARAKTERISASI DAN UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN CANTIGI
(*Vaccinium varingiaefolium* Miq.) TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210

Oleh

ANA YULYANA
NPM: 5413221046

Dipertahankan dihadapan Penguji Tesis
Program Magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila
Pada Tanggal 20 Februari 2016

Mengesahkan,
Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian



Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt.

Penguji Tesis:



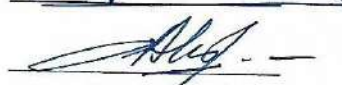
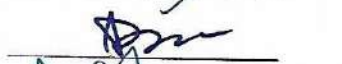

1. Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt.

2. Prof (ris). Dr. Partomuan Simanjuntak, M.Sc

3. Dr.rer.nat. Ahmad Saufi

4. Dr. Hendig Winarno, M.Sc

5. Drs. Kosasih, M.Sc., Apt.

1. 
2. 
3. 
4. 
6. 

KATA PENGANTAR

Puji serta syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, tesis dengan judul **KARAKTERISTIK DAN UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN CANTIGI (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.) TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210** dapat diselesaikan dengan baik. Tesis ini disusun dan diajukan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.

Terselesaikannya tesis ini tentunya tak lepas dari dorongan dan uluran tangan berbagai pihak. Oleh karena itu, ucapan terima kasih saya sampaikan kepada **DR. Hendig Winarno, M.Sc.** dan **Drs. Kosasih, M.Sc., Apt.**, selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam membimbing dan memberi pengarahan hingga tesis ini dapat dislesaikan dengan baik. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Shirly Kumala, M.Biomed., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
2. Dr. Ratna Djamil, M.Si., Apt., selaku Ketua Program Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
3. Dr. Ir. Sylvana Ratina, M.Si., selaku Kepala Balai Besar Konservasi Sumber Daya Alam (BBKSDA) Jawa Barat yang telah memberikan izin memasuki Kawasan Hutan Taman Wisata Alam Gunung Takuban Parahu dan pengambilan sampel tumbuhan.
4. Bapak Rudi Heryanto, M.Si., selaku Manajer Teknis yang telah memberikan izin penelitian di Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Institut Pertanian Bogor.
5. Dra. Ermin Katrin dan seluruh staf Laboratorium Kimia Bahan Kesehatan Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) BATAN Pasar Jumat, Jakarta Selatan, yang telah memberikan bantuan selama penelitian.
6. Seluruh dosen, staf dan karyawan Program Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.

7. Orangtua tercinta, kakak dan adik yang senantiasa memberikan doa, perhatian dan motivasi.
8. Dwiana Fresilla, S.Gz. dan Syachrial Lubis yang selalu memberikan segala bentuk dukungan dan doa.
9. Sahabat, rekan seperjuangan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebut satu persatu terima kasih atas dukungan, doa dan kerjasamanya selama penulis menempuh pendidikan.

Akhir kata dengan kerendahan hati, saya berharap semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan

Jakarta, Februari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN TESIS DAN SUMBER INFORMASI	ii
HALAMAN PERSETUJUAN TESIS	iii
HALAMAN PENGESAHAN TESIS	iv
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
ABSTRAK.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG.....	1
B. PERUMUSAN MASALAH.....	3
C. PERTANYAAN PENELITIAN.....	3
D. TUJUAN PENELITIAN	3
1. TujuanUmum	3
2. TujuanKhusus	4
E. RUANG LINGKUP PENELITIAN	4
F. MANFAAT PENELITIAN	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. TINJAUAN BOTANI.....	5
1. Klasifikasi Tanaman....	5
2. Nama Umum	6
3. Nama Daerah.....	6
4. Deskripsi Tanaman.....	6
5. Ekologi Penyebaran	6
7. Kandungan Kimia dan Manfaat	7
B. PENAPISAN FITOKIMIA	8
1. Alkaloid.....	9
2. Flavonoid	9
3. Terpenoid	10
4. Tanin	10
5. Saponin.....	11
6. Glikosida	11
7. Kuinon.....	12

8. Minyak Atsiri	12
13. Kumarin	13
C. SIMPLISIA	13
D. KARAKTERISASI SIMPLISIA.....	14
E. EKSTRAKSI	15
F. EKSTRAK	17
G. PARAMETER-PARAMETER STANDAR EKSTRAK.....	17
1. Parameter Spesifik Ekstrak	17
2. Parameter Non Spesifik Ekstrak	19
H. METODE PEMISAHAN DAN PEMURNIAN	20
1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	20
2. Kromatografi Kolom “Flash”	21
3. Kromatografi Kolom..... I	22
4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	22
I. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN.....	24
J. UJI SITOTOKSIK TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210	26
K. LANDASAN TEORI	27
L. HIPOTESIS	27
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	28
A. METODE YANG DIGUNAKAN	28
B. KERANGKA KONSEP	28
C. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL	29
D. JENIS PENELITIAN YANG DIGUNAKAN	29
E. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN.....	29
F. OBYEK PENELITIAN	29
BAB IV BAHAN , ALAT DAN PROSEDUR PENELITIAN	30
A. BAHAN DAN ALAT YANG DIGUNAKAN	30
1. Bahan	30
2. Alat.....	30
B. PROSEDUR PENELITIAN.....	31
1. Determinasi Tumbuhan.....	31
2. Pengumpulan dan Penyediaan Bahan Penelitian	31
3. Uji Makroskopis Simplisia.....	31
4. Susut Pengeringan.....	31
5. Kadar Air.....	32
6. Kadar Abu	32
7. Kadar Senyawa terlarut dalam Pelarut Tertentu	33
8. Uji Mikrobiologis.....	34
9. Cemaran Logam Berat	35

10. Pembuatan Ekstrak.....	36
11. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak.....	37
12. PenapisanFitokimia.....	39
13. Uji Sitotoksik Ekstrak Terhadap Sel Leukemia L1210.....	42
14. Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif.....	44
15. Fraksinasi Ekstrak Paling Aktif Menggunakan Kromatografi Kolom.....	44
16. Analisis Kromatografi Lapis Tipis Fraksi-fraksi.....	45
17. Uji Analisis Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210.....	45
18. Analisis dengan KLT-Densitometri.....	46
C. CARA PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA.....	46
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	47
A. DETERMINASI TANAMAN.....	47
B. PENGUMPULAN BAHAN.....	47
C. KARAKTERISASI SIMPLISIA.....	47
1. Uji Makroskopik.....	47
2. Uji Mikroskopik.....	48
3. Pengujian Parameter Spesifik.....	48
4. Pengujian Parameter Non Spesifik.....	49
D. PEMBUATAN EKSTRAK.....	50
E. KARAKTERISASI EKSTRAK ETIL ASETAT.....	51
1. Pengujian Parameter Spesifik.....	51
2. Pengujian Parameter Non Spesifik.....	51
F. PENAFISAN FITOKIMIA.....	52
G. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN TERHADAP EKSTRAK.....	52
H. UJI SITOTOKSIK EKTRAK DAUN CANTIGI TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210.....	54
I. FRAKSINASI EKSTRAK ETIL ASETAT.....	54
J. ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DENSITOMETRI FRAKSI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI.....	57
K. UJI SITOTOKSIK FRAKSI-FRAKSI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210.....	58
L. ANALISIS KOMPONEN SENYAWA KIMIA FRAKSI 2 EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI DENGAN KROMATOGRAFI GAS SPEKTROMETER MASSA (GCMS).....	59
M. IDENTIFIKASI SENYAWA PADA FRAKSI 2 EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI DENGAN SPEKTRUM FTIR.....	60

BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	62
1. SIMPULAN	62
2. SARAN	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Tanaman Cantigi (<i>Vaccinium varingiaefolium</i> Miq.)	5
Gambar V.1	Morfologi Daun Cantigi.....	48
Gambar V.2	Mikroskopik Simplisia Daun Cantigi	48
Gambar V.3	Simplisia Daun Cantigi.....	49
Gambar V.4	Kromatografi Hasil Fraksinasi	55
Gambar V.5	Kromatografi Lapis Tipis Fraksi 1-4.....	56
Gambar V.6	Profil KLT-Desitometri Fraksi 1-4 Ekstrak Etil Asetat.....	57
Gambar V.7	Profil Kromatogram Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat.....	60
Gambar V.8	Spektrum FTIR Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat	60

DAFTAR TABEL

Tabel V.1	Morfologi Daun Cantigi.....	47
Tabel V.2	Hasil Pengujian Parameter Spesifik Simplisia Daun Cantigi	49
Tabel V.3	Hasil Pengujian Parameter Non Spesifik Simplisia Daun Cantigi.....	49
Tabel V.4	Hasil Ekstraksi <i>n</i> -Heksan, Etil Asetat dan Etanol 95% Simplisia Daun Cantigi	51
Tabel V.5	Hasil Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak etil Asetat	51
Tabel V.6	Hasil Pengujian Parameter Non Spesifik Ekstrak Etil Asetat.....	51
Tabel V.7	Hasil Penapisan Kimia	52
Tabel V.8	Hasil Uji Antioksidan Ekstrak <i>n</i> -Heksan, Etil Asetat dan Etanol 95% Daun Cantigi Menggunakan Metode DPPH.....	53
Tabel V.9	Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak <i>n</i> -Heksan, Etil Asetat dan Etanol 95% Daun Cantigi Terhadap Sel Leukemia L1210.....	54
Tabel V.10	Bobot Masing-masing Fraksi Ekstrak Etil Asetat hasil Kromatografi Kolom.....	56
Tabel V.11	Hasil Uji Sitotoksik Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Cantigi Terhadap Sel Leukemia L1210	58
Tabel V.12	Hasil Analisis Komponen Senyawa Kimia Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat Daun Cantigi dengan GCMS	59
Tabel V.13	Spektrum FTIR Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat	61

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI).....	70
Lampiran 2	Hasil Determinasi	70
Lampiran 3	Skema Kerja	71
Lampiran 4	Perhitungan Rendemen Hasil Ekstraksi <i>n</i> -Heksan, Etil Asetat dan Etanol 95% Daun Cantigi (<i>V.varingiaefolium</i> Miq)	73
Lampiran 5	Hasil Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	75
Lampiran 6	Tabel Probit.....	76
Lampiran 7	Skema Kerja Uji Sitotoksik Terhadap Sel L1210 Ekstrak <i>n</i> - Heksan, Etil Asetat dan Etanol 95%	77
Lampiran 8	Perhitungan IC ₅₀ Uji Sitotoksik Terhadap Sel L1210 Ekstrak	78
Lampiran 9	Hasil Uji Sitotoksik Terhadap Sel L1210 Ekstrak	80
Lampiran 10	Skema Kerja Uji Sitotoksik Terhadap Sel L1210 Fraksi Ekstrak Etil Asetat.....	84
Lampiran 11	Hasil Uji Sitotoksik Terhadap Sel L1210 Ekstrak Etil Asetat	85
Lampiran 12	Foto Hasil Ekstraksi Daun Cantigi.....	86
Lampiran 13	Foto Hasil Pengujian Mikroba	87
Lampiran 14	Foto Alat yang Digunakan	88

**CHARACTERIZATION AND CYTOTOXIC TEST OF
CANTIGI EXTRACT (*Vacciniumvaringiaefolium* Miq.)
AGAINST LEUKEMIA L1210 CELL LINES**

ABSTRACT

Cantigi (*Vacciniumvaringiaefolium* Miq.) is a part of Indonesia's biodiversity growing abundant close to volcanoes in Indonesia. The purpose of this research was to characterize Cantigi leaves by step by step extraction using n-hexane, ethyl acetate, and 95% ethanol; phytochemical screening of extracts; activity tests of extracts as antioxidant and cytotoxic; extract fractionation using a column chromatography; activity tests of extract fractions as antioxidant and cytotoxic; profiling FTIR and gas chromatography and mass spectrophotometry (GCMS). Extraction using n-hexane, ethyl acetate, 95% ethanol resulted in extract recoveries of 1,49; 2,51; and 7,87%, respectively. Positive results of phytochemical screening were for flavonoid, steroid, tannin, and triterpenoid. Antioxidant activities (IC₅₀) of extracts were 1726,35; 56,75; and 15,62 ppm, respectively, and cytotoxic activities against leukemia L1210 cell lines (IC₅₀) 12,67; 8,29; and 10,42 µg/mL, respectively. Fractionation of the most active ethyl acetate extract using a column chromatography with the stationary phase of silica gel 60 and the eluents of chloroform:methanol of 10:1, 8:1, and 4:1 resulted in 4 fractions (F1- F4), with cytotoxic activities against leukemia L1210 cell lines (IC₅₀) were 3,62; 1,69; 2,98; and 2,96 µg/mL. Characterization of the fraction F2 predicted from FTIR and GCMS chromatograms showed 15 peaks of chemical compounds with the biggest components (retention time, quality (%), content (%)) were 9,12-octadecadienoic acid (32,89 minutes; 98%; 42,88%); phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl) (21,487 minutes; 96%; 10,75%); hexadecanoic acid (31,83 minutes; 98%; 8,79%). Based on the results can be concluded that the cytotoxic activity of ethyl acetate extract was higher than that of n-hexane and 95% ethanol extract, and the cytotoxic activity of the fraction F2 of ethyl acetate extract containing 15 compounds was higher than that of unfractionated ethyl acetate.

Key words: Characterization, *Vaccinium varingiaefolium*, Cytotoxic, Leukemia L1210 cell lines

**KARAKTERISASI DAN UJI SITOTOKSIK EKSTRAK
DAUN CANTIGI (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.)
TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210**

ABSTRAK

Cantigi (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.) merupakan salah satu kekayaan keanekaragaman hayati yang banyak tumbuh di sekitar kawah gunung berapi yang ada di Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan karakterisasi daun Cantigi yang meliputi ekstraksi secara maserasi bertahap dengan pelarut n-heksan, etil asetat, etanol 95%; penapisan fitokimia ekstrak; uji aktivitas antioksidan dan sitotoksik ekstrak; fraksinasi ekstrak dengan kromatografi kolom; uji sitotoksik fraksi ekstrak; pembuatan profil FTIR dan kromatografi gas dan massa (GCMS) fraksi teraktif. Hasil maserasi dengan n-heksan, etilasetat, etanol 95% masing-masing diperoleh ekstrak dengan rendemen 1,49; 2,51; dan 7,87%. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan positif untuk flavonoid, steroid, tannin, dan triterpenoid. Aktivitas antioksidan (IC₅₀) masing-masing ekstrak adalah 1726,35; 56,75; dan 15,62 ppm, dan aktivitas sitotoksik pada sel leukemia L1210 (IC₅₀) 12,67; 8,29; dan 10,42 µg/mL. Fraksinasi ekstrak teraktif etil asetat dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak kloroform:metanol 10:1, 8:1, dan 4:1 diperoleh 4 fraksi (F1- F4). Aktivitas sitotoksik pada sel leukemia L1210 (IC₅₀) masing-masing fraksi adalah 3,62; 1,69; 2,98; dan 2,96 µg/mL. Karakterisasi fraksi F2 yang diperkirakan dari FTIR dan GCMS menunjukkan 15 puncak senyawa dengan 3 komponen terbesar (waktu retensi, % kualitas, % kandungan) adalah asam 9,12-oktadekadienoat (32,89 menit; 98%; 42,88%); fenol, 2,4-bis (1,1-dimetilet) (21,487 menit; 96%; 10,75%); asam heksadekanoat (31,83 menit; 98%; 8,79%). Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat daun Cantigi terhadap sel leukemia L1210 lebih kuat dibandingkan ekstrak etanol 95% dan ekstrak n-heksan, dan aktivitas sitotoksik fraksi F2 ekstrak etil asetat yang mengandung 15 senyawa lebih tinggi dibandingkan ekstrak etil asetat yang tidak difraksinasi.

Kata kunci: Karakterisasi, *Vaccinium varingiaefolium*, sitotoksik, sel Leukemia L1210

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Keanekaragaman hayati atau biodiversitas atau keragaman biologis sangat penting bagi kehidupan di bumi. Indonesia merupakan salah satu negara di dunia yang memiliki keanekaragaman hayati tinggi, termasuk keanekaragaman tanamannya yang tidak hanya di darat tapi juga di perairan. Di darat meliputi dataran rendah dan tinggi termasuk pegunungan dan sekitar kawah gunung berapi. Di sekitar Bandung terdapat beberapa gunung berkawah seperti gunung Tangkuban Perahu (Bandung Utara), gunung Papandayan dan gunung Patuha (Bandung Selatan). Tumbuhan yang mendominasi daerah sekitar kawah-kawah ini adalah *Vaccinium varingiaefolium* Miq. (1,2,3)

Nama umum *V. varingiaefolium* Miq. yang masih termasuk dalam keluarga Ericaceae di beberapa daerah di Indonesia adalah Manis Rejo (Jawa), Cantigi (Sunda) dan Delima Montak (Kalimantan Timur). Cantigi memiliki daun yang dapat digunakan untuk perawatan kecantikan dan kebugaran. Rebusan daunnya dipercaya bisa membuat kulit kencang dan menghilangkan keriput atau bisa juga sekedar ditempelkan di wajah. Buahnya yang berwarna hitam yang mengandung antosianin berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh sehingga membuat badan lebih bugar dan sehat. Ekstrak daun Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) tidak bersifat toksik karena selama penelitian tidak ditemukan larva yang mati setelah 24 jam pendedahan dan juga memiliki aktivitas antifidan terhadap larva instar-3 akhir yaitu konsentrasi 3000-5000 ppm terhadap ulat kol (*Plutella xylostella*). (4)

Berbagai informasi di atas tumbuhan ini mendominasi sekitar kawah pegunungan Jawa Barat bahkan bukan tidak mungkin di Pulau Jawa, itu berarti sumber dayanya cukup melimpah. Namun demikian penelitian yang dilakukan untuk mengungkap potensi dan pemanfaatan cantigi masih sangat

minim berbeda dengan kerabat dekatnya seperti *bilberry*, *huckelberry*, *blueberry*, *cranberry*, dan berbagai buah beri utama lainnya di dunia.

Studi awal kandungan antosianin pada buah Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) telah dilakukan dan diduga mengandung aglikon antosianin sianidin dan peonidin. Penelitian kandungan senyawa kimia yang mudah menguap pada bunga Cantigi juga telah dilakukan dan terdapat 34 senyawa yang terdiri dari 27 terpenoid dan 6 metil benzoat. (5,6)

Kanker merupakan penyebab kematian ketiga di negara-negara berkembang setelah penyakit kardiovaskular dan infeksi. Menurut perkiraan WHO, pada tahun 2015 diperkirakan ada 9 juta orang meninggal karena kanker dan tahun 2030 diperkirakan meningkat menjadi 11,4 juta kematian karena kanker. Jumlah penderita kanker setiap tahun juga meningkat mencapai 6,25 juta orang dan dua pertiganya berasal dari negara berkembang seperti Indonesia.(7)

Kanker merupakan penyakit yang tidak diketahui penyebabnya secara pasti, tetapi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti merokok/terkena paparan asap, rokok, mengkonsumsi alkohol, paparan sinar ultraviolet pada kulit, obesitas dan diet tidak sehat, kurang aktifitas fisik, dan infeksi yang berhubungan dengan kanker. Kanker dapat dicegah dengan mengurangi faktor risiko terjadinya kanker tersebut. Dalam perkembangan di bidang kesehatan telah ditemukan obat-obat antikanker dan dilakukan kemoterapi, namun faktor biaya yang mahal menjadi kendala. Hal ini mendorong masyarakat untuk melakukan pengobatan menggunakan bahan alam atau obat tradisional.(8)

Pengembangan tanaman obat untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan telah banyak dilakukan. Banyak penelitian dilakukan untuk menemukan obat-obat baru yang berguna untuk mengobati berbagai macam penyakit yang sekarang sulit diobati. Masyarakat di negara berkembang umumnya masih menggunakan pengobatan tradisional sebagai bagian integral dari budaya mereka. Menurut sejarah, banyak obat-obatan medik berasal dari tanaman, namun masih banyak dalam bentuk yang sederhana berasal dari bahan bakunya atau merupakan bahan aktif dari suatu ekstrak tanaman.(9)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa flavonoids dapat memicu apoptosis pada sel leukemia L1210 dengan meningkatkan kadar glutation tubuh. (10). Penelitian lain juga menyatakan bahwa kandungan flavonoid pada buah berry dapat menghambat proliferasi sel leukemia L1210. (11). Mengingat kemiripan Cantigi dengan buah berry lain, ada kemungkinan Cantigi juga mempunyai efek yang sama.

Melihat besarnya potensi tanaman cantigi sebagai tanaman obat, maka perlu dilakukan karakterisasi simplisia dan ekstrak daun cantigi, aktivitas antioksidan dan sitotoksiknya.

B. PERUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian di atas, diketahui bahwa Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat besar namun masih banyak yang belum tergalikan informasi dan pemanfaatan Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.) maka perlu dilakukan karakterisasi simplisia dan ekstrak daun cantigi.

Berdasarkan studi awal yang telah diteliti pada buahnya memiliki kandungan antosianin dan daunnya memiliki aktivitas antifidan, dimana diketahui bahwa flavonoid dapat menyebabkan apoptosis dan menghambat proliferasi pada sel leukemia L1210, maka untuk mengetahui potensi tersebut perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dan uji sitotoksik pada daun cantigi tersebut.

C. PERTANYAAN PENELITIAN

1. Bagaimana karakteristik simplisia dan ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.)?
2. Apakah daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.) memiliki potensi aktivitas antioksidan dan sitotoksik?

D. TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan Umum

Mengetahui karakteristik dan potensi farmakologi yang dimiliki oleh ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.).

2. Tujuan Khusus

- a. Memperoleh ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.) yang mempunyai aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia L1210.
- b. Memperoleh fraksi paling aktif dari ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.) yang teruji mempunyai aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia L1210.
- c. Mengetahui besarnya aktivitas antioksidan dan potensi sitotoksik ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.).
- d. Mengetahui struktur kimia yang berpotensi sebagai anti kanker.

E. RUANG LINGKUP PENELITIAN

Penelitian ini meliputi karakterisasi dan ekstraksi simplisia daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.), serta uji aktivitas antioksidan dan uji aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210.

F. MANFAAT PENELITIAN

1. Menambah informasi karakteristik simplisia dan ekstrak daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.) yang bermanfaat untuk memperkaya literatur.
2. Memberikan informasi tentang aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia L1210 ekstrak daun Cantigi (*V. Varingieafolium* Miq.)

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. TINJAUAN BOTANI

1. Klasifikasi Tanaman



Gambar II.1. Tanaman Cantigi

Vaccinium varingiaefolium Miq. diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Ericales
Famili	: Ericaceae
Genus	: <i>Vaccinium</i>
Spesies	: <i>Vaccinium varingiaefolium</i> Miq.

Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) merupakan salah satu spesies dari genus *Vaccinium*. Taksonomi genus *Vaccinium* masih merupakan persoalan yang kompleks dan masih dalam investigasi. Analisis genetik mengindikasikan bahwa genus *vaccinium* tidak bersifat monofiletik. Beberapa spesies dari Asia

cenderung lebih dekat dengan spesies *Agapetes* daripada dengan spesies *Vaccinium*. (17)

2. Nama Umum

Cantigi. (1)

3. Nama Daerah

V. varingiaefolium Miq. memiliki beberapa nama umum sesuai daerah asalnya seperti adalah Manis Rejo (Jawa), Cantigi (Sunda), Delima Montak (Kalimantan Timur), arngoni (Nusa Tenggara Timur), kalimuntang (Sumatra Barat), sikil (Melayu), dan Mentigi (Sumatra Utara). (1,5) Sejauh ini masih belum ada informasi nama umum di negara lain di luar Indonesia selain *V. varingiaefolium* Miq.

4. Deskripsi Tanaman

V. varingiaefolium Miq. adalah tumbuhan menahun berupa perdu, arah tumbuh tegak ke atas; daun tunggal tidak lengkap, berseling, bulat telur, tepi daun rata, tulang daun melengkung, permukaan daun agak kasar, trikoma jarang, masih muda merah, tua menjadi hijau. Batang bulat, seluruh permukaan terdapat rambut, muda warna merah coklat, tua menjadi coklat, percabangan simpodial; akar tunggang, coklat, akar cabang banyak. Pada pemeriksaan anatomi pada daun diperoleh stomata tipe parasitik, trikoma uniseluler, berkas pengangkutan kolateral, tipe penebalan xilem tangga; dan pada batang diperoleh trikoma uniseluler, berkas pengangkutan kolateral terbuka, serta tipe xilem dengan penebalan tangga. (1,16)

5. Ekologi dan Penyebaran

Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) tumbuh pada dataran tinggi pada ketinggian antara 1500-3300 meter di atas permukaan laut (dpl) terutama di daerah pegunungan berkawah. Cantigi merupakan tumbuhan asli hutan sub-Alpin berbentuk perdu atau tumbuhan tahunan berukuran kecil sampai beberapa meter pada pegunungan di pulau Jawa. (16)

Di sekitar Bandung terdapat beberapa gunung berkawah seperti gunung Tangkuban Perahu (Bandung Utara), gunung Papandayan dan gunung Patuha (Bandung Selatan). Tumbuhan yang mendominasi di daerah sekitar kawah-kawah ini adalah *V. varingiaefolium* Miq. (2,3) Dinas Pekerjaan Umum

Perumahan dan Energi Sumber Daya Mineral DI Yogyakarta melalui Sistem Informasi Geografi melaporkan Kawasan Strategis Nasional Merapi mengenai keadaan vegetasi dan faunanya. Dalam laporan disampaikan bahwa *V. varingiaefolium* Miq. tumbuh di sekitar kawah gunung Merapi dengan berbagai kondisi tumbuhan seperti tingkat tiang 2,61%, tingkat sapihan 0,48%, tingkat semai 1,32%. Keberadaan *V. varingiaefolium* Miq. dilaporkan juga dari luar Jawa. Di sekitar Danau Tiga Warna Taman Nasional Kelimutu di Ende Flores, Nusa Tenggara Timur, tumbuhan *V. varingiaefolium* Miq., yang dikenal dengan nama argoni dan dipercaya oleh penduduk setempat sebagai makanan para dewa, mendominasi lokasi tersebut. (12) Di Sumatra Utara tumbuhan ini ditemukan di sekitar kawah gunung Sinabung. (13) Di Kalimantan Timur tumbuhan ini ditemukan mendominasi kawasan cagar alam Padang Luway. (17) Dari pengamatan diduga kuat penyebaran tumbuhan melalui burung yang memakan buah tumbuhan tersebut dan kemudian membuang bijinya. Belum ada informasi keberadaan tumbuhan ini di luar Indonesia.

6. Kandungan Kimia dan Manfaat

Bagi para pendaki gunung keberadaan Cantigi yang memiliki akar yang cengkeraman kuat ke dalam bumi sangat membantu sebagai tempat berlindung pada saat ada badai. Dengan cengkeraman akar yang kuat tumbuhan ini tetap berdiri kokoh walaupun diterpa angin yang kuat sehingga dapat melindungi para pendaki. Masyarakat yang tinggal di sekitar tempat tumbuh Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) menggunakan tanaman Cantigi ini untuk berbagai macam keperluan. Mereka memanfaatkan tumbuhan ini sebagai tanaman hias (bonsai), sumber kayu bakar dan makanan (bahan lalaban). (5) Penggunaan sebagai kosmetika dan obat-obatan juga telah dilaporkan. (14,16) Kayunya yang keras dan tumbuh di tempat ekstrim memberikan angatan yang sangat baik untuk sekedar bersembunyi dari serangan udara dingin gunung. Selain itu kayu yang keras tersebut juga baik sebagai bahan bakar untuk memasak. (5) Daun Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) yang masih muda berwarna merah muda. Masyarakat sekitar menggunakannya sebagai makanan (lalaban) yang berfungsi sebagai sayuran. Daun cantigi ini juga digunakan sebagai obat sakit

perut karena rasanya yang sedikit asam dan kesat. Sedangkan rebusan daunnya dapat digunakan sebagai obat demam. Daun Cantigi dapat juga digunakan untuk perawatan kecantikan dan kebugaran. Rebusan daunnya dipercaya bisa membuat kulit kencang dan menghilangkan keriput atau bisa juga sekedar ditempelkan di wajah. Daun yang mengandung antosianin -terutama pada buahnya yang berwarna hitam- berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh sehingga membuat badan lebih bugar dan sehat. Daun yang segar, kering atau bubuk dipakai sebagai *astringent* untuk menyembuhkan luka, bengkak, terbakar, nyeri dan bisul. Fungsi lain, daun bisa digunakan sebagai analgesik, antiradang, spasmolitik, antivirus dan agen hipotensif, mengatasi gangguan lambung dan usus. Karena berbahan dasar alami, maka daun cantigi ini aman dikonsumsi.(5, 13,14)

Ekstrak daun Cantigi (*V. Varingieafolium* Miq.) mempunyai aktivitas sebagai antifidan (*antifeedant* atau senyawa penghambat makan) terhadap ulat kol (*Plutella xylostella*) in vitro. Senyawa ini akan menghambat makan, tidak membunuh secara langsung, dan serangga akan mati kepalaran. Senyawa *antifeedant* toksisitasnya rendah, sehingga aman terhadap lingkungan.(7) Ekstrak bunga Cantigi mengandung banyak senyawa yang mudah menguap (volatile) terutama terpenoid dan metil benzoat. Senyawa-senyawa yang mudah menguap ini dapat berfungsi sebagai penarik bagi para polinator untuk membantu polinasi (penyerbukan), serta untuk pertahanan dan perlindungan terhadap tekanan biotik dan abiotik. Daun Cantigi (*Vaccinium varingieafolium*) terutama yang tumbuh pada daerah sekitar kawah gunung berapi dengan kadar SO₂ tinggi mempunyai kandungan belerang yang tinggi, dapat tumbuh pada tanah dengan pH relatif asam (4,5–5,5) dan pada tanah dengan kandungan Aluminium (Al) yang tinggi pula. Cantigi mempunyai daya tahan yang tinggi terhadap sklerosis yang biasa dialami oleh tanaman yang terkena pendedahan yang cukup lama dengan SO₂.(3)

B. PENAPISAN FITOKIMIA

Penapisan fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan.

Pemeriksaan dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa metabolit sekunder yang memiliki manfaat bagi kesehatan. Golongan-golongan senyawa tersebut termasuk di antaranya adalah alkaloid, glikosida, flavonoid, terpenoid, tanin, saponin dan antrakuinon.(26, 27, 28, 29)

1. Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen yang biasanya dalam gabungan berbentuk siklik, serta bereaksi dengan pereaksi alkaloid. Menurut sifatnya alkaloid umumnya berbentuk kristal padat dan sebagian kecil bersifat cair dan memutar bidang polarisasi dan rasanya pahit. (26) Alkaloid berbentuk bebas (basa) mudah larut dalam pelarut organik dan sukar larut dalam pelarut air. Dalam bentuk garamnya, misal garam HCl atau H₂SO₄, maka alkaloid mudah larut dalam air.(29)

Keberadaan alkaloid dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan di atas cawan porselin. Residu yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCL 2 N. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan dengan 3 tetes HCl 2 N yang berfungsi sebagai blanko. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.(30,31)

2. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang umumnya terdapat dalam tumbuhan berpembuluh. Flavonoid terdapat dalam tumbuhan dalam bentuk glikosida dan aglikon flavonoid. Oleh karena itu untuk menganalisis flavonoid biasanya yang diperiksa adalah aglikon dalam ekstrak tumbuhan yang telah dihidrolisis. Proses ekstraksi senyawa ini dilakukan menggunakan etanol mendidih untuk mencegah oksidasi enzim.(31) Peran penting flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai penarik serangga yang sangat diperlukan dalam proses penyerbukan dan penarik perhatian binatang yang membantu penyebaran biji.(29)

Keberadaan flavonoid dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Larutan uji ± 1 mL diuapkan hingga kering, dibasahkan sisanya dengan aseton

P, ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan serbuk halus asam oksalat P, dipanaskan di atas tangas air dan hindari pemanasan berlebihan. Eter P ditambahkan 10 mL. Larutan diamati di bawah sinar UV 366 nm; berfluoresensi kuning intensif, menunjukkan adanya flavonoid.(32)

3. Terpenoid

Terpenoid merupakan suatu senyawa yang tersusun dari molekul isopren, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan unit C_5 . Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa seperti monoterpen dan seskuiterpen yang mudah menguap, diterpen yang kurang menguap dan yang tidak menguap, diterpen, dan sterol.(32)

Sebagian besar terpenoid mempunyai mempunyai struktur siklik dengan satu atau lebih gugus fungsional (karbonil, hidroksi, dan lain-lain). Sesuai strukturnya, pada umumnya terpenoid merupakan senyawa yang larut dalam minyak (lipid). Senyawa ini biasanya diekstraksi menggunakan eter dan kloroform. Saponin dan glikosida jantung merupakan senyawa golongan triterpen atau steroid yang terdapat dalam bentuk glikosida. (45)

Keberadaan triterpenoid dan steroid dalam tumbuhan dapat diketahui dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard. Larutan uji sebanyak 2 mL diuapkan dalam cawan porselin. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Asam sulfat pekat sebanyak 2 mL selanjutnya ditambahkan melalui dinding tabung. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.(38)

4. Tanin

Tanin merupakan senyawa umum yang terdapat dalam tumbuhan yang berpembuluh, memiliki gugus fenol, memiliki rasa sepat dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung-silang (crosslinking) protein. Jika bereaksi dengan protein akan membentuk kopolimer stabil yang tidak larut dalam air. Secara kimia tanin dapat dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi

yang disebut juga flavolan secara biosintesis dapat dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal yang membentuk senyawa dimer dan kemudian oligomer yang lebih tinggi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer.(31) Keberadaan tanin dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Larutan uji sebanyak 1 mL direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin. (33,34)

5. Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen yang merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun yang jika dikocok kuat akan menimbulkan busa. Pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah pada tikus.(27)

Keberadaan saponin dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Larutan uji dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, menunjukkan adanya saponin. Pada penambahan 1 tetes HCl 2 N, busa tidak hilang. (45)

6. Glikosida

Glikosida adalah suatu senyawa yang bila dihidrolisis akan terurai menjadi glikon (gula) dan senyawa lain yaitu aglikon atau genin. Glikosida dapat digolongkan menjadi dua yaitu α -glikosida dan β -glikosida. Pada tumbuhan umumnya yang terdapat adalah bentuk β -glikosida. Umumnya glikosida mudah terhidrolisis oleh asam mineral atau enzim. Hidrolisis oleh asam memerlukan panas, sedangkan hidrolisis oleh enzim tidak memerlukan panas. Hidrolisis oleh enzim pada tumbuhan terjadi pada proses perkecambahan, luka, dan aktivitas fisiologis dari sel. Keberadaan glikosida dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Pengujian dilakukan menggunakan pereaksi Liebermann Burchard. Larutan uji ditambahkan dengan 5 mL asam asetat anhidrat P. Asam sulfat P ditambahkan 10 tetes, terjadi warna biru atau hijau menunjukkan adanya glikosida.(45)

7. Kuinon

Kuinon adalah senyawa berwarna yang mempunyai kromofor dasar. Untuk tujuan identifikasi, kuinon dapat dibagi menjadi 4 kelompok yaitu benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Benzokuinon, naftokuinon, dan antrakuinon umumnya terhidoksilasi dan memiliki sifat senyawa fenol dan in vivo mungkin terdapat dalam bentuk glikosida. Kuinon isoprenoid yang tersebar luas dalam tumbuhan biasanya terlibat dalam respirasi sel seperti ubikuinon dan terlibat dalam fotosintesis seperti plastokuinon.(29)

Keberadaan kuinon dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Uji antrakuinon dilakukan dengan uji Brontrager dan uji Brontrager termodifikasi. Uji Brontrager dilakukan dengan cara melarutkan 2 mL sampel dengan 10 mL akuades kemudian disaring, filtrat diekstrak dengan 5 mL benzena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Filtrat A digunakan sebagai blangko dan filtrat B ditambahkan 5 mL ammonia kemudian dikocok, bila terdapat warna merah berarti hasil positif. Uji Brontrager termodifikasi dilakukan dengan melarutkan 2 mL sampel dengan 10 mL 0,5 N KOH dan 1 mL larutan hidrogen peroksida. Kemudian dipanaskan pada waterbath selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Pada filtratnya ditambahkan asam asetat bertetes-tetes sampai pada kertas lakmus menunjukkan asam. Selanjutnya diekstrak dengan 5 mL benzena. Hasil ekstrak dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Larutan A digunakan sebagai blangko, sedangkan larutan B dibuat basa dengan 2-5 mL larutan amonia. Perubahan warna pada lapisan basa diamati. Warna merah atau merah muda menunjukkan adanya antrakuinon.(42, 43)

8. Minyak atsiri

Minyak atsiri merupakan minyak dari tumbuhan yang komponennya secara umum mudah menguap sehingga banyak yang menyebutnya minyak terbang. Minyak atsiri disebut juga etherial oil atau minyak eteris karena sifatnya seperti eter. Dalam bahasa internasional biasa disebut essential oil (minyak essen) karena bersifat khas sebagai pemberi aroma/bau/esen. Keberadaan minyak atsiri dapat diketahui dengan cara berikut. Sejumlah 2 gram sampel dalam tabung reaksi (volume 20 mL), ditambahkan 10 mL pelarut petroleum

eter dan pasang corong (yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air) pada mulut tabung, panaskan selama 10 menit diatas penangas air dan dinginkan. Saring dengan kertas saring, filtrat diuapkan pada cawan penguap, residu dilarutkan dengan pelarut alkohol sebanyak 5 mL lalu saring dengan kertas saring, filtrat diuapkan pada cawan penguap, residu berbau aromatik/menyenangkan, menunjukkan adanya senyawa golongan minyak atsiri.(35,42)

9. Kumarin

Kumarin adalah senyawa fenol yang pada umumnya berasal dari tumbuhan tinggi dan jarang sekali ditemukan pada mikroorganisme. Kumarin ditemukan pada hampir semua bagian tumbuhan mulai dari akar, batang, daun, bunga dan buah. Kumarin banyak terdapat dalam bentuk glikosida. (45)

Keberadaan kumarin dalam tumbuhan dapat diketahui dengan cara berikut. Dua gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi (volume 20 mL) ditambahkan 10 mL pelarut kloroform dan pasang corong (yang diberi lapisan kapas yang telah dibasahi dengan air) pada mulut tabung, panaskan selama 20 menit diatas penangas air dan dinginkan, saring dengan kertas saring, filtrat diuapkan pada cawan penguap sampai kering, sisa ditambahkan air panas sebanyak 10 mL, dinginkan, larutan dimasukkan kedalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 mL larutan amonia (NH₄OH) 10%, amati dibawah sinar lampu ultraviolet pada panjang gelombang 365 nm, maka terjadi fluoresensi warna biru atau hijau, menunjukkan adanya golongan kumarin.(35,45)

C. SIMPLISIA

Simplisia atau herbal adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C. Selain itu terdapat pula simplisia segar yaitu bahan alam segar yang belum dikeringkan, sedangkan simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan adalah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya atau zat nabati lain yang dengan cara tertentu

dipisahkan dari tumbuhannya. Simplisia nabati ada yang berbentuk serbuk yaitu yang disebut serbuk simplisia nabati. Serbuk simplisia nabati adalah bentuk serbuk dari simplisia nabati, dengan ukuran derajat kehalusan tertentu. Sesuai dengan derajat kehalusannya, dapat berupa serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus dan sangat halus. Serbuk ini tidak boleh mengandung fragmen jaringan dan benda asing yang bukan merupakan komponen asli dari simplisia yang bersangkutan antara lain telur nematoda, bagian dari serangga dan hama serta sisa tanah. (41,44)

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal sebelum pembuatan ekstrak. Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus dan sangat halus. Kecuali dinyatakan lain, derajat kehalusan serbuk simplisia untuk pembuatan ekstrak merupakan serbuk simplisia halus. Untuk pengujian simplisia dapat dibuat larutan uji simplisia yang dapat dilakukan menurut Pembuatan Larutan Uji Simplisia <321> sebagai berikut. Sejumlah serbuk kering simplisia ditimbang, direfluks selama 30 menit menggunakan jenis dan pelarut yang sesuai, disaring, direfluks kembali residu dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Filtrat dikumpulkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, lalu ditambahkan pelarut sampai tanda.(41)

D. KARAKTERISASI SIMPLISIA

Simplisia sebagai produk hasil pertanian atau pengumpulan tumbuhan liar (*wild crop*) memiliki kandungan kimia yang tidak terjamin selalu konstan karena adanya variabel bibit, tempat tumbuh, iklim, kondisi (umur dan cara) panen, serta proses pasca panen dan preparasi akhir. Variasi kandungan senyawa dalam produk hasil panen tumbuhan obat disebabkan oleh beberapa aspek sebagai berikut:

- 1) Genetik (bibit)

- 2) Lingkungan (tempat tumbuh, iklim)
- 3) Rekayasa agronomi (fertilizer, perlakuan selama masa tumbuh)
- 4) Panen (waktu dan pasca panen)

Besarnya variasi senyawa kandungan meliputi baik jenis ataupun kadarnya, sehingga timbul jenis (spesies) lain yang disebut kultivar . Proses pemanenan dan preparasi simplisia merupakan proses yang dapat menentukan mutu simplisia dalam artian, yaitu komposisi senyawa kandungan, kontaminasi, dan stabilitas bahan. Karakterisasi suatu simplisia mempunyai pengertian bahwa simplisia yang akan digunakan untuk obat sebagai bahan baku harus memenuhi persyaratan yang tercantum dalam monografi terbitan resmi Departemen Kesehatan (Materia Media Indonesia). Sedangkan sebagai produk yang langsung dikonsumsi (serbuk jamu, sdb) masih harus memenuhi persyaratan produk kefarmasian sesuai dengan peraturan yang berlaku. Karakterisasi simplisia meliputi uji makroskopik, uji mikroskopik dan identifikasi simplisia. (35,50)

E. EKSTRAKSI

Ekstraksi suatu tanaman obat adalah pemisahan secara kimia atau fisika suatu bahan padat atau bahan cair dari suatu padatan, yaitu tanaman obat (50). Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi dua yaitu cara dingin dan cara panas. Cara dingin terbagi menjadi dua yaitu maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas terbagi menjadi empat jenis yaitu refluks, soxhlet, digesti, infuse, dan dekok (36)

Maserasi adalah proses mengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Maserasi berasal dari kata *macerase* berarti mengairi atau melunakkan. Maserasi merupakan cara ekstraksi paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian sel dengan yang masuk ke dalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir (46)

Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang, upaya pengocokan ini dapat menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat di dalam cairan, sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengekstraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh. (46)

Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (50)

Ekstrak dibuat melalui proses ekstraksi menurut panduan pada Pembuatan Ekstrak <311> yaitu dengan cara maserasi serbuk kering simplisia menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan hendaklah dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia. Jika tidak dinyatakan lain, etanol 70% P digunakan sebagai pelarut. Ke dalam maserator dimasukkan satu bagian serbuk kering simplisia, ditambahkan 10 bagian pelarut, lalu direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, dan kemudian didiamkan selama 8 jam. Maserat dipisahkan dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat kemudian dikumpulkan, diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah sampai diperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh dihitung yaitu sebagai persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana yang ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak. Pembuatan ekstrak dapat dilakukan dengan cara lain seperti perkolasi, sokletasi, atau *counter current*.(49)

F. EKSTRAK

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan. Ada beberapa jenis ekstrak yakni, ekstrak cair, ekstrak kental, dan ekstrak kering. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih dari 30%. Ekstrak kental jika memiliki kadar air antara 5-30%. Ekstrak kering mengandung kadar air kurang dari 10% (34,36).

Faktor yang mempengaruhi ekstrak yaitu faktor biologi dan factor kimia. Faktor biologi meliputi spesies tumbuhan, lokasi tumbuh, waktu pemanenan, penyimpanan bahan tumbuhan, umur tumbuhan dan bagian yang digunakan. Sedangkan faktor kimia yaitu faktor internal (jenis senyawa katif dalam bahan, komposisi kualitatif senyawa aktif, komposisi kuantitatif senyawa aktif, kadar total rata-rata senyawa aktif) dan faktor eksternal (metode ekstraksi, perbandingan ukuran alat ekstraksi, ukuran, kekerasan dan mekeringan bahan, pelarut yang digunakan dalam ekstraksi, kandungan logam berat, kandungan pestisida). (34, 35)

Selain faktor yang mempengaruhi ekstrak, ada faktor penentu mutu ekstrak yang terdiri dari beberapa aspek, yaitu; kesahihan tanaman, genetik, lingkungan tempat tumbuh, penambahan bahan pendukung, waktu panen, penanganan pasca panen, teknologi ekstraksi, teknologi pengentalan dan pengeringan ekstrak . (48)

G. PARAMETER-PARAMETER STANDAR EKSTRAK

Parameter-parameter standar ekstrak terdiri dari parameter spesifik dan parameter non spesifik.

1. Parameter Spesifik Ekstrak

Penentuan parameter spesifik adalah aspek kandungan kimia kualitatif dan aspek kuantitatif kadar senyawa kimia yang bertanggung jawab langsung terhadap aktivitas farmakologis tertentu. Parameter spesifik ekstrak meliputi :

- 1) Identitas (parameter identitas ekstrak) meliputi : deskripsi tata nama, nama ekstrak (generic, dagang, paten), nama lain tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang, daun, sdb) dan nama Indonesia tumbuhan.
- 2) Organoleptis : parameter organoleptik ekstrak meliputi penggunaan panca indra mendeskripsikan bentuk, warna, bau, rasa guna pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin
- 3) Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu : melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol/air) untuk ditentukan jumlah larutan yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetric. Dalam hal tertentu dapat diukur senyawa terlarut dalam pelarut lain misalnya heksana, diklorometan, methanol. Tujuannya untuk memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.
- 4) Uji kandungan kimia ekstrak
 - a. Pola kromatogram

Pola kromatogram dilakukan sebagai analisis kromatografi sehingga memberikan pola kromatogram yang khas. Bertujuan untuk memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram (KLT, KCKT). (43)
 - b. Kadar kandungan kimia tertentu

Suatu kandungan kimia yang berupa senyawa identitas atau senyawa kimia utama ataupun kandungan kimia lainnya, maka secara kromatografi instrumental dapat dilakukan penetapan kadar kandungan kimia tersebut. Instrumen yang dapat digunakan adalah densitometry, kromatografi gas, KCKT atau instrument yang sesuai. Tujuannya memberikan data kadar kandungan kimia tertentu sebagai senyawa identitas atau senyawa yang diduga bertanggung jawab pada efek farmakologi (43).

2. Parameter Non Spesifik Ekstrak

Penentuan parameter non spesifik ekstrak yaitu penentuan aspek kimia, mikrobiologi dan fisis yang akan mempengaruhi keamanan konsumen dan stabilitas (48)

Parameter non spesifik ekstrak menurut buku “Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat” (31)

a. Bobot jenis

Parameter bobot jenis adalah masa per satuan volume yang diukur pada suhu kamar tertentu (25 C) yang menggunakan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Tujuannya adalah memberikan batasan tentang besarnya masa persatuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang, bobot jenis juga terkait dengan kemurnian dari ekstrak dan kontaminasi. (29)

b. Kadar Air

Parameter kadar air adalah pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, yang bertujuan untuk memberikan batasan minimal atau rentang tentang besarnya kandungan air dalam bahan (29)

c. Kadar abu

Parameter kadar abu adalah bahan dipanaskan pada temperature dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap, sehingga tinggal unsure mineral dan anorganik yang memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Parameter kadar abu ini terkait dengan kemurnian dan kontaminasi suatu ekstrak (29)

d. Sisa pelarut

Parameter sisa pelarut adalah penentuan kandungan sisa pelarut tertentu yang mungkin dalam ekstrak. Tujuannya adalah memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada (29).

e. Cemaran mikroba

Parameter cemaran mikroba adalah penentuan adanya mikroba yang pathogen secara analisis mikrobiologis. Tujuannya adalah memberikan

jaminan bahwa ekstrak tidak boleh mengandung mikroba pathogen dan tidak mengandung mikroba non pathogen melebihi batas yang ditetapkan karena berpengaruh pada stabilitas ekstrak dan berbahaya (toksik) bagi kesehatan (34)

f. Cemaran aflatoksin

Aflatoksin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur. Aflatoksin sangat berbahaya karena dapat menyebabkan toksigenik (menimbulkan keracunan), mutagenic (mutasi gen), teratogenik (penghambatan pada pertumbuhan janin) dan karsinogenik (menimbulkan kanker pada jaringan). Jika ekstrak positif mengandung aflatoksin maka pada media pertumbuhan akan menghasilkan koloni berwarna hijau kekuningan sangat cerah. (34)

g. Cemaran Logam berat

Parameter cemaran logam berat adalah penentuan kandungan logam berat dalam suatu ekstrak, sehingga dapat memberikan jaminan ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu (Hg, Pb, Cd, As) melebihi batas yang telah ditetapkan karena berbahaya bagi kesehatan. (34)

H. METODE PEMISAHAN DAN PEMURNIAN

1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan yang relatif murah. Kromatografi jenis ini sering digunakan sebagai metode preparatif untuk berbagai tujuan seperti mencari sistem eluen untuk kromatografi kolom atau untuk mengecek kemurnian suatu senyawa. (40)

Fase diam yang digunakan berupa padatan penyerap yang dilekatkan pada sebuah plat datar dari kaca, plastik atau aluminium sehingga membentuk lapisan tipis dengan ketebalan tertentu. Fase diam atau penyerap yang bisa digunakan sebagai pelapis plat adalah silika gel (SiO_2), selulosa, alumina (Al_2O_3), dan kieselgur (tanah diatome). Kebanyakan penyerap yang digunakan adalah silika gel dan ada yang siap pakai. (42)

Fase gerak (pelarut, eluen) merupakan faktor penentu gerakan komponen-komponen dalam campuran. Pemilihan fase gerak tergantung pada sifat

kelarutan komponen sampel terhadap terhadap pelarut yang digunakan. Kekuatan elusi dari deret pelarut untuk senyawa-senyawa dalam KLT yang menggunakan silika gel akan menurun dengan urutan sebagai berikut: Air murni > metanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluen > trikloroetilen > tetraklorida > sikloheksana > heksana. Fase gerak dengan polaritas tinggi biasanya digunakan untuk mengelusi senyawa-senyawa yang kuat absorpsinya, sedangkan fase gerak yang kurang polar digunakan untuk mengelusi senyawa yang absorpsinya lemah.

Untuk identifikasi senyawa yang telah dipisahkan pada lapis tipis didapat dari faktor retensi (Rf), yaitu dengan cara membandingkan jarak tempuh senyawa terlarut dengan jarak tempuh fase gerak (pelarut).(41)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak tempuh pelarut dari titik awal}}$$

2. Kromatografi Kolom “Flash”

Kromatografi flash merupakan kromatografi yang menggunakan tekanan rendah yaitu < 20 psi yang digunakan sebagai kekuatan untuk elusi bahan pelarut melalui suatu ruangan atau kolom yang lebih cepat. Kualitas pemisahan moderat, tetapi berjalan cepat yaitu 10-15 menit. Untuk campuran yang terdiri dari bermacam-macam komponen, metode ini kurang cocok, tetapi sangat baik untuk memisahkan campuran yang kurang kompleks seperti memisahkan reaktan dari komponen utama dalam suatu sintesis senyawa organik.(43)

Pemisahan merupakan fungsi waktu (r) dibagi dengan luas puncak (w). Sampel dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan corong dengan diameter tangkai corong 4 mm. Pemisahan yang terbaik pada Rf 0,35. Pelarut yang digunakan merupakan pelarut campur 10-50% etil asetat dengan 30-60% petroleum eter atau dengan heksan. Fraksi-fraksi yang didapat dari pemisahan dengan kromatografi ini kemudian dilakukan lagi uji KLT. Sampel ditotolkan pada plat KLT sebanyak 5 µL untuk setiap fraksi. Dari kromatogram, fraksi-fraksi yang mengandung senyawa

yang diinginkan akan teridentifikasi dan derajat pemisahan (Rf) yang dicapai akan diketahui.(43)

3. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom dapat digunakan untuk memisahkan ekstrak bahan alam. Sephadex LH-20 banyak digunakan untuk keperluan tersebut dan merupakan media kromatografi cair yang didesain berdasarkan ukuran molekul dari produk bahan alam seperti flavonoid, glikosida, steroid, dan peptida dengan bobot molekul rendah. Sephadex merupakan dekstran yang bertautan silang (cross-linked). Dekstran merupakan polimer glukosa yang diproduksi dari mikroorganisme tertentu dan yang cabang-cabangnya dihubungkan dengan rantai utama oleh hubungan 1-3. Prinsip pemisahan kromatografi sephadex LH-20 adalah bahwa molekul dengan bobot molekul (BM) kecil akan melewati dan terjebak dalam gel sephadex terlebih dahulu sebelum turun keluar kolom, sedangkan molekul dengan BM besar akan langsung terelusi keluar kolom karena tidak dapat menembus gel. Oleh karena itu molekul yang akan keluar dari kolom terlebih dahulu adalah molekul yang ukurannya lebih besar, setelah itu disusul oleh molekul yang ukurannya lebih kecil.(41)

Sephadex LH-20 juga dirancang untuk penggunaan dengan pelarut organik. Oleh karena itu sangat cocok untuk pemurnian akhir aglikon flavonoid dan glikosida yang telah diisolasi dari pemisahan sebelumnya. Eluen yang cocok dengan jenis adsorben ini umumnya adalah metanol atau campuran metanol dengan sedikit air. Sebelum pemakaian sebaiknya direndam dulu dalam metanol.(47)

4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT telah lama dikembangkan sejak tahun 1960-an. KCKT termasuk metode analisis yang relatif baru yaitu suatu teknik kromatografi yang menggunakan fase geraknya cairan dan fase diamnya padat dalam suatu kolom. Dibandingkan dengan teknik kromatografi lainnya, KCKT memiliki banyak kelebihan yaitu: (48)

- 1) Mampu memisahkan molekul dalam campuran
- 2) Mudah dalam pengerjaan

- 3) Cepat dalam analisis
- 4) Memiliki kepekaan yang tinggi
- 5) Minimal terjadinya dekomposisi bahan yang dianalisis
- 6) Memiliki resolusi yang baik
- 7) Kompatibel dengan berbagai macam detektor
- 8) Kolom dapat digunakan berulang
- 9) *Sample recovery* dapat dilakukan
- 10) Dapat digunakan untuk tujuan kualitatif dan kuantitatif

Kromatografi fase terbalik (*reversed phase*) dalam teknik KCKT sangat banyak digunakan. Penerapannya terutama untuk analit yang bersifat non polar, non ionik, dan terionkan (*zwitter ion*). Fase diam yang paling sering digunakan adalah fase diam yang bersifat hidrofobik.

Untuk fase diam, oktadesil silan (ODS atau C₁₈) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah, sedang dan tinggi. Untuk fase gerak, campuran larutan dapar dan metanol atau campuran air dengan asetonitril merupakan fase gerak paling banyak digunakan.(41)

Untuk detektor, penggunaan detektor UV-Vis paling banyak digunakan. Detektor ini memiliki sensitivitas yang tinggi karena dapat menganalisis analit dalam skala nanogram. Keuntungan lainnya yaitu tidak dipengaruhi suhu. Pendeteksian terjadi atas dasar terjadinya transisi elektronik elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi.

Sadiyah dan Kodir (2012) telah melakukan pemurnian ekstrak buah Cantigi (*V. varingieafolium*) menggunakan kromatografi kolom. Fase diam yang digunakan adalah resin poliakrilik Amberlite XAD-7. Fase geraknya ada 3 macam yaitu:

- 1) Asetonitril 6% (asetonitril : TFA : air = 6 : 0,5 : 93,5 % v/v)
- 2) Asetonitril 50% (asetonitril : TFA : air = 50 : 0,5 : 49,5 % v/v)
- 3) Asetonitril 99,5% (asetonitril : TFA : air = 99,5 : 0,5 : 0 % v/v)

Dari fraksi-fraksi yang diperoleh, dilakukan identifikasi terhadap antosianin menggunakan spektrofotometri pada 200-800 nm.(8)

Sampel yang merupakan senyawa mudah menguap (volatile substances) dari bunga cantigi didesorpsi dari tabung adsorpsi lalu dipanaskan dan dianalisis menggunakan kromatografi gas dengan detektor spektrometri massa (GC-MS).(9)

- 1) Senyawa mudah menguap dilepas dari tabung adsorpsi menggunakan desorber panas Turbo Matrix 650 ATD (Perkin Elmer, USA). Tabung-tabung dipanaskan pada 250°C dengan bukaan luaran (1:2) untuk memasukan sampel ke dalam GC-MS Varian 4000
- 2) Kolom VF-WAXms (0,32mm x 30m) dengan ketebalan selaput 1 µm.
- 3) Suhu kolom 35°C/5 menit, dinaikkan 10°C/menit sampai 240°C (tahan selama 4 menit).
- 4) Deteksi dengan spektroskopi massa (MS) mode ionisasi elektron dengan rentang massa 35-400 amu, 25 µAmp, kecepatan pembacaan (scanning) 0,6 s (4 µscan).

Suhu lini transfer, jerap, manifold, dan sumber ion masing-masing (170, 100, 50 dan 180°C).

I. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Berbagai metode uji aktivitas antioksidan telah digunakan untuk mengetahui dan membandingkan aktivitas antioksidan pada makanan. Pengujian kapasitas absorbansi radikal oksigen telah digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada makanan, serum dan cairan biologis. Metode ini memerlukan peralatan khusus dan keahlian teknis untuk analisisnya. Beberapa metode untuk uji aktivitas antioksidan antara lain *Thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS), *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), *2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), *2,2'-azobis-amidinopropane-dihydrochloride* (AAPH) serta reagen *Folin-Ciocalteu*. Berbagai metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada bahan makanan dapat memberikan hasil yang berbeda-beda tergantung pada jenis radikal bebas yang digunakan sebagai reagen. Metode yang cepat, mudah dan relatif murah untuk mengukur aktivitas antioksidan pada makanan dan bahan makanan menggunakan DPPH.

DPPH secara luas digunakan untuk menguji kemampuan senyawa-senyawa penyerang radikal bebas atau donor hidrogen dan untuk menilai besarnya aktivitas antioksidan pada makanan. Metode ini dapat digunakan untuk sampel padat ataupun cair dan tidak spesifik untuk senyawa antioksidan tertentu tetapi pada keseluruhan senyawa antioksidan yang ada dalam sampel. Uji aktivitas antioksidan secara keseluruhan membantu dalam memahami fungsi zat-zat yang terkandung dalam makanan. Elektron bebas dalam radikal bebas DPPH mempunyai panjang gelombang maksimum 517 nm dan berwarna ungu. Perubahan warna ungu menjadi kuning sebagai absorpsivitas molar radikal bebas DPPH berkurang dari 9660 menjadi 1640 ketika elektron bebas radikal bebas menjadi berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan yang menyerang radikal bebas membentuk DPPH-H tereduksi. Perubahan warna DPPH sebanding dengan banyaknya elektron yang tertangkap.(54)

Dalam alkohol, DPPH (*difenil pikril hidrazil hidrat*) menghasilkan radikal bebas aktif yang stabil dengan absorpsi maksimum pada 517 nm dan dapat direduksi oleh senyawa antioksidan.. Dalam metode ini larutan sampel ditambah larutan 0,2 mM DPPH (sebagai kontrol) dalam metanol, dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar dalam keadaan gelap dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada 517 nm. Aktivitas antiradikal dapat terlihat jika warna berubah dari ungu menjadi kekuningan. Perubahan warna larutan menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dan dapat diukur dengan perbedaan absorbansi yang dihasilkan pada sampel dibandingkan dengan kontrol. Aktivitas antiradikal dinyatakan dalam bentuk persen penangkapan radikal DPPH dan dihitung dengan persamaan.(49)

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \%$$

Nilai 0% berarti tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas atau antioksidan, sedangkan nilai 100% berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan pengenceran larutan uji untuk melihat batas konsentrasi aktivitasnya.(49)

J. UJI SITOTOKSIK TERHADAP SEL LEUKIMIA L1210

Salah satu cara pendahuluan dalam penentuan senyawa yang berkhasiat sebagai antikanker didasarkan atas adanya efek pada sel (sitotoksik) adalah dengan uji daya hambat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210. Sel leukemia L1210 adalah sel tumor yang diisolasi dari limfa tikus. Sifat-sifat yang spesifik dari lini sel L1210 adalah terjadinya perkembangbiakan yang tersebar luas ke organ lainnya dan dapat menyebabkan kematian dalam kurun waktu 8-11 hari, serta merupakan sel tumor yang tumbuh cepat dengan presentase sel cukup tinggi dan memiliki tingkat pertumbuhan 100%. Sejak tahun 1955 lembaga kanker nasional Amerika (NCI/*National Cancer Institute*) menggunakan lini sel L1210 untuk penapisan awal zat antikanker, zat-zat aktif terhadap lini sel L1210 kemudian diuji *in vivo* pada tikus yang diinokulasi dengan tumor. Program penapisan yang dilakukan NCI berhasil menguji aktivitas 40.000 senyawa. Senyawa yang menunjukkan aktivitas terhadap lini sel L1210 diuji lebih lanjut terhadap suatu panel uji sel tumor tikus sebelum dilakukan uji klinik. Selanjutnya NCI menggunakan suatu desain ia penapisan awal untuk mendeteksi aktivitas suatu zat anti tumor berdasarkan model seleksi dari beberapa tumor padat pada tikus. Aktivitas sitotoksik merupakan kemampuan sampel uji dalam menghambat pertumbuhan sel dan dinyatakan dalam presentase. Presentase penghambatan ini dikenal dengan *Inhibitory Concentration Fifty* (IC₅₀). IC₅₀ adalah konsentrasi sampel uji yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebanyak 50% setelah masa inkubasi selama 48 jam. IC₅₀ ditentukan sebagai ukuran aktivitas sitotoksik dari ekstrak suatu bahan alam. Pada umumnya, aktivitas sitotoksik suatu ekstrak terhadap sel kanker dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin kuat daya rusak terhadap sel kanker. Perhitungan terhadap nilai IC₅₀ dihitung dari kurva regresi linier antara log konsentrasi sampel uji dengan nilai probitaktivitas penghambat sel kanker. Suatu ekstrak dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker apabila memiliki nilai IC₅₀ ≤ 50 µg/ml (57,58), sehingga ekstrak tersebut dapat diuji lebih lanjut bioaktivitasnya terhadap sel kanker manusia.

K. LANDASAN TEORI

Studi awal kandungan antosianin pada buah Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) (4) dan merujuk pada kemiripan yang dimiliki Cantigi dengan *blueberry*, maka informasi mengenai penelitian *blueberry* sangat relevan untuk penelitian Cantigi termasuk penelitian bioaktivitasnya. (56,55). Untuk mengetahui potensi farmakologi Cantigi maka perlu dilakukan karakterisasi, untuk mengetahui apakah kandungan antioksidan terdapat pada bagian daunnya juga maka dilakukan uji antioksidan. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210 dari ekstrak maupun fraksinya dan dilakukan pengecekan profil kromatogram fraksi aktif menggunakan KLT dan KCKT sebagai kelengkapan informasi.

L. HIPOTESIS

1. Ekstrak daun Cantigi mempunyai aktivitas antioksidan.
2. Ekstrak daun Cantigi yang mempunyai aktivitas antioksidan tersebut mempunyai potensi sebagai antikanker pada uji pendahuluan.

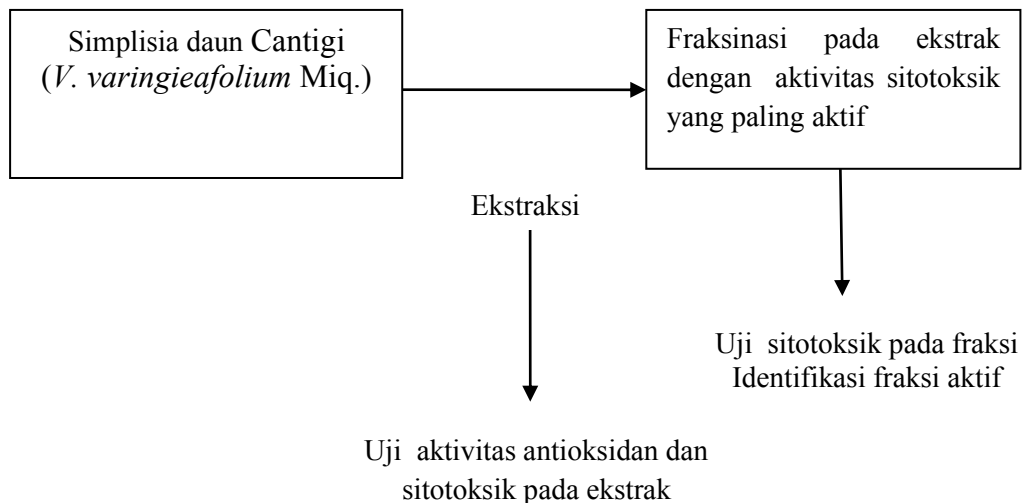
BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. METODE YANG DIGUNAKAN

Penelitian ini adalah penelitian eksplorasi untuk mengetahui karakteristik dan potensi farmakologi yang dimiliki oleh ekstrak daun Cantigi (*V. varingieaefolium* Miq.) sebagai antioksidan dan sitotoksik. simplisia daun Cantigi (*V. varingieaefolium* Miq.) dikarakterisasi dan kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antioksidan dengan metode hambatan radikal bebas DPPH dan uji sitotoksik terhadap sel leukemia L1210. Ekstrak yang paling aktif selanjutnya difraksinasi menggunakan kromatografi kolom agar diperoleh fraksi-fraksi yang lebih murni, kemudian masing masing diuji kembali aktivitas antioksidan dan uji sitotoksik terhadap sel leukemia L1210. Fraksi yang paling aktif aktivitasnya diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer *Fourier-Transform Infra Red* (FTIR) dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GCMS).

B. KERANGKA KONSEP



C. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

	Yang diukur	Output	Satuan
Variasi konsentrasi ekstrak	% hambatan radikal bebas DPPH	Aktivitas antioksidan IC ₅₀	Ppm
Variasi konsentrasi ekstrak atau variasi konsentrasi fraksi	% hambatan pertumbuhan sel kanker	Aktivitas sitotoksik IC ₅₀	Ppm

D. JENIS PENELITIAN YANG DIGUNAKAN

Jenis penelitian ini adalah eksplorasi untuk mengetahui karakteristik dan potensi farmakologi yang dimiliki oleh ekstrak daun Cantigi (*V. varingieaefolium* Miq.) sebagai antioksidan dan sitotoksik.

E. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Laboratorium Kimia Bahan Kesehatan Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR)-BATAN Jakarta Selatan dan Laboratorium Pusat Studi Biofarmaka LPPM-IPB Bogor. Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan September sampai dengan Februari 2016.

F. OBYEK YANG DITELITI

Obyek dalam penelitian ini adalah daun Cantigi (*V. varingieaefolium* Miq.).

BAB IV

BAHAN, ALAT DAN PROSEDUR PENELITIAN

A. BAHAN DAN ALAT YANG DIGUNAKAN

1. Bahan

a. Bahan Penelitian

Vaccinium varingiaefolium Miq yang diperoleh dari kawasan sekitar kawah gunung Tangkuban Parahu, Bandung Utara dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong. Bagian dari tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun segar dari tumbuhan tersebut.

b. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah n-heksan, aseton, etil asetat, metanol, etanol teknis yang telah didestilasi, metanol p.a., kloroform p.a., DMSO p.a., silika gel (70-230 mesh), *sephadex*, lempeng KLT, H₂SO₄ 10% sebagai penampak noda pada KLT, *aquadest*, *aquabidest*, asam klorida p.a., asam borat, asam oksalat, asam asetat glasial p.a., asam sulfat p.a., benzen p.a., besi (III) klorida, aluminium klorida, etanol p.a., aseton p.a., asetat anhidrida p.a, natrium hidroksida, kalium dihidrogen fosfat, kalium ferisianida, asam trikloroasetat, dietil eter p.a., serbuk magnesium, serbuk seng, anisaldehyd, gelatin, natrium klorida, natrium sulfat anhidrat, Mayer LP, Dragendorff LP, Bouchardat LP, Molisch LP, DPPH, *quersetin*, sel leukemia L1210 dalam medium RPMI-1640, agar-agar, tryphan blue, *celite* 545, dan lempeng silika GF245.

2. Alat

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah blender, timbangan analitik, peralatan maserasi, penguap putar (*rotary evaporator*), peralatan kromatografi kolom, vial dan botol penampung

berbagai ukuran, pH meter, spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer infra merah (FTIR), GC-MS, KLT-Densitometer, alat-alat gelas, pipet mikro, oven, inkubator dan lemari pendingin.

B. PROSEDUR PENELITIAN

1. Determinasi tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong.

2. Pengumpulan dan Penyediaan bahan penelitian

Tumbuhan diperoleh dari kawasan sekitar kawah gunung Tangkuban Parahu, Bandung Utara. Daun cantigi (*Vaccinium varingiaefolium* Miq.) yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun segar dari tumbuhan tersebut sebanyak 5 kg, selanjutnya dilakukan sortasi untuk dipisahkan dari kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing sehingga dapat mengurangi jumlah pengotor yang ikut terbawa dalam bahan uji. Simplisia basah ini kemudian dicuci menggunakan air PAM dan diangin-anginkan hingga kering. Simplisia yang telah kering disortasi kembali dari kotoran-kotoran yang masih tertinggal, dihaluskan dengan blender, hingga didapat 1 kg serbuk simplisia, lalu serbuk simplisia disimpan dalam wadah bersih, kering dan terlindung dari cahaya.

3. Uji Makroskopis Simplisia

Kontrol kualitas simplisia dapat meliputi pemeriksaan secara makroskopik, mikroskopik, maupun cara kimiawi. Pemeriksaan secara makroskopik merupakan analisis sederhana mutu simplisia berdasarkan morfologi dan ciri organoleptik seperti bentuk, warna, ukuran, aroma, dan rasa. (34)

4. Susut Pengeringan Simplisia

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam cawan porselen yang sebelumnya telah dioven pada suhu 105°C selama 30 menit dan

sudah ditara, ditimbang seksama. Keringkan ekstrak pada suhu 105°C hingga diperoleh bobot konstan, penimbangan dilakukan setelah cawan dan ekstrak dimasukkan ke dalam eksikator hingga suhu kamar. (24)

$$\% \text{ SP} = \frac{(\text{bobot simplisia})_1 - (\text{bobot simplisia})_2}{\text{bobot simplisia}_1} \times 100\%$$

Keterangan :

(bobot ekstrak)₁ = bobot simplisia sebelum penetapan

(bobot ekstrak)₂ = bobot simplisia setelah penetapan

5. Kadar Air

Alat moisture analyzer di set pada suhu 105°C, dan otomatis langsung memeriksa ketika alat ditutup. Sebanyak 1,5 gram ekstrak dimasukkan dan di ratakan dalam mangkok alumunium foil, kemudian dimasukkan ke dalam alat. Pemanas halogen akan menyala dan memulai memanaskan ekstrak hingga bobot konstan, selama lampu halogen masih menyala maka berat ekstrak belum konstan, setelah lampu mati berat ekstrak sudah konstan dan dilayar akan ditampilkan kadar air dari ekstrak. (24)

6. Kadar Abu

a. Kadar abu total

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang seksama (W₁) dimasukkan dalam krus silikat yang sebelumnya telah telah dipijarkan dan ditimbang (W₀). Setelah itu ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan (dengan suhu dinaikkan secara bertahap hingga 600 ± 25°C hingga arang habis. Kemudian ditimbang hingga bobot tetap (W₂). (24)

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W₀ = bobot cawan kosong (gram)

W₁ = bobot ekstrak awal (gram)

W₂ = bobot cawan + ekstrak setelah diabukan (gram)

b. Kadar abu tidak larut asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu dididihkan dengan 25 ml asam sulfat encer selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut asam. Kemudian disaring dengan kertas saring bebas abu dan residunya dibilas dengan air panas. Abu yang tersaring dan kertas saringnya dimasukkan kembali dalam krus silikat yang sama. Setelah itu ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan (dengan suhu dinaikan secara bertahap hingga $600 \pm 25^\circ\text{C}$ hingga arang habis). (24)

Kemudian ditimbang hingga bobot tetap (W3).

$$\text{Kadar abu tidak larut asam} = \frac{(W_3 - C) - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong (gram)

C = bobot kertas saring (gram)

W1 = bobot ekstrak awal (gram)

W3 = bobot cawan + abu yang tidak larut asam (gram)

7. Kadar Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu

a. Kadar senyawa larut dalam air

Sejumlah 1 g ekstrak (W1) dimaserasi dengan 25 mL kloroform selama 24 jam, menggunakan labu ukur sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama. Kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara (W0) dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, kemudian panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap (W2). (24)

$$\text{Kadar Senyawa Larut Air} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong

W1 = bobot ekstrak awal

W2 = bobot cawan + residu yang dioven

b. Kadar senyawa larut dalam etanol

Sejumlah 1 g ekstrak (W1) dimaserasi dengan 25 mL etanol 96%, selama 24 jam dengan menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama. Kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol. Filtrat sebanyak 5 mL diuapkan dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara (W0) dengan cara didiamkan sampai pelarutnya menguap dan tersisa residunya, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap (W2).(24)

$$\text{Kadar Senyawa larut etanol} = \frac{W_2 - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = bobot cawan kosong

W1 = bobot ekstrak awal

W2 = bobot cawan + residu yang dioven

8. Uji Mikrobiologi

a. Total mikroba (*Total Plate Count*)

Ditimbang 1 g dilarutkan dalam 10 mL air steril, sebanyak 1 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pengencer. Selanjutnya dilakukan pengocokan hingga homogeny dengan vortex. Pengenceran dan pemupukan dilakukan hingga tingkat pengenceran 10^{-2} . Dari tiap-tiap pengenceran, dipipet secara aseptis 1 mL untuk dimasukkan ke dalam cawan petri steril (pemupukan) secara duplo dan ditambahkan media PCA (*Plate Count Agar*) steril sebanyak 15-20 mL.

Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau angka delapan. Setelah medium membeku, cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada incubator suhu 37°C selama 1 hari (24 jam). (37)

b. Koliform

Ditimbang 1 g dilarutkan dalam 10 mL air steril, sebanyak 1 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pengencer. Setelah itu

dilakukan pengocokan hingga homogeny dengan vortex. Pengenceran dan pemupukan dilakukan hingga tingkat pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya ke dalam cawan tersebut dimasukkan media Levine EMB agar cair yang telah ditambah asam tartarat steril 10% sebanyak 15-20 mL.

Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau angka delapan. Setelah medium membeku, cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada inkubator suhu 30°C selama 1 hari (24 jam). (37)

c. Kapang/Khamir

Ditimbang 1 g dilarutkan dalam 10 mL air steril, sebanyak 1 mL sampel diambil dan dimasukkan ke dalam 9 mL larutan pengencer. Setelah itu dilakukan pengocokan hingga homogen dengan vortex. Pengenceran dan pemupukan dilakukan hingga tingkat pengenceran 10^{-2} . Selanjutnya ke dalam cawan tersebut dimasukkan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) cair yang telah ditambah asam tartarat steril 10% sebanyak 15-20 mL.

Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroba secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau angka delapan. Setelah medium membeku, cawan petri diinkubasi dengan posisi terbalik pada inkubator suhu 30°C selama 2 hari (48 jam). (37)

9. Cemarkan Logam Berat

Pereaksi:

Larutan asam klorida. Tambahkan 500 ml HCl pa 37%, bj. 1,19 ke dalam 220 ml air suling.

Peralatan:

Neraca analitik dengan ketelitian 0,001 mg, terkalibrasi

Erlenmeyer 250 ml

Labu ukur 50 ml, terkalibrasi

Penangas listrik

Spektrofotometer serapan atom beserta kelengkapannya, terkalibrasi.

Cara Kerja:

- a. Timbang 1-5 g contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 25 ml larutan HCl (butir 4.3.2), kemudian panaskan sampai mendidih dan biarkan dalam keadaan tersebut selama 5 menit.
- b. Dinginkan larutan dan kemudian pindahkan ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif, tera dengan air suling, kocok dan saring menggunakan kertas saring Whatman No. 1.
- c. Buat larutan blanko dengan cara penambahan pereaksi yang sama seperti sampel.
- d. Bacalah absorbansi larutan deret standar, blanko dan sampel.
- e. Buat kurva kalibrasi dengan sumbu Y sebagai absorbansi dan sumbu X sebagai konsentrasi (ppm)
- f. Hitung kandungan logam dalam sampel.

Perhitungan:

Hitung kadar cemaran logam berat dari contoh uji dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Kandungan logam } (\mu\text{g/g}) = \frac{\mu\text{g logam/ml dari kurva kalibrasi} \times v}{m}$$

Keterangan :

V : volume pelarutan, dalam ml

m : bobot contoh, dalam gram

10. Pembuatan ekstrak

Sebanyak 500 mg serbuk daun Cantigi dimaserasi dengan 5 L pelarut *n*-heksan selama 24 jam. Maserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 45°C sampai diperoleh ekstrak kental *n*-heksan. Ampas *n*-heksan dimaserasi kembali berturut turut dengan pelarut etil dan etanol 95%. Ekstrak kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksan, etil asetat, aseton dan metanol yang

kemudian masing-masing ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap berat simplisia awal.

11. Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak

Masing-masing ekstrak dari daun Cantigi (ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan etanol 95%) dilarutkan dalam metanol p.a, lalu dibuat konsentrasi 1000 µg/mL sebagai larutan induk. Kemudian dibuat berbagai konsentrasi (25; 50; 100; dan 200 µg/mL) untuk masing-masing ekstrak yang diperoleh. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi dimana dalam tiap tabung reaksi ditambahkan 500 µL larutan DPPH 1 mM dalam metanol. Volume digenapkan sampai 2 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 515 nm.

Sebagai pembanding digunakan *quersetin* (konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/mL). Nilai IC₅₀ dihitung masing-masing dengan menggunakan rumus persamaan regresi.

a. Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH yang digunakan untuk optimasi panjang gelombang dibuat dengan cara menimbang seksama lebih kurang 5 mg serbuk DPPH, dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 50 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas untuk mendapatkan larutan DPPH 100 µg/mL. Sebanyak 2 mL larutan di atas dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas dan dihomogenkan sehingga untuk mendapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 20 µg/mL. Larutan ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 - 800 nm dan ditentukan panjang gelombang optimumnya.

b. Pembuatan Larutan DPPH (BM 394,32)

Sebanyak 3,9 mg DPPH ditimbang seksama, dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a, lalu disimpan dalam botol gelap. Untuk setiap pengujian, larutan dibuat baru.

c. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah metanol p.a. Pembuatan larutan blanko ini dilakukan dengan cara memipet 1500 μL metanol p.a, dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 500 μL larutan DPPH, dikocok sampai homogen, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

d. Pembuatan Larutan *Quersetin* Sebagai Pembanding

1) Pembuatan larutan induk *quersetin* konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sebanyak 1 mg *quersetin* ditimbang seksama, dilarutkan dalam 1 mL metanol p.a, lalu dikocok hingga homogen.

2) Pembuatan larutan seri *quersetin* 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Larutan induk *quersetin* sebanyak 10, 20, 30, 40 dan 50 μL dipipet kedalam 5 tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambah dengan metanol p.a sampai volume total 500 μL , ditambahkan 500 μL DPPH, dikocok hingga homogen, ditambahkan lagi 1 mL metanol p.a, dikocok kembali hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.

3) Pengukuran serapan

Larutan induk dan *quersetin* di atas diukur pada panjang gelombang 515 nm.

e. Persiapan Larutan Uji

Pembuatan larutan induk ekstrak konsentrasi 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ekstrak sebanyak 2 mg ekstrak ditimbang seksama, dilarutkan dalam 2 mL metanol p.a, lalu dikocok hingga larut dan homogen.

Pembuatan larutan seri ekstrak konsentrasi 5, 10, 20, dan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Larutan induk ekstrak sebanyak 10, 20, 40 dan 100 μL dipipet dan dimasukkan ke dalam 4 tabung reaksi, ditambahkan metanol p.a sampai volume 500 μL , ditambahkan 500 μL DPPH, dikocok hingga homogen, ditambahkan 1 mL metanol p.a sehingga volume total 2 mL, dikocok hingga homogen, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.

Pengukuran serapan

Larutan induk dan *quersetin* di atas diukur pada panjang gelombang 515 nm.

f. Penghitungan

Prosentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorban Blanko} - \text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Blanko}}$$

Prosentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi akan diperoleh, lalu persamaan $y = a + bx$ dapat ditentukan dengan membuat regresi linier dimana x adalah konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) dan y adalah prosentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapat dari nilai x setelah mengganti y dengan 50. Ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan kuat dilanjutkan pemurniannya.

12. Penapisan Fitokimia

Pada simplisia dan ekstrak dilakukan pemeriksaan kandungan kimia menggunakan beberapa pereaksi kimia antara lain pereaksi untuk alkaloid, flavonoid, gula, triterpenoid atau steroid, antrakuinon, saponin dan tanin.

a. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak dilarutkan dengan etanol 96%, lalu ditambahkan asam klorida encer 2 N. Filtrat yang diperoleh disaring dan diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Bouchardat LP, Dragendorff LP. Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif Dragendorff LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Hasil positif Bouchardat LP jika terbentuk endapan coklat sampai hitam.

b. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dengan 1 mL etanol 96%, lalu ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium P dan 5 tetes asam klorida pekat P. Terbentuknya warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, khalkon dan auron. Ekstrak dilarutkan dengan 1-2 ml etanol 96%, lalu 0,5 gram serbuk seng P dan 1 ml asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit lalu ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika dalam waktu 2 - 5 menit terbentuk warna merah intensif, itu menunjukkan adanya flavonoid. Ekstrak diuji diuapkan hingga kering, sisanya dibasahkan dengan aseton P, lalu ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan asam oksalat P. Secara hati-hati dipanaskan di atas tangas air dan hindari pemanasan yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 5 mL eter P. Perubahan warna diamati dengan sinar UV 366 nm. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning.

c. Identifikasi Total Flavonoid

Pereaksi:

Pereaksi HMT : Larutan heksametilentetramin 0.5% b/v

Larutan HCl : Larutan HCl 25%

Larutan asam asetat glacial : Larutan asam asetat glacial 5% v/v dalam metanol

Larutan AlCl₃ : Larutan AlCl₃ 2% dalam larutan asam asetat glacial

Larutan Induk:

Ekstrak setara dengan 200mg simplisia dimasukkan ke dalam labu alas bulat, ditambah dengan 1 mL larutan HMT, 20 mL aseton dan 2 mL larutan HCl, dihidrolisis dengan cara refluks selama 30 menit. Campuran disaring menggunakan kapas, filtrat dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL. Residu direfluks kembali dengan 20 mL aseton selama 30 menit, disaring dan filtrat dicampur ke dalam labu tentukur 100 mL. Diambil 20 mL filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambah 20 mL air dan diekstraksi 3 kali masing-masing dengan 15 mL etil asetat. Fraksi etil

asetat dikumpulkan dan ditambah dengan etil asetat sampai 50 mL dalam labu tentukur.

Larutan blanko:

Diambil 10 mL larutan induk, ditambah dengan larutan asam aseta glacial sampai 25 mL dalam labu tentukur

Larutan sampel:

Diambil 10 mL larutan induk, ditambah dengan 1 mL larutan AlCl_3 dan larutan asam asetat glacial sampai 25 mL dalam labu tentukur

Perhitungan:

$$\% = \frac{C_p(As - Abs)}{(A_p - Abp)} \times 1.25 \times \frac{100}{\text{berat sampel}}$$

Keterangan

C_p : konsentrasi pembanding

As : Absorpsi sampel

Abs : Absorpsi blanko sampel

A_p : Absorpsi pembanding

Abp : Absorpsi blanko pembanding

d. Identifikasi Saponin

Ekstrak ditambahkan 5 ml *aquadest* panas, didinginkan, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit. Dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

e. Identifikasi Tanin

Ekstrak dilarutkan dengan *aquadest* panas, dikocok hingga homogen, lalu ditambah 5 tetes natrium klorida 10% dan saring. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai larutan percobaan. Larutan percobaan dibagi menjadi tiga bagian dan berturut-turut ditambahkan pereaksi gelatin 10%, natrium klorida-gelatin, dan besi (III) klorida 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan pada penambahan gelatin 10% dan natrium klorida-gelatin, sedangkan dengan penambahan besi (III) klorida 3% akan terbentuk larutan biru kehitaman atau hijau kehitaman.

f. Identifikasi Kuinon

Sebanyak 5 mL larutan ekstrak ditambahkan natrium hidroksida 1N. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

g. Identifikasi Steroid / Terpenoid

Sebanyak 1 mL larutan ekstrak ditambah 0,5 mL anhidrida asetat dan 0,5 mL CHCl_3 , ditambah H_2SO_4 pekat setetes demi setetes sebanyak 0,2 mL ke dasar tabung. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu.

13. Uji Sitotoksik Ekstrak Terhadap Sel Leukemia L1210

a. Pembuatan media uji aktivitas sitotoksik.

i. Larutan RPMI-1640

Sejumlah 10,4 gram RPMI-1640 yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 liter air steril.

ii. Larutan natrium bikarbonat

Sejumlah 1,3 gram natrium bikarbonat dilarutkan dalam 50 mL air steril.

iii. Larutan media

Sejumlah 25 mL larutan natrium bikarbonat dimasukkan kedalam labu tentukur 500 mL kemudian ditambah larutan RPMI-1640 sampai garis tanda.

iv. Larutan media uji

Untuk keperluan uji, sejumlah 15 mL *calf bovine serum* ditambahkan ke dalam 85 mL larutan media.

Semua pekerjaan dilakukan di ruangan steril. Sel leukemia L1210 disuspensikan ke dalam media yang telah mengandung *calf bovine serum* sehingga jumlah sel sekitar 2×10^5 sel/ml. Sel leukemia L1210 yang digunakan dalam penelitian telah tersedia di Laboratorium Bahan Kesehatan-Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) BATAN yang awalnya diperoleh dari *The Institute of Physical and Chemical Research Japan* (RIKEN).

b. Pengujian aktivitas sitotoksik

Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan terhadap *n*-heksan, etil asetat dan etanol dari daun Cantigi. Variasi konsentrasi bahan uji yang digunakan yaitu: 5, 10, 20, 40 dan 80 µg ekstrak/ mL. Media yang telah mengandung suspensi sel leukemia L1210 (2×10^5 sel/ml) dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's* sebanyak 1000 µl suspensi sel, dalam tiap sumuran lalu ditambahkan 10 µl nistatin dan penisillin pada masing-masing sumuran. Percobaan ini dilakukan duplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C dalam incubator 5% CO₂. Setelah 48 jam, dilakukan perhitungan sel dengan cara sebanyak 90 µl suspensi dimasukkan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran), ditambahkan 10 µl larutan 1% *tryphan blue*, dihomogenkan dan diambil sedikit lalu dialirkan ke dalam *haemocytometer Neubauer improved*, kemudian jumlah sel yang masih hidup dihitung dibawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai bulatan bening dengan titik biru inti sel di tengah bulatan, sedangkan sel mati terlihat sebagai bercak biru pekat yang bentuknya tidak teratur.

Presentase penghambatan zat uji terhadap pertumbuhan sel kanker dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = (1 - A/B) \times 100 \%$$

Keterangan:

A = Jumlah sel hidup dalam media yang mengandung zat uji

B = jumlah sel yang hidup dalam media yang tidak mengandung zat uji

Dalam presentase inhibisi diplotkan ke tabel probit untuk memperoleh nilai probit. Kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi (x) dan probit (y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = a + bx$. Pada persamaan tersebut dimasukkan nilai $y = 5$ (probit dari 50%), maka diperoleh nilai x (log konsentrasi), dengan antilog akan diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat perkembangbiakan sel (*in vitro*) sebanyak 50%, sedangkan LC₅₀ adalah konsentrasi zat yang membunuh 50% dari populasi larva yang diuji (*in vivo*). Menurut *American National Cancer Institute*, suatu ekstrak

dikatakan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/ml}$.

14. Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Aktif

Ekstrak aktif yang diperoleh kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Setiap fraksi ditotolkan sebanyak 20 μL dengan konsentrasi 10.000 $\mu\text{g/mL}$ pada lempeng silica gel GF₂₅₄, kemudian masing-masing fraksi dieluasi kloroform : metanol (10:1). Setelah itu bercak diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Lempeng kemudian disemprot dengan pereaksi penampak bercak serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga berbentuk bercak yang tetap.

15. Fraksinasi Ekstrak Paling Aktif Menggunakan Kromatografi Kolom

Ekstrak paling aktif difraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan adsorben silica gel 60 (70-230 mesh). Kolom yang akan digunakan terlebih dahulu dibersihkan, lalu dipasang pada statif dan dibilas dengan menggunakan aseton. Kolom dikeringkan dari sisa aseton. Kolom diberi kapas dan diisi dengan adsorben silica gel 60 (70-230 mesh) sebanyak kurang lebih 30 kali bobot sampel yang disuspensikan homogeny ke dalam eluen (*n*-heksan). Suspensi silica gel dimasukkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit, eluen dibiarkan mengalir sampai rata pada adsorben, lalu isi kolom dipadatkan dengan cara menggetarkan kolom. Sebanyak 1 gram ekstrak paling aktif dilarutkan dalam etanol, lalu ditambahkan *cellite* 545 sebanyak kurang lebih 4 kali bobot sampel. Campuran diaduk homogen, dipekatkan menggunakan *rotavapor* dan dikeringkan hingga menjadi serbuk. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam kolom, dan eluen dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam kolom. Proses pemisahan setiap fraksi dilakukan dengan system pengelusi sistem landaian (gradien) dengan eluen fase gerak digunakan pelarut kloroform : metanol perbandingannya; 10:1, 8:1, 4:1. Setiap fraksi ditampung sebanyak 150 mL. Setiap fraksi yang

diperoleh dipekatkan kemudian divakum hingga diperoleh bobot konstan. Setiap fraksi dianalisis dengan KLT, fraksi-fraksi yang mempunyai pola bercak yang sama akan digabung. Fraksi-fraksi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210.

16. Analisis Kromatografi Lapis Tipis Fraksi-Fraksi

Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Setiap fraksi ditotolkan sebanyak 20 μL dengan konsentrasi 10.000 $\mu\text{g/ml}$ pada lempeng silika gel GF₂₅, kemudian masing-masing fraksi diekspansi dengan eluen yang sesuai. Setelah itu bercak diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Lempeng kemudian disemprot dengan pereaksi penampak bercak serum sulfat 1% dalam asam sulfat 10%, lalu dipanaskan di atas *hot plate* hingga berbentuk bercak yang tetap.

17. Uji Analisis Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210

Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan pada fraksi-fraksi dari sampel kontrol yang dibuat dengan variasi konsentrasi yang lebih kecil yaitu 1, 2, 4, 8, dan 16 $\mu\text{g/ml}$ karena senyawa terkandung setelah fraksinasi jenisnya lebih sedikit dan tidak saling menurunkan efektifitas dari fungsi senyawa tersebut sehingga daya sitotoksiknya lebih besar terhadap sel leukemia L1210 dibandingkan dengan ekstrak paling aktifnya. Media yang telah mengandung suspensi sel kanker dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's* sebanyak 1000 μL . Percobaan dilakukan duplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada 37°C dalam incubator 5% CO₂. Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer* Neubauer improved dibawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai bulatan bening dengan titik biru inti sel ditengah bulatan, sedangkan sel mati terlihat sebagai bercak biru pekat yang bentuknya tidak teratur. Perhitungan nilai IC₅₀ untuk memperoleh fraksi yang aktif.

18. Analisis Dengan KLT-Densitometer

Ekstrak paling aktif dan fraksi paling aktif daun cantigi ditotolkan masing-masing dengan volume 20 μL dan konsentrasi 10.000 $\mu\text{g/mL}$ pada lempeng silica gel GF₂₅₄, kemudian dieluasi dengan kloroform:methanol (10:1) untuk ekstrak aktif dan *n*-heksan:etil asetat (2:1) untuk fraksi aktif pada lempeng yang berbeda. Kemudian hasil eluasi dianalisis dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum 254 nm untuk ekstrak aktif dan 366 nm untuk fraksi aktif.

C. CARA PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA

Data yang diperoleh dari hasil uji nilai IC₅₀ dianalisis berdasarkan pada grafik fungsi linear log konsentrasi zat uji dengan nilai probit dari aktivitas penghambatan.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. DETERMINASI TANAMAN

Hasil determinasi menyatakan tumbuhan yang digunakan merupakan *Vaccinium varingiaefolium* Miq. yang merupakan suku Ericaceae. Hasil tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2.

B. PENGUMPULAN BAHAN

Daun Cantigi (*V. Varingiaefolium* Miq.) diperoleh dari kawasan hutan Taman Wisata Alam Gunung Takuban Parahu Bandung Utara, Jawa Barat. Bagian dari tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda segar dari tumbuhan tersebut.

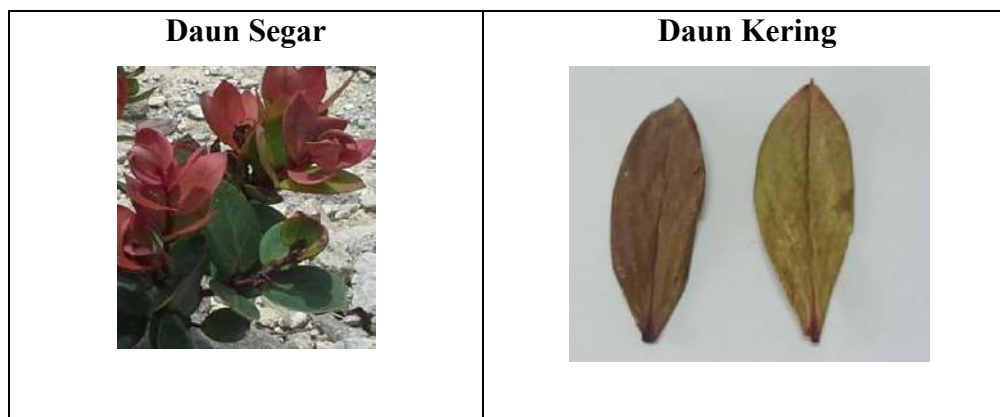
C. KARAKTERISASI SIMPLISIA

1. Uji makroskopik

Pada uji makroskopik dilakukan pengamatan secara langsung terhadap daun Cantigi (*V. Varingiaefolium* Miq.) untuk melihat morfologi daun tersebut. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Tabel V.1 dan Gambar V.1.

Tabel V.1. Morfologi Daun Cantigi

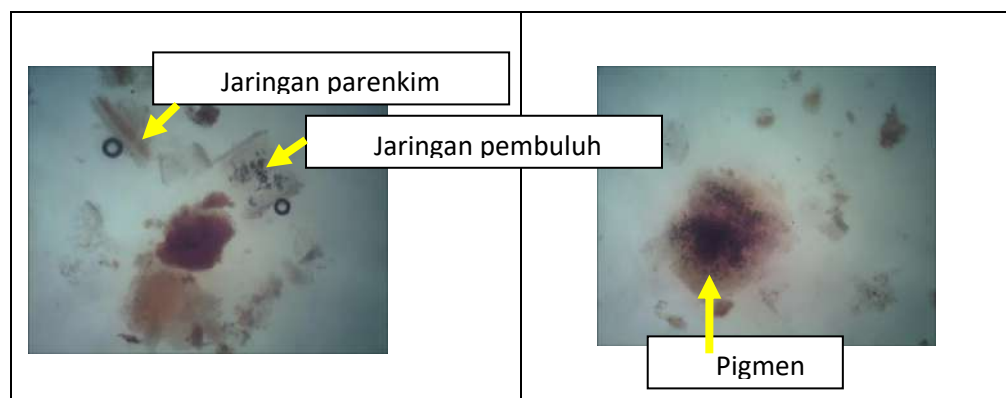
No.	Spesifikasi	Keterangan
1	Warna daun muda	Merah
2	Permukaan	Agak kasar
3	Ukuran rata-rata	Panjang 2,5 cm, lebar 1 cm
4	Ujung daun	Runcing
5	Pangkal daun	Runcing
6	Tepi daun	Rata
7	Susunan tulang daun	Bertulang melengkung
8	Jumlah helai daun	Tunggal
9	Bentuk	Lonjong



Gambar V.1. Morfologi Daun Cantigi

2. Uji mikroskopik

Pada uji mikroskopik dilakukan pengamatan terhadap serbuk kering daun Cantigi (*V. Varingieafolium* Miq.) dengan pelarut kloralhidrat dan menggunakan pembesaran 100 kali. Hasil pengamatan tersebut dapat dilihat pada Gambar V.2.



Gambar V.2. Mikroskopik Serbuk Simplisia Daun Cantigi

3. Pengujian Parameter Spesifik

Pengujian parameter spesifik meliputi identitas dan organoleptik (warna, rasa, bau, dan bentuk) simplisia. Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada Tabel V.2.

Tabel V.2. Hasil Pengujian Parameter Spesifik Simplisia Daun Cantigi

No	Parameter	Hasil
1	Identitas: Nama latin Bagian yang digunakan	<i>Vaccinium varingiaefolium</i> Miq Daun
2	Organoleptik: Warna Bau Rasa Bentuk	Coklat kemerahan Aromatik Agak sedikit pahit Serbuk kering
3	Kadar sari larut air Kadar sari larut etanol	25,65 % 13,96 %



Gambar V.3. Simplicia Daun Cantigi

4. Pengujian Parameter Non Spesifik

Data hasil pengujian parameter non spesifik dapat dilihat pada Tabel V.3.

Tabel V.3. Hasil Pengujian Parameter Non Spesifik Simplisia Daun Cantigi

No	Parameter	Hasil	Teknik Analisis
1	Kadar air	8,18 %	Gravimetri
2	Kadar abu	3,85 %	
3	Kadar abu tak larut asam	0,08 %	

4	Mikroba: TPC Koliform Kapang/Khamir	< 10 kol/g Negatif Negatif	Cawan tuang
5	Cemaran Logam Berat: Pb Cd As Hg	Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi	AAS
6	Cemaran Aflatoksin: B1 B2 G1 G2 Aflatoksin total	Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi Tidak terdeteksi	HPLC
7	pH	3,78	pH meter

D. PEMBUATAN EKSTRAK

Serbuk simplisia daun Cantigi (*V. Varingieaefolium* Miq.) sebanyak 500 gram yang telah memenuhi persyaratan tersebut diatas selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat *n*-heksan, etil asetat dan etanol 95% masing-masing sebanyak 5L selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak 2x. Ekstrak hasil penyarian kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C. Hasil ekstraksi tersebut masing-masing diperoleh rendemen dengan bobot 1,49% (ekstrak *n*-heksan), 2,51% (ekstrak etil asetat) dan 7,87% (ekstrak etanol). Ekstrak etanol memiliki persentase rendemen yang paling banyak jika dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksan dan etil asetat. Hal ini disebabkan pelarut etanol bersifat polar dan dikatakan sebagai pelarut universal, sehingga dalam ekstrak etanol tidak hanya senyawa polar saja yang tertarik, tetapi kemungkinan senyawa semipolar juga ikut tertarik. Data penimbangan dan rendemen ditunjukkan pada Tabel V.4.

Tabel V.4. Hasil Ekstraksi *n*-heksan, Etil asetat dan Etanol 95% Daun Cantigi

No.	Ekstrak	Warna	Bobot Ekstrak (gram)		Rata-rata	Rendemen (%)*
			Simplo	Duplo		
1.	<i>n</i> -Heksan	Hijau tua	3,8521	3,5936	3,7229	1,49
2.	Etil Asetat	Hijau	5,1486	7,4198	6,2842	2,51
3.	Etanol 95%	Merah tua	18,8605	20,4877	19,6741	7,87

* dihitung terhadap 250 gram serbuk kering (Lampiran 4)

E. KARAKTERISASI EKSTRAK ETIL ASETAT

1. Pengujian Parameter Spesifik

Pengujian parameter spesifik meliputi organoleptik (warna, rasa, bau, dan bentuk) ekstrak. Hasil pengujian tersebut dapat dilihat pada Tabel V.5.

Tabel V.5. Hasil Pengujian Parameter Spesifik Ekstrak Etil Asetat

Parameter	Hasil
Organoleptik:	
Warna	Hijau
Bau	Aromatik
Rasa	Agak sedikit pahit
Bentuk	Ekstrak kering

2. Pengujian Parameter Non Spesifik

Data hasil pengujian parameter non spesifik dapat dilihat pada Tabel V.6.

Tabel V.6. Hasil Pengujian Parameter Non Spesifik Ekstrak Etil Asetat

No	Parameter	Hasil	Teknik Analisis
1	Kadar air	5,61 %	Gravimetri
2	Kadar abu	0,37 %	
3	Kadar total flavonoid	1,034 %	Spektrofotometri
4	Kadar total fenol	12,52 %	
5	pH	2,87	pH meter
6	Mikroba: TPC Koliform Kapang/Khamir	Negatif Negatif Negatif	Cawan tuang

F. PENAPISAN FITOKIMIA

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa (*class of compound*) yang terkandung didalam simplisia dan ekstrak etil asetat yang diperoleh dari daun Cantigi (*V. varingieafolium* Miq.). Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak etil asetat tersebut menunjukkan bahwa pada ekstrak mengandung senyawa flavonoid, steroid, tanin dan triterpenoid, dimana kandungan komponen senyawanya relatif sama dengan simplisiannya. Hal tersebut dikarenakan etil asetat merupakan senyawa semi polar sehingga jenis senyawa yang dapat terdistribusi banyak. Hasil uji penapisan fitokimia ditampilkan pada Tabel V.7.

Tabel V.7. Hasil Penapisan Fitokimia

No	Kandungan Senyawa	Simplisia	Ekstrak Etil Asetat	Teknik Analisis
1	Alkaloid	-	-	Visualisasi warna
2	Flavonoid	+	+	
3	Quinon	-	-	
4	Saponin	+	-	
5	Steroid	+	+	
6.	Tanin	+	+	
7.	Triterpenoid	+	+	

Ket: Flavonoida (+) ; Terbentuk warna kuning jingga
Tanin (+) ; Terbentuk warna kehitaman
Saponin (+) ; Terbentuk buih stabil
Triterpenoid (+) ; Terbentuk warna merah/ungu
Steroid (+) ; Terbentuk warna hijau/biru

G. UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN TERHADAP EKSTRAK

Uji antioksidan ekstrak dilakukan pada ketiga yang dihasilkan dari ekstraksi diatas yaitu ekstrak n-heksan, etil asetat dan etanol. Uji ini dilakukan karena sifat antioksidan dari suatu senyawa memiliki kaitan dengan berbagai penyakit yang disebabkan oleh stress oksidatif. Sifat antioksidan dari suatu senyawa dapat ditentukan dengan menggunakan uji peredaman radikal bebas (DPPH) dengan vitamin C dan kuersetin sebagai kontrol positif. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak ditunjukkan pada Tabel V.8

Tabel V.8. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-Heksan, Etil Asetat dan Etanol Daun Cantigi Menggunakan Metode DPPH

No	Sampel	Konsentrasi (ppm); n=2	Persamaan regresi	Nilai IC ₅₀ (ppm)	Nilai rata-rata IC ₅₀ (ppm)
1.	Vitamin C	0;0,3125;0,625;1,25;2,5;5;10;20	$y = 25,79\ln(x)+25,43$	2,59	2,76
			$y = 26,62\ln(x)+21,42$	2,93	
2.	Kuersetin	0;0,3125;0,625;1,25;2,5;5;10;20	$y = 22,50\ln(x)+38,27$	1,68	1,73
			$y = 22,98\ln(x)+36,70$	1,78	
3.	Ekstrak <i>n</i> -Heksan	0;31,25;62,5;125;250;500;1000;2000	$y = 0,017x + 1764$	1903,53	1726,35
			$y = 0,024x + 12,82$	1549,17	
4.	Ekstrak Etil asetat	0;1,5625;3,125;6,25;12,5;25;50;100	$y = 0,722x + 6,654$	60,04	56,75
			$y = 0,801x + 7,171$	53,47	
5.	Ekstrak Etanol	0;1,5625;3,125;6,25;12,5;25;50;100	$y = 22,21\ln(x)-11,92$	16,25	15,62
			$y = 20,88\ln(x)-6,535$	14,99	

Keterangan : n adalah jumlah pengulangan eksperimen

*Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5

Tabel V.8 terlihat bahwa aktivitas antioksidan sangat kuat dimiliki oleh ekstrak etanol, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan kuat sedangkan ekstrak *n*-heksan memiliki aktivitas antioksidan yang lemah. Ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, hal tersebut dikarenakan senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya kemungkinan adalah senyawa-senyawa polar yang memiliki banyak gugus hidroksi. Sedangkan pada ekstrak *n*-heksan adalah ekstrak dengan aktivitas antioksidan lemah, hal tersebut dikarenakan dalam ekstrak tersebut kemungkinan hanya terdapat senyawa-senyawa dari golongan asam lemak sehingga cenderung memiliki aktivitas antioksidan yang rendah.

Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang cukup kuat. Aktivitas antioksidan tersebut dikarenakan dalam ekstrak etil asetat memiliki komponen

senyawa yang cukup beragam dari senyawa semi polar sampai dengan senyawa polar.

H. UJI SITOTOKSIK EKSTRAK DAUN CANTIGI TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210

Uji aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel leukemia L1210 dilakukan pada ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol dari daun Cantigi. Uji ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak mana yang memiliki potensi sebagai antikanker ditunjukkan dengan nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Hasil uji sitotoksik diperoleh dari % inhibisi kemudian dikonversi menjadi nilai probit yang tertera pada Lampiran 6. Kemudian ditampilkan dalam bentuk grafik hubungan antara log konsentrasi yang tertera pada Lampiran 8. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak ditunjukkan pada Tabel V.9.

Tabel V.9. Hasil Uji Sitotoksik Ekstrak *n*-Heksan, Etil Asetat dan Etanol Daun Cantigi Terhadap Sel Leukemia L1210

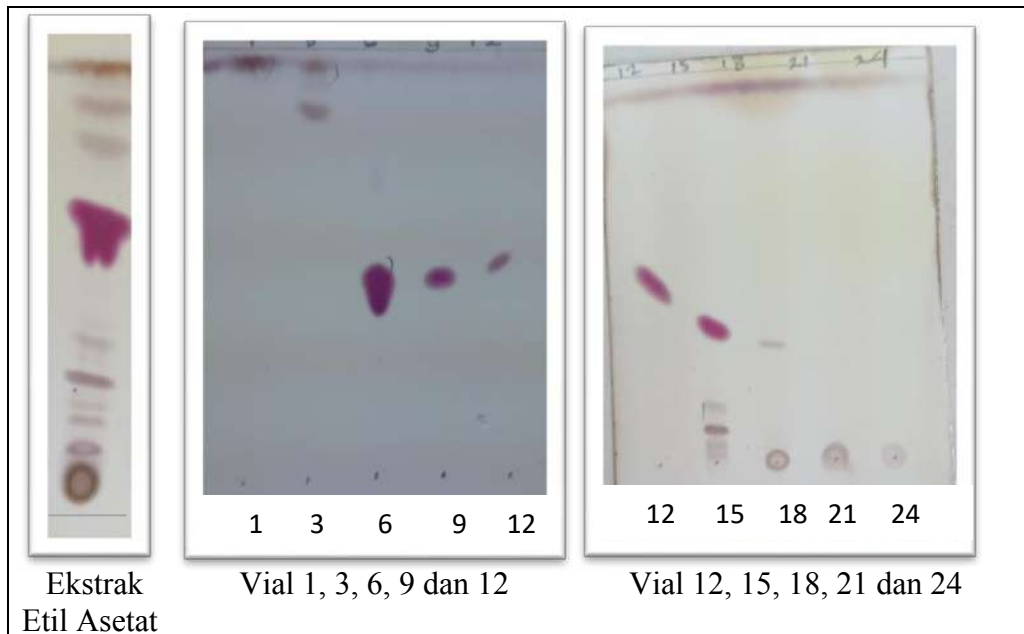
No	Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persamaan regresi	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Doxorubicin	K-; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32	$y = 0,418x + 5,363$	0,14
2.	Ekstrak <i>n</i> -Heksan	K-,5, 10, 20, 40, 80	$y = 1,069x + 3,820$	12,67
3.	Ekstrak Etil asetat	K-,5, 10, 20, 40, 80	$y = 0,883x + 4,188$	8,29
4.	Ekstrak Etanol	K-,5, 10, 20, 40, 80	$y = 0,840x + 4,144$	10,42

Dari hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap ketiga ekstrak daun Cantigi kontrol menunjukkan bahwa ekstrak-ekstrak tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210, hal ini ditunjukkan dari nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Ekstrak etil asetat merupakan ekstrak paling aktif yang mampu menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dengan nilai IC_{50} paling kecil yaitu $8,29 \mu\text{g/mL}$.

I. FRAKSINASI EKSTRAK ETIL ASETAT

Ekstrak etil asetat ditetapkan sebagai ekstrak yang paling aktif, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom. Pemisahan tersebut menggunakan fase diam silika gel 60 (0.063-0.2 mm) dan fase gerak yang digunakan adalah Kloroform : Metanol dengan metode gradien dari 10:1, 8:1, dan 4:1. Setelah dipekatkan dan

digabungkan berdasarkan pola bercak analisis KLT pada Gambar V.4 diperoleh 4 fraksi yaitu F1 sampai dengan F4. Hasil tersebut tertera Tabel V.10.

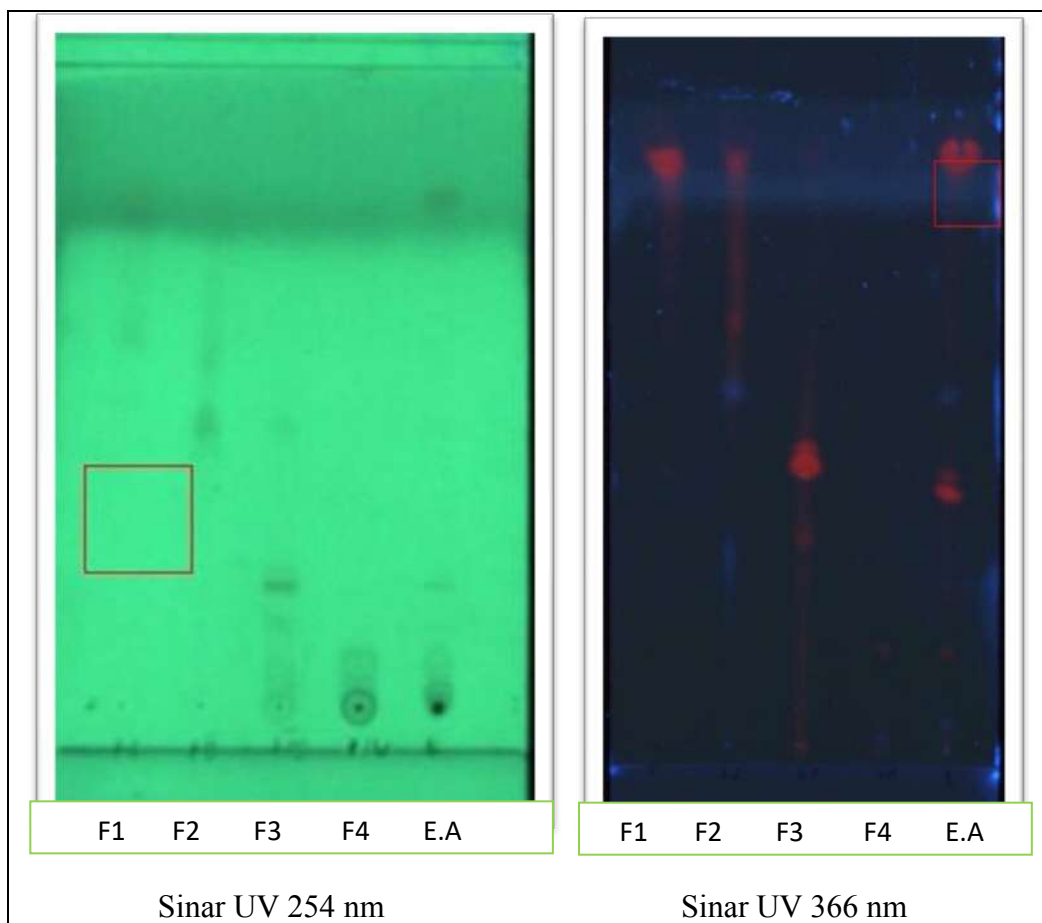


Gambar V.4. Kromatogram Hasil Fraksinasi

Keterangan:

- | | |
|-----------------|---|
| Fase diam | ; Silica gel GF 254 |
| Fase gerak | ; Fraksi 1 (Vial 1- 4) kloroform:metanol = 10:1 |
| | Fraksi 2 (Vial 5 - 13) kloroform:metanol = 10:1 |
| | Fraksi 3 (Vial 14 - 17) kloroform:metanol = 8:1 |
| | Fraksi 4 (Vial 18- 24) kloroform:metanol = 4:1 |
| Penampak bercak | ; Serium Sulfat 1 % dalam Asam Sulfat 10 % |

Gambar V.4 dan V.5 , terlihat bahwa F2 memiliki bercak mayor (senyawa utama) pada Rf 0,36 dan 0,45 bercak berwarna merah ungu yang menunjukkan adanya kandungan senyawa triterpenoid dan tampak juga bercak berwarna biru pada sinar UV 366 nm yang menunjukkan adanya kandungan senyawa steroid. Namun, untuk memastikan jumlah bercak yang terbentuk dilakukan analisis lebih lanjut dengan KLT-Densitometer. Bobot dari masing-masing fraksi tertera dalam Tabel 10.



Gambar V.5. Kromatografi Lapis Tipis Fraksi 1- 4

Keterangan:

- EA = Ekstrak Etil Asetat
- F1 = Fraksi 1
- F2 = Fraksi 2
- F3 = Fraksi 3
- F4 = Fraksi 4
- Fase diam; Silica gel GF 254
- Fase gerak; kloroform:metanol = 10:1
- Panjang gelombang; 254 dan 366 nm

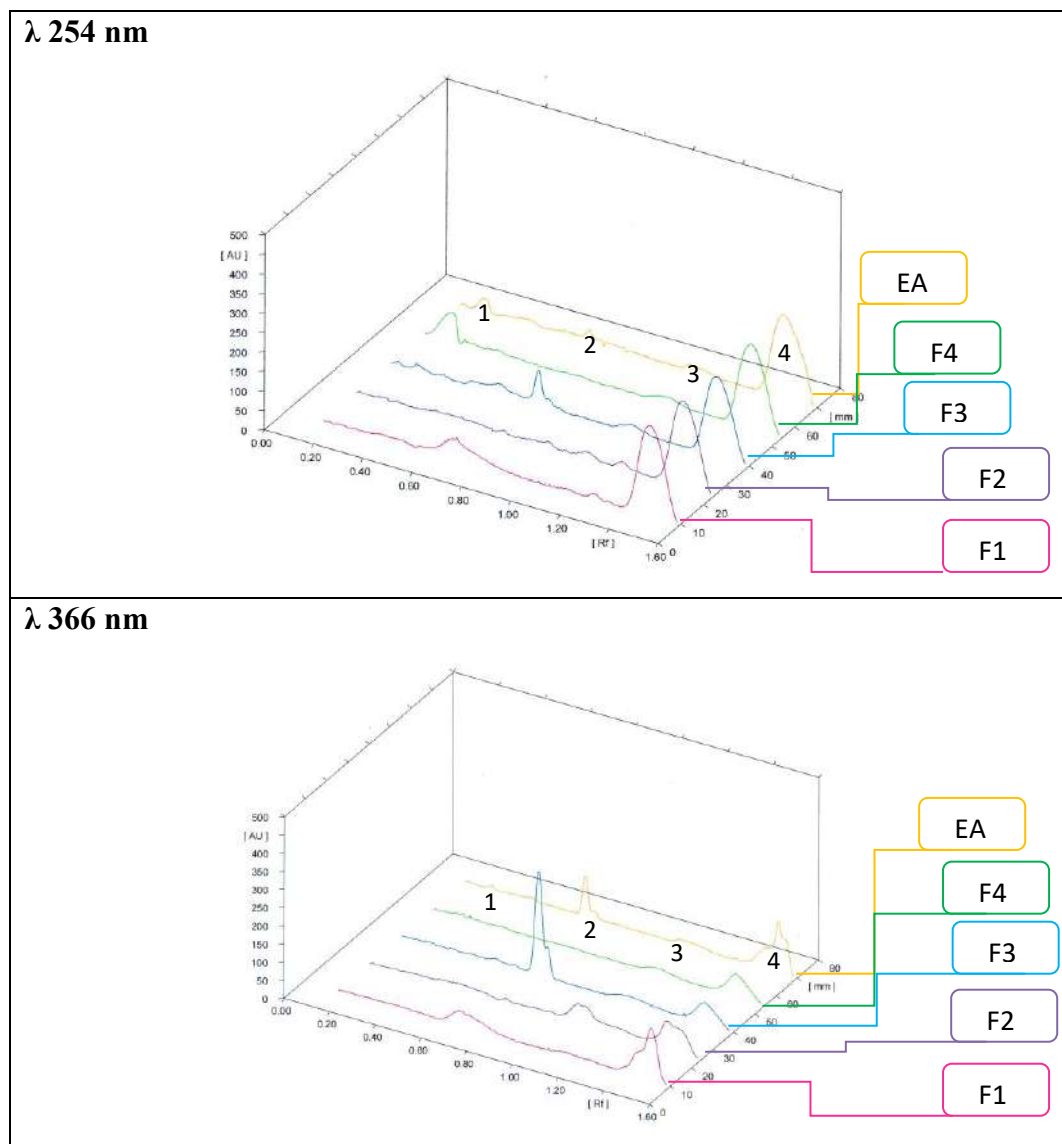
Tabel V.10. Bobot Masing-Masing Fraksi Ekstrak Etil Asetat Hasil Kromatografi Kolom

No.	Fraksi	Warna	Bobot (mg)	Rendemen (%)*
1.	F1	Hijau tua	50,78	5,08
2.	F2	Kuning	97,52	9,75
3.	F3	Hijau	76,5	7,65
4.	F4	Kuning muda	25,21	2,52

* dihitung terhadap 1000 mg ekstrak etil asetat

J. ANALISIS KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DENSITOMETRI FRAKSI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI

Hasil Kromatografi Lapis Tipis Desitometri dari fraksi 1 - 4 ekstrak etil asetat daun Cantigi pada panjang gelombang 254 dan 366 nm yang ditunjukkan pada Gambar V.6. Terdapat empat puncak utama pada ekstrak etil asetat, dimana pada puncak nomor 4 masing-masing fraksi memiliki tinggi dan luas puncak yang sama dengan induknya. Fraksi 1 memiliki 2 puncak utama yaitu puncak nomor 2 dan 4, fraksi 2 memiliki 2 puncak utama yaitu nomor puncak 3 dan 4, fraksi 3 memiliki 2 puncak utama yaitu puncak nomor 2 dan 4 dan fraksi 4 memiliki 2 puncak utama yaitu puncak nomor 1 dan 4.



Gambar V.6. Profil KLT-Densitometri Fraksi 1-4 Ekstrak Etil Asetat

Keterangan:

EA = Ekstrak Etil Asetat
F1 = Fraksi 1
F2 = Fraksi 2
F3 = Fraksi 3
F4 = Fraksi 4

K. UJI SITOTOKSIK FRAKSI – FRAKSI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI TERHADAP SEL LEUKEMIA L1210

Berdasarkan hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak bahwa ekstrak etil asetat yang paling aktif, maka selanjutnya dilakukan uji aktivitas sitotoksik fraksi terhadap sel leukemia L1210 dilakukan pada fraksi 1 sampai dengan fraksi 4 ekstrak etil asetat dari daun Cantigi. Uji ini bertujuan untuk mengetahui fraksi mana yang paling aktif memiliki potensi sebagai antikanker. Hasil uji aktivitas sitotoksik fraksi tersebut ditunjukkan pada Tabel V.11.

Tabel V.11. Hasil Uji Sitotoksik Fraksi Ekstrak Etil Asetat Daun Cantigi Terhadap Sel Leukemia L1210

No	Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persamaan regresi	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1.	Doxorubicin	K-, 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32	$y = 0,418x + 5,363$	0,14
2.	Fraksi 1	K-, 1, 2, 4, 8, 16	$y = 0,607x + 4,66$	3,62
3.	Fraksi 2	K-, 1, 2, 4, 8, 16	$y = 0,538x + 4,878$	1,69
4.	Fraksi 3	K-, 1, 2, 4, 8, 16	$y = 0,637x + 4,698$	2,98
5.	Fraksi 4	K-, 1, 2, 4, 8, 16	$y = 0,597x + 4,718$	2,96

Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap fraksi ekstrak etil asetat daun Cantigi menunjukkan bahwa fraksi 1 sampai dengan 4 tersebut aktif memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210, hal ini ditunjukkan dari nilai $\text{IC}_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Fraksi 2 merupakan fraksi paling aktif yang mampu menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 dengan nilai IC_{50} paling kecil yaitu $1,69 \mu\text{g/mL}$. Untuk mengetahui komponen senyawa kimia apa saja yang terkandung dalam fraksi 2, maka selanjutnya dilakukan pengujian dengan menggunakan GCMS.

L. ANALISIS KOMPONEN SENYAWA KIMIA FRAKSI 2 EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN CANTIGI DENGAN KROMATOGRAFI GAS SPEKTROMETER MASSA (GCMS)

Hasil analisis komponen senyawa kimia pada fraksi 2 ekstrak etil asetat daun Cantigi dengan menggunakan GCMS, didapatkan 15 senyawa dengan persen kualiti (derajat kemiripan) rata-rata lebih dari 90 yang tertera pada Tabel 12 dan puncak kromatogramnya dapat dilihat pada Gambar 7.

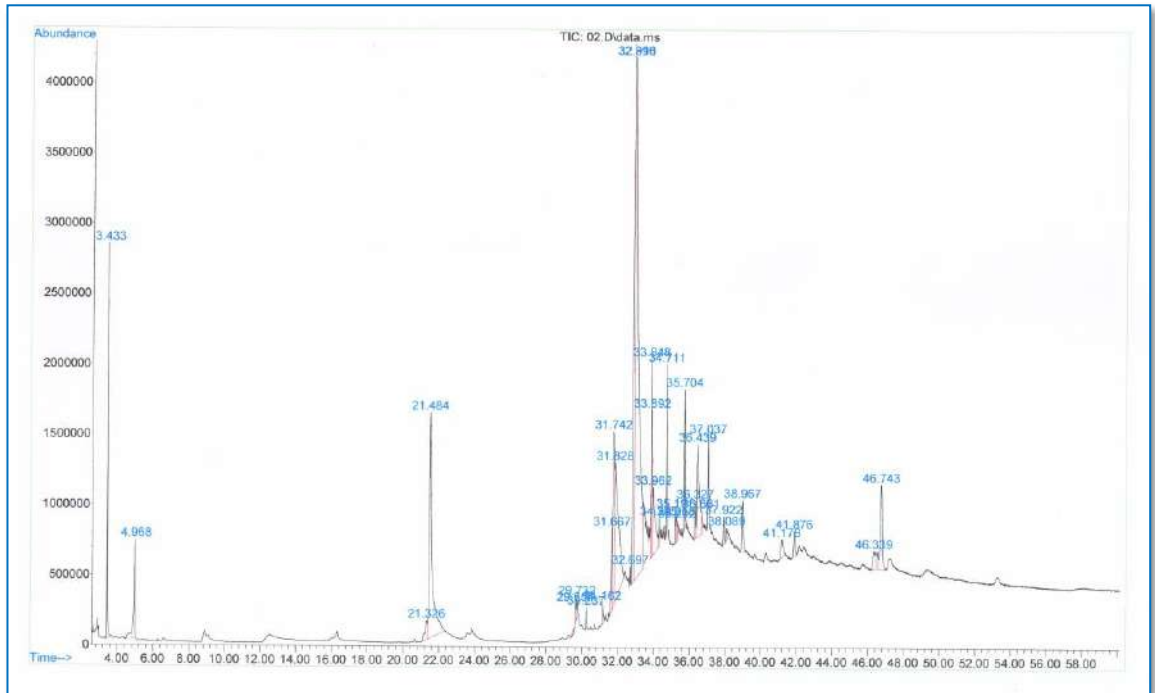
Tabel V.12. Hasil Analisis Komponen Senyawa Kimia Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat Daun Cantigi dengan GCMS

No.	Waktu Retensi (RT)	Quality	Senyawa	Kandungan (%)
1.	3,45	91	Ethanol, 2-Butoxy	2,43
2.	4,966	99	Cyclohexene, 1-Methyl-4-(1-Methylethenyl)	1,39
3.	21,487	96	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)	10,75
4.	31,740	96	n-Hexadecanoic acid	5,68
5.	31,830	98	Hexadecanoic acid	8,79
6.	32,892	98	9,12-Octadecadienoic acid	42,88
7.	33,850	94	Nonadecyl pentafluoropropionate	2,23
8.	33,892	99	Hexadecanoic acid, bis(2-ethylhe) ester	1,86
9.	33,961	95	Cyclopentadecane	2,62
10.	34,712	94	Cyclopentae, (4-octyldodecyl)	2,17
11.	35,705	96	1-Docosene	1,64
12.	36,436	93	Behenic alcohol	3,82
13.	37,036	94	1-Tricosene	1,43
14.	38,967	96	1-Nonadecene	1,17
15.	46,745	83	6H, 16H, 31H-5,9:15, 19-Dimethano-10, 14-Methano-26, 30-Nitrilo-5H, 25H-Dibenzo [B,S] [1,21,4,8,14,18]dioxatetraazacyclooctacosine - 34, 36-Dione 7,8,17,18-Tetrahydro-35-methoxy-1,3,21,23-tetramethyl	3,25

Keterangan:

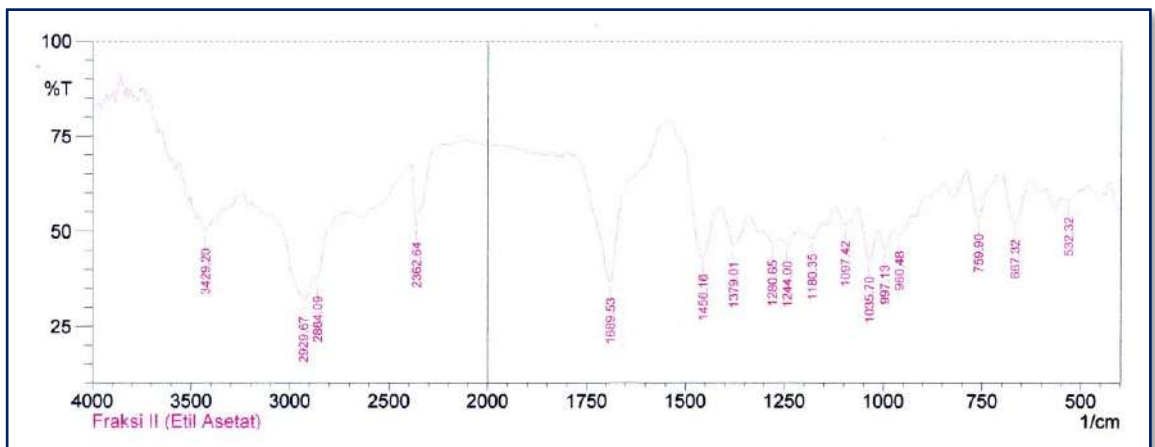
Metode GCMS (Gas Chromathography Spectrometri Mass)

Data yang diperoleh dibandingkan terhadap database library pada alat (BALITRO)



Gambar V.7. Profil Kromatogram Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat

**M. IDENTIFIKASI SENYAWA PADA FRAKSI 2 EKSTRAK ETIL ASETAT
DAUN CANTIGI DENGAN SPEKTRUM FTIR**



Gambar V.8. Spektrum FTIR Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat

Tabel V.13. Spektrum FTIR Fraksi 2 Ekstrak Etil Asetat

No	Frekuensi	Rentang Frekuensi	Tipeikatan	Tipe senyawa
1.	3429,20	3750 – 3000	O – H	Hidroksil
2.	1456,16 1244,00	1050 – 1300	C – O	Karboksil
3.	960,48	1000 – 675	= CH	Alkena
4.	759,90	900 – 690	C = C	Aromatic

Hasil spektrum IR dalam pellet KBR menunjukkan pada fraksi terdapat beberapa gugus fungsional yang tercermin pada pita-pita serapan. Pita serapan pada bilangan gelombang $3429,20\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus hidroksida (-OH) masing-masing dengan pola vibrasi ulur (*stretching; str*). Serapan pada $960,48\text{ cm}^{-1}$ (*str*) menunjukkan adanya alkena, dari serapan $1456,16$ dan $1244,00\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya karboksil (-CO), gugus cincin aromatic pada bilangan gelombang $759,90\text{ cm}^{-1}$.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

A. SIMPULAN

1. Simplisia daun Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) memiliki warna merah tua, aroma khas, dan rasa pahit, sedangkan kadar air 8,18%; kadar abu 3,85%; kadar abu tak larut asam 0,08%; kadar sari larut air 25,65%; kadar sari larut etanol 13,96% ; pH 3,78; mikroba negatif (TPC, Koliform dan Kapang/Khamir), tidak mengandung logam berat (Pb, Cd, As dan Hg) serta aflatoksin (B1,B2,G1,G2 dan aflaktosin total). Golongan senyawa yang terkandung didalam simplisia tersebut yaitu flavonoid, steroid, tannin, saponin, dan triterpenoid.
2. Hasil uji sitotoksik dengan menggunakan sel leukemia L1210 memberikan informasi bahwa ekstrak etil asetat merupakan ekstrak paling aktif menghambat pertumbuhan sel kanker karena memiliki IC_{50} paling kecil yaitu 8,29 $\mu\text{g/ml}$ sehingga dipilih untuk dianalisis lebih lanjut dan difraksinasi dan fraksi 2 merupakan fraksi paling aktif dengan nilai 1,69 $\mu\text{g/ml}$ karena suatu ekstrak dikatakan aktif jika memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dari 20 $\mu\text{g/mL}$.
3. Identifikasi fraksi 2 dengan metode GCMS menghasilkan rangkuman informasi yang menunjukkan bahwa fraksi tersebut mempunyai 15 senyawa. Persentasi kandungan tertingginya yaitu 42,88% senyawa 9,12-Octadecadienoic acid yang merupakan asam lemak tidak jenuh dengan ikatan rangkap berada pada atom 9 dan 12.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menetapkan struktur kimia dari fraksi 2 etil asetat hasil fraksinasi daun Cantigi (*V. varingiaefolium* Miq.) dengan Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

2. Perlu dilakukan juga uji aktivitas terhadap mencit (*in vivo*) sehingga dapat dilanjutkan untuk pembuatan formulasi sediaan obat herbal.
3. Mengisolasi dan menentukan struktur kimia dari fraksi lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. C.G.G.J.Van Steenis. 2010. Flora Pegunungan Jawa, Pusat penelitian Biologi, LIPI, Bogor, Indonesia, 71b:17-8.
2. Choesin DN, Amnah SS, Taufikurahman H. 2001. Ecological aspects of *Vaccinium varingiaefolium* growing in a stressed volcanic environment. Botanyconference.org/section3/47.
3. Endah Sulistyawati. 2006. Revealing Biodiversity and its Threat in Mount Papandayan - West Java, Indonesia. Final Report. Rufford Small Grant. ITB.
4. Hermawan W. 2009. Aktivitas Antifidan Ekstrak Daun Cantigi. *Jurnal Bionatura*, Vol. 11, No. 2, 137-145.
5. Sadiyah ER, Kodir RA. 2012. Studi Awal Kandungan Antosianin pada Buah Cantigi Ungu yang Berpotensi sebagai Suplemen Antioksidan. *Prosiding SnaPP*. 2012
6. Forney CF, Javorek SK, Jordan MA, and Van der Kloet SP. 2012. Floral volatile composition of four species of *Vaccinium*. *Botany* 90:5, 2012.
7. Pariman. 2012. Guided Imagery (Sebuah Pendekatan Psikosintesis) untuk Penurunan Depresi pada Penderita Kanker, Fakultas Psikologi, Universitas Diponegoro, Semarang.
8. Muaja AD, dkk. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *Jurnal MIPA Unsrat Online* (2) 115-118.
9. Farnsworth NR, Soejarto DD.1991. Global importance of medicinal plants. In: Akerele O, Heywood V, Synge H, editors. *The conservation of medicinal plants*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991. p. 25-51.
10. Cipak L, dkk. 2003. Effelu of flavonoids an glutathione and glutathione-related enzyme in cisplatinetreated L1210 Leukemia cell. *Neoplasma*, 50(6); 443-6.
11. Wenying Ren, dkk. Flavonoids Promising Anticancer Agents. Departement of Hematology, 2nd Hospital of Shanxi Medical University, Taiyun, Shanxi 030001, P.R. China.
12. Mudiana D, et al. Januari 2003. Vegetasi di Sekitar Danau Tiga Warna Taman Nasional Kelimutu Ende, Flores, NTT, *Biodiversitas*, vol. 4, no. 1. H. 35.
13. Widhiastuti R, et al. 2013. Beberapa aspek ekologi jamur endofit pada Mentigi (*Vaccinium varingiaefolium*) di sekitar kawah gunung Sinabung Sumatra Utara. *JSPL*, vol. 1, no. 1. H.12-18.


14. Setiawati, Wulan P. 2011. Studi Makroskopis, Mikroskopis dan Skrining Fitokimia Daun dan Batang *Vaccinium varingiaefolium* (Blume) Miq. L. Skripsi: Unair.
15. Primetta A. 2014. Phenolic Compounds in the Berries of the Selected *Vaccinium* species: The Potential for Authenticity Analyses. Dissertations in Forestry and Natural Sciences. No 134. The University of Eastern Finland.
16. Aminah, S. 1999. Beberapa aspek Morfologis dan Fisiologis *Vaccinium varingiaevolium* (Bl) Miq Di sekitar Kawah Gunung Tangkuban Perahu. Tesis Magister Bidang Khusus Ekologi, Program Studi Biologi Program Pasca Sarjana Institut Teknologi Bandung.
17. Hartini S. 2007. Keragaman Flora dari Monumen Alam Kersik Luway, Kalimantan Timur. Biodiversitas, vol. 8, no. 1. H. 67-72.
18. Harborne JB. 1996. Metode fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis tumbuhan. Cetakan kedua. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soediro. Penerbit ITB Bandung 1996
19. Tiwari P, et al. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica scientia*, Vol. 1(1), 2011, pp. 98-106.
20. De S, Dey YN, Ghosh AK. 2010. Phytochemical Investigation and Chromatography Evaluation of the different Extracts of Tuber of *Amorphaphallus Paeoniifolius* (Araceae). *Int J Pharm Biomed Res*, Vol. 1(5), 2010, pp. 150-157.
21. Sirait M. 2007. Penuntun Fitokimia dalam Farmasi. Bandung: Penerbit ITB.
22. Farnsworth NR. 1996. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 55 (3); h.255-65.
23. Santos AC, Beatrice QG, Alicia MM. and Estrada CQ. 1989. Phytochemical, Microbiological and Pharmacological Screening of Medicinal Plants. GHS Publ. Co.: Manila. p. 1517-1525
24. Depkes RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. h. 334, 336, 337.
25. Ciulei J. 1984. *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy. p. 11-26.
26. Robinson T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB. h. 152-196.

27. Astarina NWG, Astuti KW, Warditiani NK. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). Jurnal Farmasi Udayana. FMIPA.
28. Jones WP, Kinghorn AD. 2006. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. Natural Product Isolation. 2nd edition. Humana Press. New Jersey.
29. Puspitasari L, Swastini DA, Arisanti CIA. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). Jurnal Farmasi Udayana. FMIPA.
30. Marlina SD, Suryanti V, Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. Biofarmasi 3 (1): 26-31.
31. Departemen Kesehatan RI, 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Direktorat jendral Pengawasan Obat dan Makanan: Jakarta.
32. Sumarny R, Musir A, Ningrum. 2013. Penapisan Fitokimia dan Uji Efek Hipoglikemik Ekstrak Kacang Panjang (*Vigna unguiculata* subsp. *Unguiculata* L.) dan Ekstrak Tauge (*Vigna Radiata* L.) pada Mencit yang Dibeberani Glukosa Secara Oral. Seminar Nasional “Pengembangan dan Pemanfaatan Bahan Alam Indonesia untuk Meningkatkan Daya Saing Industri Farmasi Nasional”; Jakarta, 28-29 Juni 2013.
33. Alegantina S, Isnawati A. 2010. Identifikasi dan Penetapan Kadar Senyawa Kumarin dalam Ekstrak Metanol *Artemisia annua* L. secara Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri. Bul. Penelit. Kes. Vol. 38, No. 1, 2010. H. 17-28.
34. Peraturan Kepala BPOM RI No. 12/2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional.
35. Anonim. 2009. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 261/Menkes/SK/IV/2009 tentang Farmakope Herbal Indonesia. Jakarta:Depkes RI.
36. Voight,T. 1994. Buku Pelajaran teknologi Farmasi Edisi IV. Ahli Bahasa Noerono,S. Universitas Gajah Mada Perss: Yogyakarta, hal 564.
37. Departemen Kesehatan RI, 1995. Farmakope Indonesia Edisi IV. Direktorat jendral Pengawas Obat dan Makanan: Jakarta. Hal 7, 1221-1223.
38. Saifudin, Rahayu, Teruna, 2011. Standardisasi Bahan Obat Alam. Graha Ilmu: Yogyakarta.
39. Hostettman et al. 1986. Preparative Chromatography Techniques. Springer-Verag: Berlin.

40. Padmawinata K. 1991. Pengantar Kromatografi. Edisi kedua. ITB Press:Bandung. Terjemahan: Introduction to Chromatography, Gritter RJ et al. 1985. Holden Day, Inc.: USA.
41. Sastrohamidjojo H. 2005. Kromatografi. Liberty: Yogyakarta.
42. Padmawinata K, Soediro I. 1985. Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi. Penerbit ITB: Bandung. Terjemahan: Drugs Analysis by Chromatography and Microscopy. Stahl E. Michigan.
43. Still C et al. 1978. Rapid Chromatography Technique for Preparatives Separations with Moderate Resolution. J. Organic Chem. Vol. 43, No. 14.
44. Day RA, Underwood AL. 2002. Quantitative Analysis. 6th Ed. Prentice Hall: New York.
45. Kristanti AN et al. 2008. Fitokimia. Airlangga University Press: Surabaya.
46. Sundari I. 2010. Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Skripsi. FMIPA UNS: Surakarta.
47. Majors ER. 2003. The Cleaning and Regenerations of Reversed Phase HPLC Columns. J. LC-GC: Europe.
48. Rohman A. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar: Yogyakarta.
49. Prakash A. 2001. *Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories Analytical Progress. 19(2).
50. Istiani Y. 2010. Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isoflavon dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Tempe Berbahan Baku Koro Pedang (*Canavalia Ensiformis*). Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
51. Hostettman K. Assay Related To Cancer Drug Discovery. Dalam buku: Assay For Bioactivity. Vol. 6. Institut of Pharmacognosy and Phytochemistry University of Laysanne Switzerland. 1991.p.85.
52. Bulan R. Lantaden X_R Glikosida, Suatu Komponen Daun *Lantana Camara L.*, yang Sitotoksik Terhadap Lini Sel L1210. Bandung: Institut Teknologi Bandung; 2002. h. 3-6.
53. Allen FM. 1927. Blueberry leaf extract. Canadian Medical Association Journal, 17: 1539–1540.
54. Ehlenfeldt MK, Prior RL. 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2222–2227.

55. Nagao K, Higa K, Shirouchi B, Nomura S, Inoue N, Inafuku M, Yanagita T. 2008. Effect of *Vaccinium ashei* reade leaves on lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72: 1619–1622.
56. Skupień K, Oszmiański J, Kostrzewa-Nowak D, Tarasiuk J. 2006. In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Letters*, 236: 282–291.
57. Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J. 1999. pH dependent forms of red wine anthocyanidins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food*, 47: 67–70

Lampiran 1. Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi (SIMAKSI)



KEMENTERIAN LINGKUNGAN HIDUP DAN KEHUTANAN
DIREKTORAT JENDERAL KONSERVASI SUMBER DAYA ALAM DAN EKOSISTEM
BALAI BESAR KONSERVASI SUMBER DAYA ALAM JAWA BARAT
 Alamat : Jl. Gede Bage Selatan No. 117 Rancabolang - Gedebage Telp/Fax (022) 7567715 / (022) 7535107
 BANDUNG – JAWA BARAT 40613

SURAT IZIN MASUK KAWASAN KONSERVASI (SIMAKSI)
 Nomor : SI. 2192 /BBKSDA JABAR-2/2015

Dasar : 1. Permenhut No. P.02/Menhut-II/2007 tanggal 1 Februari 2007 yang telah diubah dengan Permenhut No. P.51/Menhut-II/2009 tanggal 27 Juli 2009 tentang Organisasi dan Tata Kerja UPT KSDA;
 2. Peraturan Direktur Jenderal Perlindungan Hutan dan Konservasi Alam No. P.7/IV-SET/2011 tanggal 9 Desember 2011 tentang Tata Cara Masuk Kawasan Suaka Alam, Kawasan Pelestarian Alam dan Taman Buru;
 3. Surat Pjs. Ketua Program magister Ilmu Kefarmasian Universitas Pancasila Nomor : 300/Magf/UP/IX/2015 Tanggal 1 September 2015, Perihal : Permohonan Izin Masuk Wilayah Konservasi.

Dengan ini memberikan izin masuk kawasan konservasi :



kepada : Ana Yulyana, S.Farm., Apt (NPM. 5413221046)
 Untuk : Melakukan Penelitian "Standarisasi Ekstrak Daun cantigi (*Vaccinium varingaefolium (Blume) Miq*) dan Uji Sitotoksik terhadap Sel Leukimia L1210
 Lokasi : CA/TWA Tangkuban Parahu.
 Waktu : 2 Oktober 2015 s/d 29 Februari 2016 (kegiatan tersebut dilaksanakan pada lokasi yang aman).

Dengan ketentuan :

- Sebelum memasuki lokasi wajib melapor kepada Kepala Bidang KSDA Wilayah II Soreang Cq. Kepala Seksi Konservasi Wilayah IV Purwakarta dan/atau petugas lapangan untuk menjelaskan rencana kegiatannya.
- Mahasiswa/Pelajar diatas, telah memenuhi persyaratan untuk peneanaan PNBP tarif Rp.0,- (Nol Rupiah) sesuai dengan Permenhut Nomor P.38/Menhut-II/2014 tanggal 4 Juni 2014 tentang Tata Cara dan persyaratan Kegiatan Tertentu Peneanaan Tarif Rp.0,00 (Nol Rupiah) di Kawasan Suaka Alam, Suaka Pelestarian Alam, Taman Buru, dan Hutan Alam.
- Meminta ijin atas penggunaan atau peminjaman sarana prasarana milik negara kepada Petugas lapangan secara tertulis.
- Didampingi petugas dari Bidang KSDA Wilayah II Soreang – Seksi Konservasi Wilayah IV Purwakarta, dengan beban tanggung jawab dari pemegang SIMAKSI ini.
- Segala resiko yang terjadi dan timbul selama berada di lokasi (luka ringan, luka berat, cacat dan meninggal dunia) sebagai akibat kegiatan yang dilaksanakan menjadi tanggung jawab pemegang SIMAKSI ini.
- Dalam proses kegiatannya dilarang memberikan perlakuan (makan, dll.) kepada satwa liar dan dilarang melakukan kegiatan mengambil, menebang, memiliki, merusak, memusnahkan, mengangkut dan memelihara tumbuhan dan satwa liar yang dilindungi undang-undang serta kegiatan-kegiatan lain yang dapat mengganggu keutuhan dan kelestarian kawasan konservasi sesuai dengan peraturan perundang-undangan.
- Tidak diizinkan mengambil dan mengangkut tumbuhan dan satwa liar tanpa dokumen yang sah sesuai dengan ketentuan Peraturan Pemerintah No. 8 Tahun 1999 tentang Pemanfaatan Tumbuhan dan Satwa Liar.
- Wajib mencantumkan logo Kementerian Kehutanan dan nomenklatur PHKA pada setiap hasil kegiatan serta menyerahkan laporan tertulis hasil kegiatan kepada Kepala Balai Besar KSDA Jawa Barat dengan tembusan kepada Sekretaris Direktorat Jenderal PHKA selambat-lambatnya dalam jangka waktu 1 (satu) bulan setelah selesai kegiatan.
- Komersialisasi hasil kegiatan dimaksud (pengandaan buku hasil kegiatan yang dijual kepada umum) harus seizin dari Sekretaris Direktorat Jenderal PHKA bagi peserta asing dan Kepala Balai Besar KSDA Jawa Barat bagi peserta dalam negeri.
- Sebelum dan selama pelaksanaan kegiatan, pemegang SIMAKSI agar berkoordinasi dengan Pihak Pemerintah Daerah, Aparat Keamanan dan instansi terkait serta mematuhi seluruh arahan dari instansi tersebut.
- Bagi pemegang SIMAKSI yang melanggar ketentuan sesuai dengan point 1 s.d 10 dikenakan sanksi pencabutan izin SIMAKSI dan dimasukkan dalam daftar hitam serta sanksi sesuai dengan ketentuan perundang undangan yang berlaku.
- SIMAKSI ini berlaku setelah pemohon membubuhkan meterai Rp. 6.000,- (*enam ribu rupiah*) dan menandatangani.

Demikian Surat Izin Masuk Kawasan Konservasi ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.



Pemegang SIMAKSI,

Ana Yulyana, S.Farm., Apt
(Mahasiswa Universitas Pancasila)

Dikeluarkan di : Bandung
 Pada Tanggal : 2 Oktober 2015

Pih, Kepala Balai Besar

Munarto, BScF, SP, MM.
NIP. 19620125 199102 1 001

Tembusan: Setelah dibubuhi meterai dan ditandatangani, dcopy oleh pemegang izin dan disampaikan kepada yth.

- Kepala Pusat Penelitian, Pengembangan dan Inovasi Lingkungan Hidup dan Kehutanan;
- Sekretaris Direktorat Jenderal Konservasi Sumber Daya Alam dan Ekosistem;
- Direktur Pemanfaatan Jasa Lingkungan Hutan Konservasi;
- Direktur Kawasan Konservasi;
- Direktur Konservasi Keanekaragaman Hayati;
- Kepala Balai Besar KSDA Jawa Barat (sebagai laporan);
- Kepala Bidang KSDA Wilayah II Soreang;
- Kepala Seksi Konservasi Wilayah IV Purwakarta;
- Kepala Resort KSDA Wilayah CA/TWA Tangkuban Parahu;
- Direktur Utama PT. GRPP;
- Ketua Program Magister Ilmu kefarmasian – Universitas Pancasila
- Yang bersangkutan.

Lampiran 2. Hasil Determinasi Tumbuhan Cantigi



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website: www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 30 November 2015

Nomor : 220/IPH.1.01/If.07/XI/2015
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). **Ana Yulyana, S.Farm**
NPM : 5413221046
Mhs. Univ. Pancasila
Srengseng Sawah, Jagakrsa
Jakarta - 12640

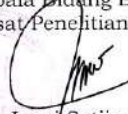
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

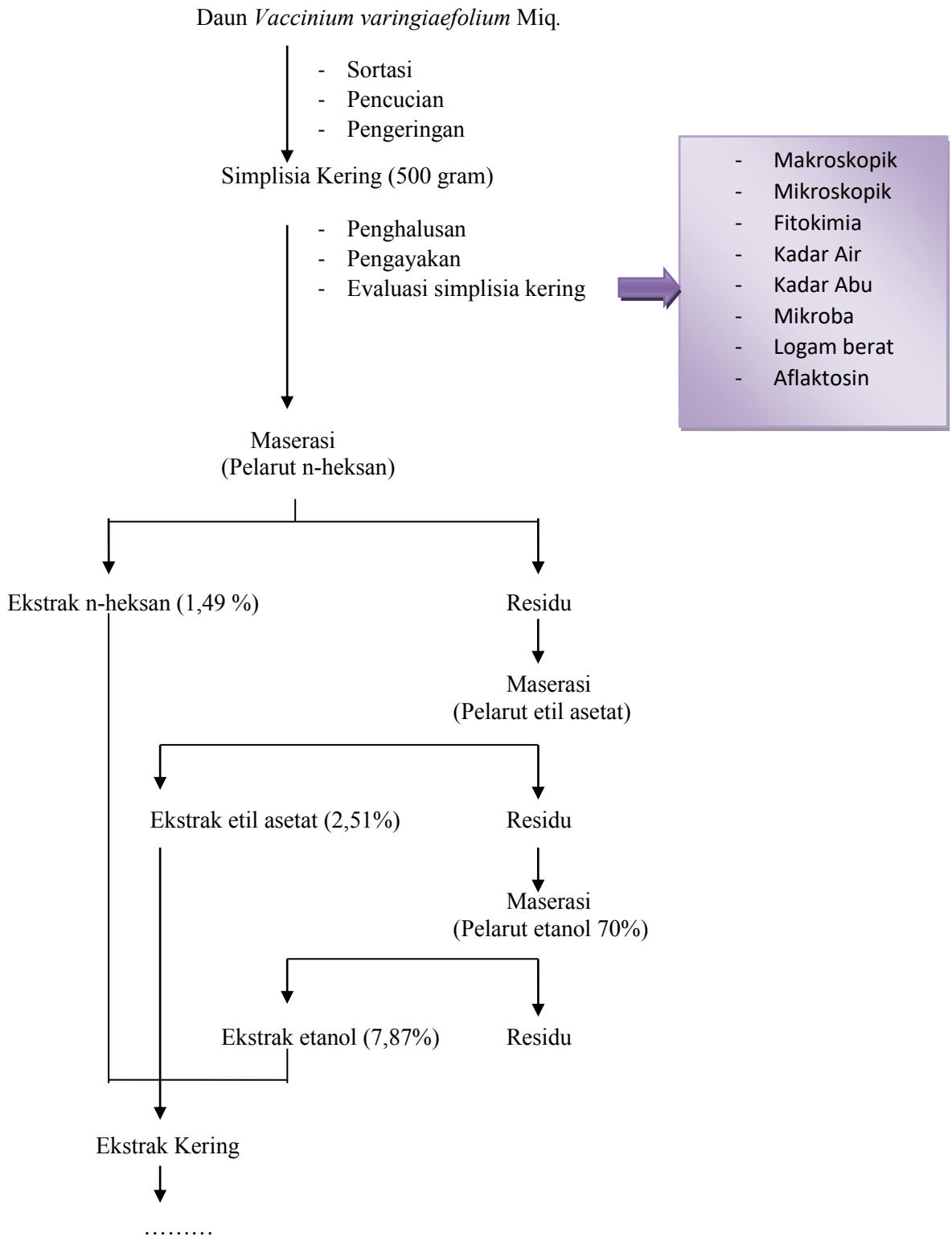
No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Cantigi	<i>Vaccinium varingiaefolium</i> Miq.	Ericaceae

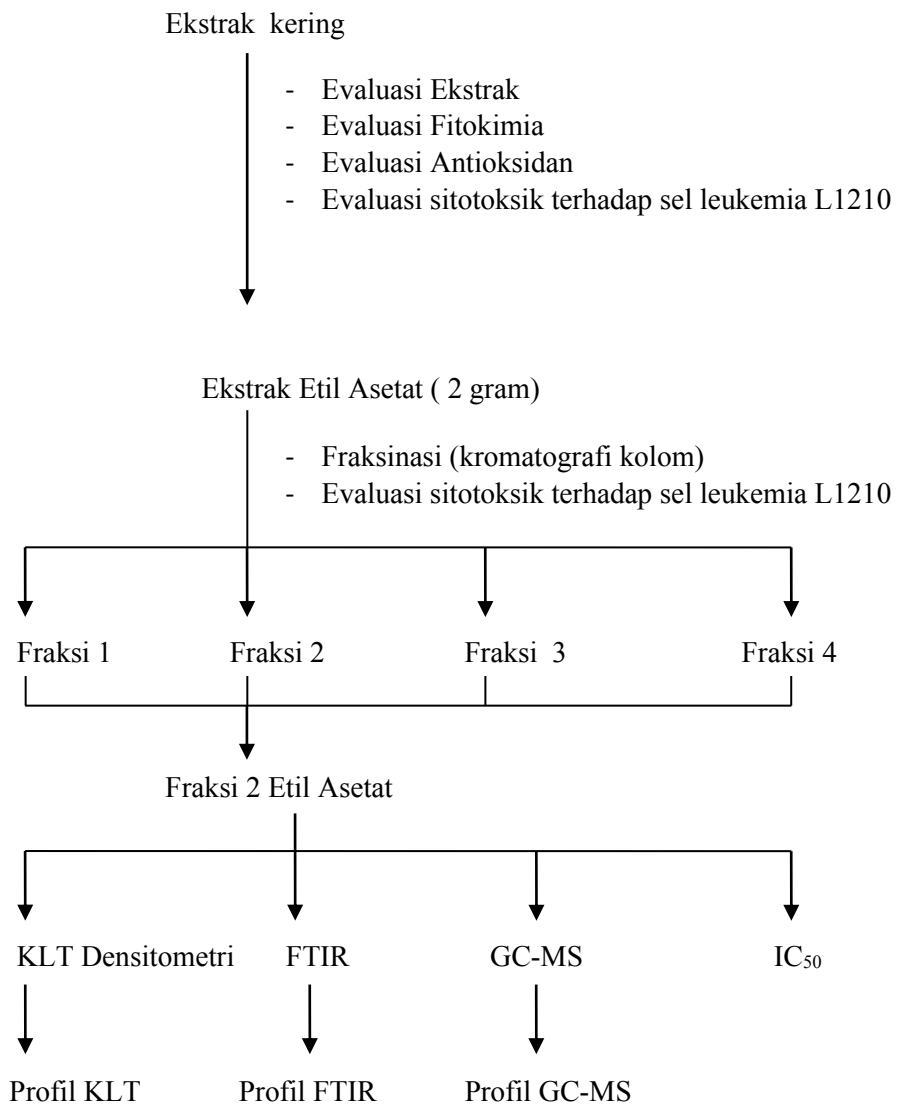
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Dr. Joeni Setijo Rahajoe
NIP. 196706241993032004

Lampiran 3. Skema Kerja





Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Hasil Ekstraksi *n*-heksan, Etil asetat dan Etanol 95% Daun Cantigi (*V. Varingiaefolium* Miq.)

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

1. Ekstrak *n*-Heksan

Bobot awal simplisia = 250 gram
Bobot ekstrak *n*-Heksan = 3,8521 gram (Simplo)
Bobot ekstrak *n*-Heksan = 3,5936 gram (Duplo)
Bobot rata-rata = 3,7229 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{3,7229}{250} \times 100\% \\ &= 1,49\% \end{aligned}$$

2. Ektrak Etil Asetat

Bobot awal simplisia = 250 gram
Bobot ekstrak etil asetat = 5,1486 gram (Simplo)
Bobot ekstrak etil asetat = 7,4198 gram (Duplo)
Bobot rata-rata = 6,2842 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{6,2842}{250} \times 100\% \\ &= 2,51\% \end{aligned}$$

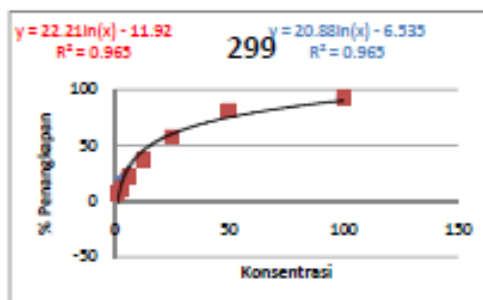
3. Ekstrak Etanol 95%

Bobot awal simplisia = 250 gram
Bobot ekstrak etil asetat = 18,8605 gram (Simplo)
Bobot ekstrak etil asetat = 20,4877 gram (Duplo)
Bobot rata-rata = 19,6741 gram

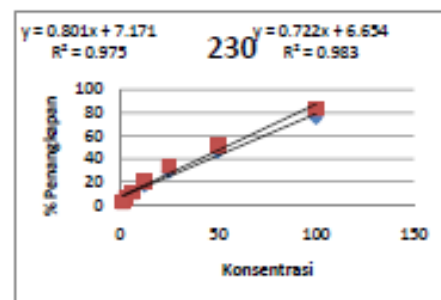
$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{19,6741}{250} \times 100\% \\ &= 7,87\% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

ppm	299 / XII / 15						230 / XII / 15							
	Abs			Abs terkoreksi		% penangkapan		Abs			Abs terkoreksi		% penangkapan	
	U1	U2	K-	U1	U2	U1	U2	U1	U2	K-	U1	U2	U1	U2
100	0.08	0.082	0.042	0.038	0.04	93.027523	92.66055	0.18	0.196	0.046	0.131	0.09	76.007326	83.516484
50	0.15	0.144	0.042	0.105	0.102	80.733945	81.284404	0.34	0.309	0.043	0.293	0.27	46.336996	51.282051
25	0.27	0.272	0.042	0.232	0.23	57.431193	57.798165	0.43	0.407	0.043	0.388	0.36	28.937729	33.333333
12.5	0.38	0.387	0.042	0.335	0.345	38.53211	36.687248	0.49	0.472	0.04	0.452	0.43	17.216117	20.879121
6.25	0.45	0.466	0.041	0.408	0.425	25.137615	22.018349	0.53	0.527	0.041	0.489	0.49	10.43956	10.989011
3.125	0.49	0.523	0.041	0.445	0.482	18.348624	11.559633	0.54	0.552	0.041	0.501	0.51	8.2417582	6.4102564
1.563	0.53	0.546	0.041	0.489	0.505	10.275229	7.3394495	0.57	0.572	0.041	0.531	0.53	2.7472527	2.7472527
0	0.56	0.585	0.04	0.519	0.545			0.58	0.587	0.041	0.538	0.55		



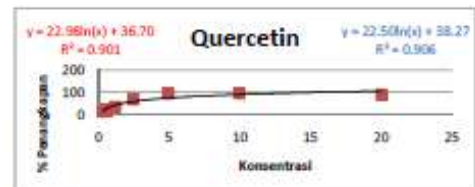
y	a	b	ln(x)	x
50	20.88	-6.535	2.7076149	14.993473
50	22.21	-11.92	2.7879334	16.247408
				15.62044



y	a	b	x
50	0.722	6.654	60.036011
50	0.801	7.171	53.469413
			56.752712

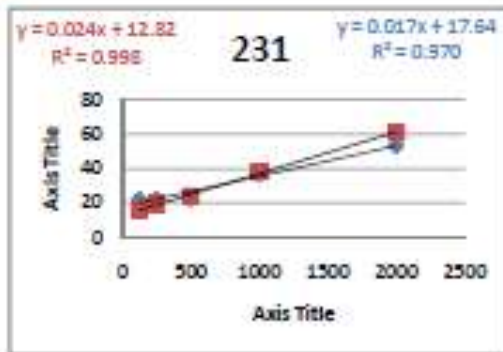
ppm	Quercetin						
	Abs			Abs terkoreksi		% penangkapan	
	U1	U2	K-	U1	U2	U1	U2
20	0.082	0.086	0.04	0.042	0.048	91.296307	90.456432
10	0.078	0.08	0.044	0.034	0.036	92.948058	92.53112
5	0.077	0.078	0.042	0.035	0.036	92.738589	92.53112
2.5	0.206	0.207	0.042	0.164	0.165	65.975104	65.787635
1.25	0.353	0.36	0.042	0.311	0.318	35.477178	34.024896
0.625	0.427	0.441	0.047	0.38	0.394	21.161826	18.257261
0.3125	0.483	0.472	0.042	0.421	0.43	12.855602	10.788382
0	0.503	0.523	0.041	0.462	0.482		

Quercetin



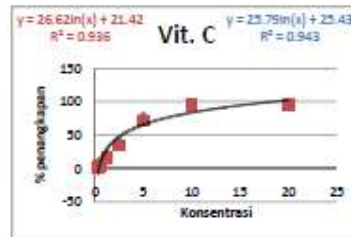
y	a	b	ln(x)	x
50	22.5	38.3	0.521	1.6843
50	22.98	36.7	0.579	1.7838
				1.7341

		231/XIV15						
		Abs			Abs		% penangkapan	
ppm		U1	U2	K-	U1	U2	U1	U2
2000	0.4	0.36	0.177	0.22	0.18	53.389831	61.228814	
1000	0.41	0.404	0.111	0.297	0.29	37.076271	37.923729	
500	0.44	0.432	0.073	0.365	0.36	22.669492	23.940678	
250	0.42	0.436	0.054	0.367	0.38	22.245763	19.067797	
125	0.42	0.444	0.048	0.369	0.4	22.033898	16.101695	
62.5	0.42	0.445	0.044	0.372	0.4	21.186441	15.042373	
31.3	0.46	0.513	0.041	0.419	0.47	11.228814	-1.18E-14	
0	0.51	0.512	0.04	0.471	0.47			



y	a	b	x
50	0.017	17.64	1903.529
50	0.024	12.82	1549.167
			1726.348

		Vit. C						
		Abs			Abs terkoreksi		% penangkapan	
ppm		U1	U2	K-	U1	U2	U1	U2
20	0.06	0.061	0.04	0.02	0.021	95.798319	95.588235	
10	0.06	0.065	0.042	0.021	0.023	95.588235	95.168067	
5	0.15	0.173	0.04	0.11	0.133	76.890756	72.058824	
2.5	0.33	0.35	0.04	0.291	0.31	38.865546	34.87395	
1.25	0.41	0.441	0.041	0.373	0.4	21.638655	15.966387	
0.625	0.47	0.493	0.041	0.424	0.452	10.92437	5.0420168	
0.313	0.5	0.506	0.04	0.458	0.466	3.7815126	2.1008403	
0	0.51	0.517	0.041	0.468	0.476			

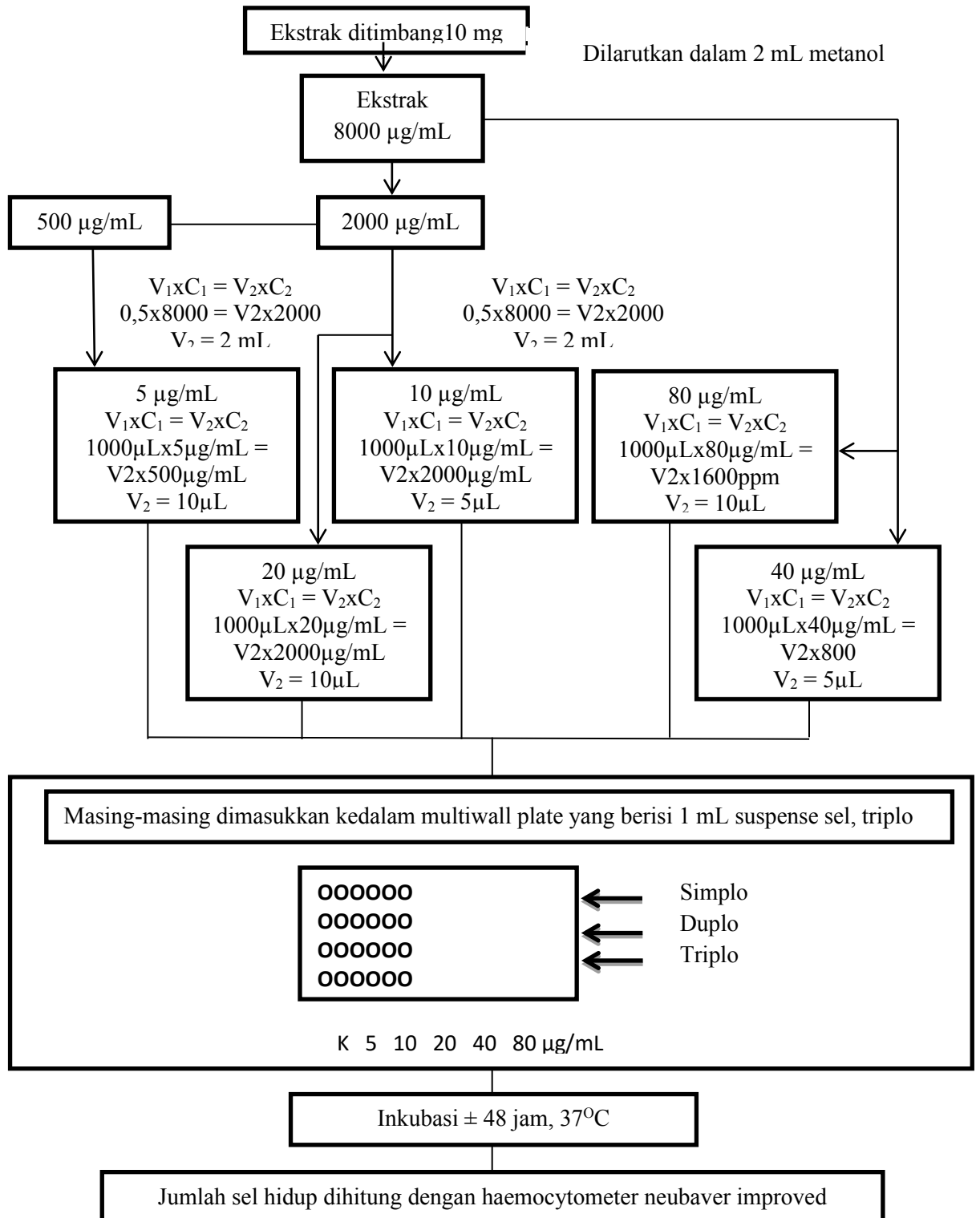


y	a	b	ln(x)	x
50	25.8	25.43	0.953	2.592687
50	26.6	21.42	1.074	2.925978
				2.759333

Lampiran 6. Tabel Probit

%	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,06	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,76	7,88	8,09

Lampiran 7. Skema Kerja Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210 Ekstrak n-heksan, Etil asetat, dan Etanol



Lampiran 8. Perhitungan IC₅₀ Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210
Ekstrak

Ekstrak etil asetat

Perhitungan % inhibisi

$$\% \text{ inhibisi} = (1-A/B) \times 100\%$$

A: jumlah el total dalam media yang mengandung zat uji

B: jumlah sel total dalam media yang tidak mengandung zat uji

Contoh untuk ekstrak etil asetat dengan dosis

a. Konsentrasi 5 µg/mL

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{15,83-7,75}{15,83} \times 100\% = 51,04\% \quad \text{probit} = 5,03$$

b. Konsentrasi 10 µg/mL

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{15,83-5,75}{15,83} \times 100\% = 63,67\% \quad \text{probit} = 5,33$$

c. Konsentrasi 20 µg/mL

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{15,83-4,75}{15,83} \times 100\% = 69,99\% \quad \text{probit} = 5,50$$

d. Konsentrasi 40 µg/mL

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{15,83-3,75}{15,83} \times 100\% = 76,31\% \quad \text{probit} = 5,71$$

e. Konsentrasi 80 µg/mL

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{15,83-2,50}{15,83} \times 100\% = 84,20\% \quad \text{probit} = 5,99$$

Perhitungan nilai IC₅₀ dengan persamaan regresi linier (x = log konsentrasi,
y = probit)

$$y = ax + b \longrightarrow y = 0,8836x + 4,1884 \longrightarrow 5 = 0,8836x + 4,1884$$

$$X = 0,9185 \longrightarrow \text{IC}_{50} \text{ antilog } x$$

Maka nilai IC_{50} etila setat = 8,2890

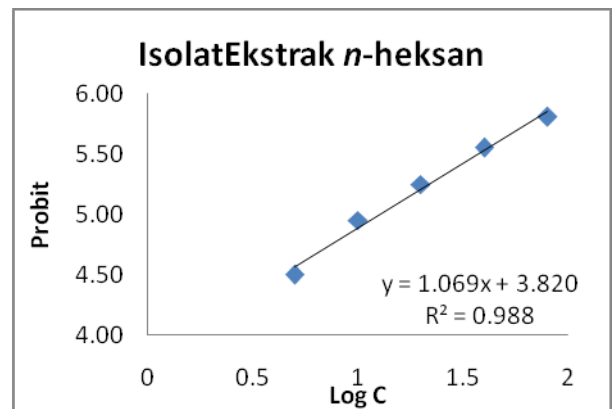
Dengan cara yang sama, diperoleh % inhibisi dan IC_{50} untuk ekstrak n-heksan dan etanol

Lampiran 9. Hasil Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210 Ekstrak

Ekstrak n-Hx

NILAI IC ₅₀ Ekstrak n-Heksan									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	\sum Sel x 10 ⁵	\sum Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	5	7	6	4	5	13,5	13,00	100	100
	5	5	4	6	5	12,5			
5	3	4	4	4	3	9	9,00	69,23	30,77
	5	3	4	3	3	9			
10	3	4	2	2	3	7	6,75	51,92	48,08
	4	3	2	2	2	6,5			
20	2	3	2	1	2	5	5,25	40,38	59,62
	1	3	2	2	3	5,5			
40	1	3	2	2	1	4,5	3,75	28,85	71,15
	1	2	2	0	1	3			
80	1	2	1	1	1	3	2,75	21,15	78,85
	3	0	1	1	0	2,5			

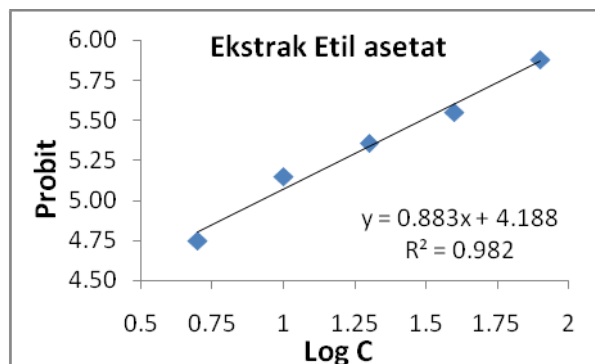
C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
5	30,77	0,699	4,50
10	48,08	1,000	4,95
20	59,62	1,301	5,25
40	71,15	1,6021	5,55
80	78,85	1,9031	5,81
Log C	1,1028	μg/mL	
IC ₅₀	12,6707		
r	0,9942		



Ekstrak Etil Asetat

NILAI IC ₅₀ Ekstrak Etil asetat									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	\sum Sel x 10 ⁵	\sum Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	5	7	6	4	5	13,5	13,00	100	100
	5	5	4	6	5	12,5			
5	3	4	3	2	4	8	7,75	59,62	40,38
	3	2	3	4	3	7,5			
10	2	2	3	3	2	6	5,75	44,23	55,77
	3	2	2	2	2	5,5			
20	1	2	2	2	2	4,5	4,75	36,54	63,46
	3	1	2	2	2	5			
40	1	0	3	2	2	4	3,75	28,85	71,15
	1	1	2	1	2	3,5			
80	1	2	0	1	1	2,5	2,50	19,23	80,77
	2	0	1	1	1	2,5			

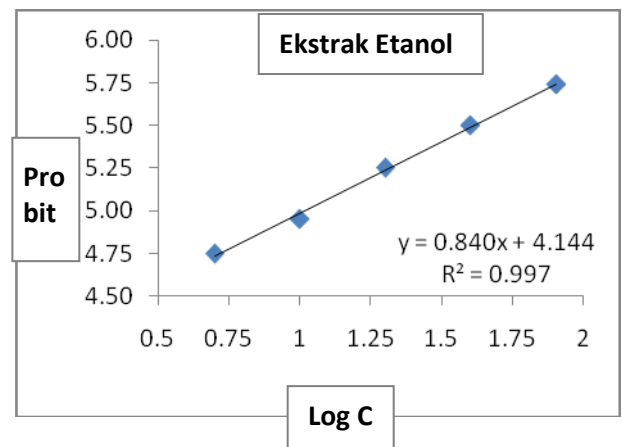
C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
5	40,38	0,699	4,75
10	55,77	1,000	5,15
20	63,46	1,301	5,36
40	71,15	1,6021	5,55
80	80,77	1,9031	5,88
Log C	0,9185	μg/mL	
IC ₅₀	8,2890		
R	0,9911		



Ekstrak Etanol

NILAI IC ₅₀ Ekstrak Etanol									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	∑ Sel x 10 ⁵	∑ Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	5	7	6	4	5	13,5	13,00	100	100
	5	5	4	6	5	12,5			
5	4	3	4	2	3	8	7,75	59,62	40,38
	4	2	4	3	2	7,5			
10	3	3	2	4	2	7	6,75	51,92	48,08
	3	3	2	3	2	6,5			
20	3	2	3	2	1	5,5	5,25	40,38	59,62
	2	1	3	2	2	5			
40	3	1	1	2	2	4,5	4,00	30,77	69,23
	2	1	1	2	1	3,5			
80	1	1	2	1	1	3	3,00	23,08	76,92
	2	0	1	2	1	3			

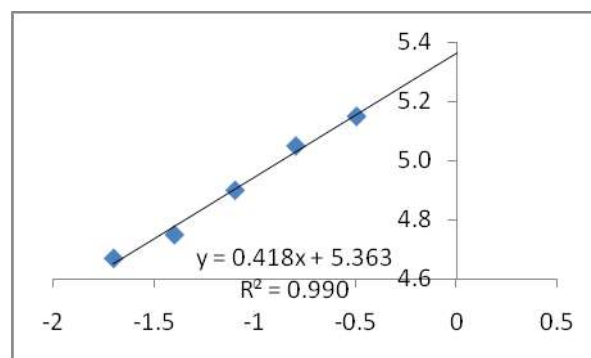
C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
5	40,38	0,699	4,75
10	48,08	1,000	4,95
20	59,62	1,301	5,25
40	69,23	1,6021	5,50
80	76,92	1,9031	5,74
Log C	1,0180	μg/mL	
IC ₅₀	10,4232		
R	0,9986		



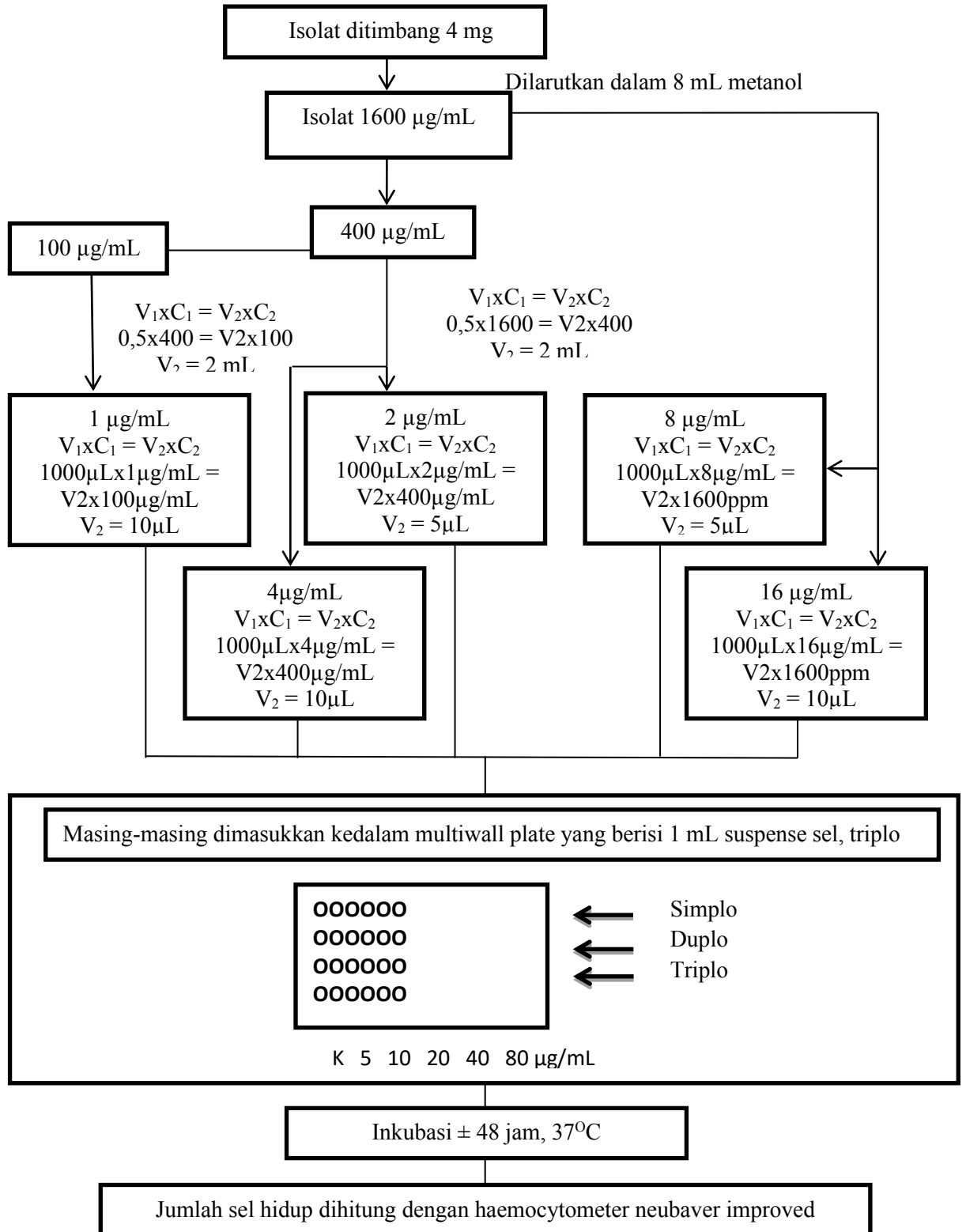
Doxorubisin

NILAI IC ₅₀ Doxorubisin									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	\sum Sel x 10 ⁵	\sum Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	5	7	6	4	5	13,5	13,00	100	100
	5	5	4	6	5	12,5			
0,02	4	3	3	4	3	8,5	8,25	63,46	36,54
	3	3	4	2	4	8			
0,04	3	2	2	3	4	7	7,75	59,62	40,38
	3	2	4	4	4	8,5			
0,08	2	3	3	2	4	7	7,00	53,85	46,15
	3	2	3	3	3	7			
0,16	2	3	3	3	3	7	6,25	48,08	51,92
	2	1	3	3	2	5,5			
0,32	2	3	2	2	2	5,5	5,75	44,23	55,77
	2	3	2	2	3	6			

C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
0,02	36,54	-1,699	4,67
0,04	40,38	-1,3979	4,75
0,08	46,15	-1,0969	4,90
0,16	51,92	-0,7959	5,05
0,32	55,77	-0,4949	5,15
Log C	-0,8674		
IC ₅₀	0,1357	μg/mL	
r	0,9951		



**Lampiran 10. Skema Kerja Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210
Fraksi Ekstrak Etil asetat**

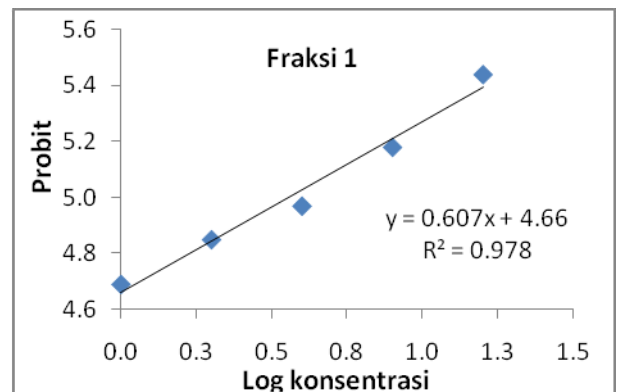


Lampiran 11. Hasil Uji Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210 Fraksi Ekstrak Etil asetat

Fraksi 1

NILAI IC ₅₀ Fraksi 1									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	\sum Sel x 10 ⁵	\sum Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	8	7	7	6	8	18,0	17,25	100	100
	6	7	6	7	7	16,5			
1	4	3	6	5	3	10,5	10,75	62,32	37,68
	4	4	5	5	4	11,0			
2	3	4	5	4	4	10,0	9,75	56,52	43,48
	5	3	3	5	3	9,5			
4	3	3	4	4	3	8,5	8,75	50,72	49,28
	2	5	4	4	3	9,0			
8	3	2	3	4	3	7,5	7,50	43,48	56,52
	2	4	3	3	3	7,5			
16	3	2	2	2	3	6,0	5,75	33,33	66,67
	1	3	2	2	3	5,5			

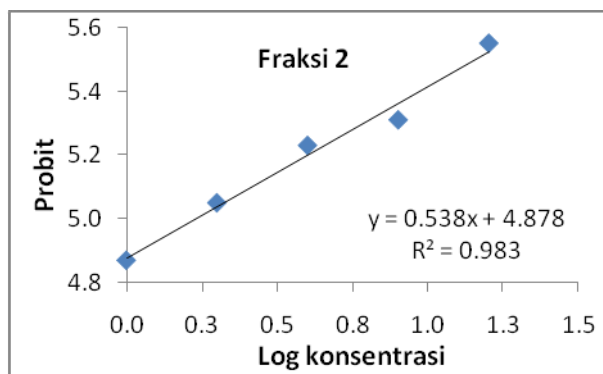
C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
1	37,68	0,0000	4,69
2	43,48	0,3010	4,85
4	49,28	0,6021	4,97
8	56,52	0,9031	5,18
16	66,67	1,2041	5,44
Log C	0,5593	μg/mL	
IC ₅₀	3,6249		
r	0,9894		



Fraksi 2

NILAI IC ₅₀ Fraksi 2									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	\sum Sel x 10 ⁵	\sum Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	8	7	7	6	8	18,0	17,25	100	100
	6	7	6	7	7	16,5			
1	3	4	4	4	6	10,5	9,50	55,07	44,93
	3	3	3	4	4	8,5			
2	3	2	4	4	3	8,0	8,25	47,83	52,17
	2	4	3	4	4	8,5			
4	3	3	2	3	3	7,0	7,00	40,58	59,42
	2	3	3	4	2	7,0			
8	3	2	3	3	2	6,5	6,50	37,68	62,32
	2	4	2	3	2	6,5			
16	2	2	2	3	2	5,5	5,00	28,99	71,01
	1	2	2	3	1	4,5			

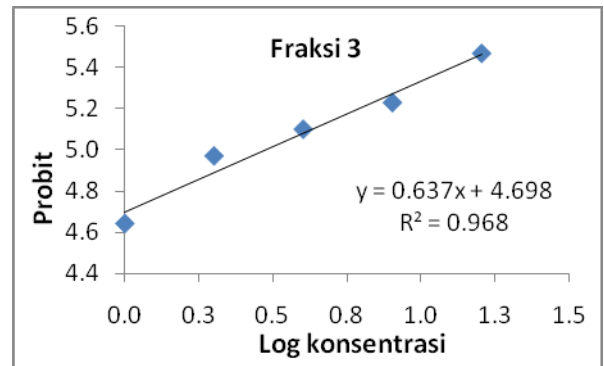
C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
1	44,93	0,0000	4,87
2	52,17	0,3010	5,05
4	59,42	0,6021	5,23
8	62,32	0,9031	5,31
16	71,01	1,2041	5,55
Log C	0,2267	μg/mL	
IC ₅₀	1,6854		
r	0,9917		



Fraksi 3

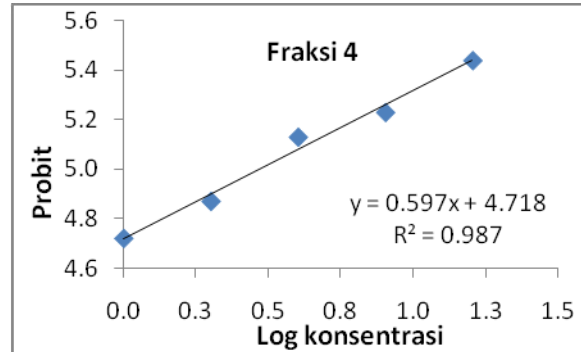
NILAI IC ₅₀ Fraksi 3									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
Fraksi 4	I	II	III	IV	V	∑ Sel x 10 ⁵	∑ Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	8	7	7	6	8	18,0	17,25	100	100
	6	7	6	7	7	16,5			
1	4	5	4	5	4	11,0	11,00	63,77	36,23
	3	4	4	6	5	11,0			
2	4	3	3	4	4	9,0	8,75	50,72	49,28
	3	4	3	4	3	8,5			
4	3	2	4	3	4	8,0	8,00	46,38	53,62
	4	3	3	2	4	8,0			
8	2	3	3	3	3	7,0	7,00	40,58	59,42
	2	4	2	3	3	7,0			
16	2	3	1	4	2	6,0	5,50	31,88	68,12
	2	2	3	1	2	5,0			

C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
1	36,23	0,0000	4,64
2	49,28	0,3010	4,97
4	53,62	0,6021	5,10
8	59,42	0,9031	5,23
16	68,12	1,2041	5,47
Log C	0,4735	μg/mL	
IC ₅₀	2,9751		
r	0,9841		



NILAI IC ₅₀ Fraksi 4									
C (ppm)	Sel Hidup					Parameter Hitung			
	I	II	III	IV	V	∑ Sel x 10 ⁵	∑ Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
K-	8	7	7	6	8	18,0	17,25	100	100
	6	7	6	7	7	16,5			
1	4	5	5	4	4	11,0	10,50	60,87	39,13
	3	5	4	4	4	10,0			
2	5	3	4	4	4	10,0	9,50	55,07	44,93
	4	3	4	5	2	9,0			
4	3	3	3	4	3	8,0	7,75	44,93	55,07
	4	3	3	3	2	7,5			
8	2	3	3	4	3	7,5	7,00	40,58	59,42
	3	2	3	3	2	6,5			
16	3	2	2	3	2	6,0	5,75	33,33	66,67
	2	2	3	2	2	5,5			

C (ppm)	Inhibisi (%)	Log C	Probit
1	39,13	0,0000	4,72
2	44,93	0,3010	4,87
4	55,07	0,6021	5,13
8	59,42	0,9031	5,23
16	66,67	1,2041	5,44
Log C	0,4717	μg/mL	
IC ₅₀	2,9628		
r	0,9935		



Lampiran 12. Foto Hasil Ekstraksi Daun Cantigi

Ekstrak		
Etil Asetat	<i>n</i> -Heksan	Etanol

Lampiran 13. Foto Hasil Pengujian Mikroba

TPC

< 10 Kol/g



Koliform

Negatif



Lampiran 14. Foto Alat yang Digunakan

