

**KAJIAN KIMIA DAN BIOAKTIFITAS SENYAWA UTAMA  
FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN TUMBUHAN**

*Picrasma javanica* Bl

**TESIS**

Oleh :  
**VERA LADESKA**  
**02207009**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS  
2005**

**KAJIAN KIMIA DAN BIOAKTIVITAS SENYAWA UTAMA  
FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN TUMBUHAN**

*Picrasma javanica* Bl

Oleh : Vera Ladeska

(Di bawah bimbingan Dayat Arbain dan M. Humi Mukhtar)

**RINGKASAN**

Telah dilakukan suatu kajian kimia dan bioaktivitas dari daun tumbuhan *Picrasma javanica* Bl. Tumbuhan ini dikenal baik di Sumatera Barat tepatnya di daerah Baso Bukittinggi sebagai "kayu pahit" dan secara tradisional digunakan untuk mengobati penyakit malaria, penyakit kulit dan obat kuat. Tumbuhan ini juga dikenal dengan nama Ki brahma, Ki pahit, Kayu pahit, dan di Sunda dikenal sebagai tabu ulei.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa aktif utama fraksi etil asetat dari daun *Picrasma javanica* Bl dengan mengelusidasi struktur molekulnya dan untuk mengetahui aktivitas farmakologi senyawa aktif tersebut. Uji aktivitas farmakologi yang dilakukan dimulai dari skrining farmakologi, uji antimikroba dengan metoda difusi agar, uji antioksidan dengan metoda pembentukan radikal DPPH (2,2- Difenil-1-Pikrilhidrazil) dan toksisitas dengan metoda "Brine Shrimps Lethality Assay".

Isolasi kandungan kimia senyawa utama dari fraksi etil asetat daun *Picrasma javanica* Bl dilakukan dengan metoda maserasi menggunakan pelarut metanol. Kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan fraksi-fraksi dengan kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi preparatif dan kromatografi radial. Senyawa hasil isolasi yang diperoleh adalah senyawa fenolik yang diberi nama senyawa V-1 berupa kristal berwarna putih, tidak berbau dengan jarak leleh 189-190°C. Dari data spektrum UV, IR, <sup>1</sup>H RMI, <sup>13</sup>C RMI, COSY, HSQC, HMBC, dan Massa diketahui bahwa senyawa V-1 hasil isolasi adalah metil 3,4,5 trihidroksi benzoat atau metil galat.

Skrining hipoknatik terhadap ekstrak metanol dan senyawa V-1 hasil isolasi menunjukkan aktivitas farmakologi yang paling menonjol sebagai relaksasi otot dan penekanan sistem saraf pusat. Uji toksisitas dengan metoda "Brine Shrimps Lethality

Assay memperlihatkan fraksi n-heksana memiliki toksisitas  $LC_{50}$  lebih tinggi dibanding fraksi ekstrak yang lain yaitu 2,40  $\mu\text{g/ml}$ . Uji aktivitas antimikroba dari fraksi etil asetat 14,23 - 14,80 mm menggunakan jamur uji *Candida albicans* dan *Trichopyton mentagrophytea*. Uji aktivitas antioksidan senyawa V-1 memperlihatkan aktivitas antioksidan dengan persentase inhibisi sebesar 95,37 % pada konsentrasi 1 mg/ml terhadap radikal bebas DPPH 0,05 mM.

**KAJIAN KIMIA DAN BIOAKTIFITAS SENYAWA UTAMA  
FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN TUMBUHAN**

*Picrasma javanica* Bl

Oleh :

**VERA LADESKA**  
02207009

T e s i s

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Farmasi  
pada Program Pascasarjana Universitas Andalas

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS ANDALAS**

**2005**

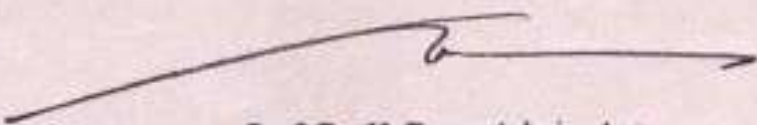



Judul Penelitian : KAJIAN KIMIA DAN BIOAKTIFITAS SENYAWA UTAMA  
FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN TUMBUHAN  
*Picrasma javanica* Bl  
Nama Mahasiswa : VERA LADESKA  
Nomor Pokok : 02207009  
Program Studi : FARMASI

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan didepan sidang panitia ujian akhir Magister Farmasi pada Program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan lulus pada tanggal 12 Maret 2005.


Menyetujui

1. Komisi Pembimbing

  
Prof. Dr. H. Dayar Arbain, Apt  
Ketua


  
Dr. M. Husni Mukhtar, MS, DEA, Apt  
Anggota

2. Ketua Program Studi  
Ilmu Farmasi

  
Dr. Muslim Suardi, M.Si, Apt  
NIP. 131 862 152



Direktur Pasca Sarjana

  
Prof. Dr. Hazli Nurdin, M.Sc  
NIP. 130 353 234

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 13 Desember 1973 di Padang sebagai anak keempat dari ayah H. Syofyan dan Ibu Hj. Salma. Penulis menamatkan SD pada tahun 1986, SMP tahun 1989 dan SMA pada tahun 1992 di Padang. Penulis memperoleh gelar Sarjana Sains pada jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang tahun 1997 dan menyelesaikan gelar Apoteker pada Program Profesi Apoteker Jurusan Farmasi Universitas Andalas Padang tahun 1998.

Sejak tahun 1998 – 1999 penulis bertugas sebagai Apoteker Pendamping di Apotek Kimia Farma Padang. Tahun 1999 – sekarang penulis bertugas sebagai dosen pengajar pada Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STIFI) Perintis Padang. Penulis juga bertugas sebagai Apoteker Pengelola Apotek pada RSB Lenggogeni Padang th 1999 – sekarang. Pada tahun 2002 penulis memperoleh kesempatan meneruskan pendidikan pada Program Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan hidayahNya hingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis ini yang berjudul, " KAJIAN KIMIA DAN BIOAKTIFITAS SENYAWA UTAMA FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN TUMBUHAN *Picramnia javanica* Bl". Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister pada program studi Farmasi Pascasarjana Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini perkenankan penulis menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang setulus-tulusnya kepada Bapak Prof.Dr.H.Dayat Arbain, Apt selaku ketua komisi pembimbing dan Bapak Dr.M.Husni Mukhtir, MS, DEA, Apt sebagai anggota komisi pembimbing yang telah meluangkan waktu, memberi petunjuk dan arahan selama pelaksanaan penelitian hingga selesainya tesis ini.

Penulis juga berkenan untuk mengucapkan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dirjen Pendidikan Tinggi Depdiknas RI yang telah memberikan beasiswa Pasca Sarjana (BPPS).
2. Hibah Presiden RI, Bank Mandiri tahun 2003 yang telah membantu biaya penelitian ini
3. Bapak Prof.H.Syahrar Harun, Apt yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang lebih tinggi.
4. Bapak Dr.Doddi Prima Putra, Apt yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis selama penelitian di laboratorium.

5. Bapak Prof.Dr. Nordin Hj. Lajis yang telah memberikan fasilitas dalam pengambilan spektrum di Universiti Putra Malaysia
6. Bapak Dr.Dochriyamus, Apt atas bantuan literatur dan saran-saran serta diskusi-diskusi elusidasi struktur.
7. Ibu Fatma Sri Wahyuni, Msi,Apt dan Roza Dianita, S.Far, Apt yang telah membantu dalam pengambilan spektrum di Universiti Putra Malaysia.
8. Semua pihak yang telah memberikan kontribusi, semangat dan dorongan kepada penulis.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak terdapat kekurangan-kekurangan dalam pembuatan tesis ini, oleh karena itu penulis dengan senang hati akan menerima kritik dan saran dari pembaca.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati penulis berharap semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan alam.

Padang, Februari 2005

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Botani dan Klasifikasi Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> .....	5
2.2. Penggunaan Tradisional Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> .....	6
2.3. Kandungan Kimia Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> .....	6
2.4. Ekstraksi dan Fraksinasi.....	13
2.5. Metoda Pemisahan dan Pemurnian.....	13
2.6. Senyawa Fenolik.....	15
2.6.1. Tinjauan Umum.....	15
2.6.2. Asam Galat.....	19
2.7. Penapisan Biologi Obat.....	21
2.7.1. Penapisan Hipokratik.....	24
2.8. Tinjauan Uji Toksisitas.....	26
2.8.1. Metoda Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps".....	28
2.8.2. Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
2.8.3. Metoda Perhitungan LC <sub>50</sub> .....	30
2.9. Metoda Pengujian Aktifitas Antimikroba.....	32
2.9.1. Bakteri.....	33

2.9.2. Jamur .....	35
2.10. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas .....	35
2.10.1. Tahap-tahap Reaksi Radikal Bebas .....	37
2.10.2. Radikal Bebas DPPH .....	37
<b>III. PELAKSANAAN PENELITIAN</b>	
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	39
3.2. Bahan dan Peralatan .....	39
3.2.1. Alat .....	39
3.2.2. Bahan .....	40
3.3. Prosedur Penelitian .....	41
3.3.1. Pengambilan dan Identifikasi Sampel .....	41
3.3.2. Ekstraksi dan Fraksinasi .....	41
3.3.3. Pemeriksaan Kandungan Kimia .....	45
3.3.4. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa .....	46
3.3.5. Uji Bioaktivitas Skrining Hipokrutik .....	42
3.3.5.1. Persiapan Hewan Percobaan .....	46
3.3.5.2. Penentuan Dosis .....	46
3.3.5.3. Pembuatan Sediaan Uji .....	46
3.3.5.4. Penapisan Aktifitas Farmakodinamik .....	47
3.3.6. Uji Aktifitas "Brine Shrimps" terhadap Ekstrak dan Fraksi Ekstrak .....	48
3.3.7. Pemeriksaan Aktifitas Antimikroba .....	49
3.3.7.1. Sterilisasi Alat dan Bahan .....	49
3.3.7.2. Pembuatan Media Pembibihan .....	50
3.3.7.3. Peremajaan Mikroba Uji .....	50
3.3.7.4. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji .....	50
3.3.7.5. Pembuatan Sampel Uji .....	51
3.3.7.6. Pengujian Aktifitas Antimikroba .....	51
3.3.8. Pengujian Aktifitas Antioksidan dengan Metoda Pembentukan Radikal DPPH .....	52
3.3.8.1. Pembuatan Pereaksi DPPH .....	52

3.3.8.2. Penentuan Panjang Gelombang DPPH .....	52
3.3.8.3. Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan .....	52
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Hasil .....	54
4.2. Pembahasan .....	56
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan .....	66
5.2. Saran .....	67
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
I. Nilai Probit Sesuai Besarnya Persentase Kematian .....	31
II. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Kimia Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> .....	73
III. Nilai Kuantitatif Beberapa Parameter pada Penapisan Hipokratik.....	77
IV. Daftar Faktor Bobot untuk 44 Parameter Penapisan Hipokratik.....	78
V. Contoh Laporan Kertas Kerja.....	79
VI. Efek Skrining Hipokratik Ekstrak Metanol daun <i>Picrasma javanica</i> Bl.....	80
VII. Efek Skrining Hipokratik Senyawa V-1 daun <i>Picrasma javanica</i> Bl.....	81
VIII. Hasil Perhitungan LC <sub>50</sub> dengan Program Komputer Finney .....	83
IX. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambat Pertumbuhan Jamur Uji.....	85
X. Hasil Pengujian Aktifitas Antioksidan .....	88
XI. Hasil Karakterisasi Organoleptis dan Pemeriksaan Senyawa V-1.....	89
XII. Data Spektrofotometri UV Radikal DPPH 0,05 mM .....	90
XIII. Data Spektrofotometri UV Senyawa V-1.....	91
XIV. Data Spektrofotometri Inframerah Senyawa V-1.....	92
XV. Tabel Korelasi Proton dan Karbon.....	100
XVI. Tabel Data Pemeriksaan Fragmen Senyawa V-1.....	101



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Gambar Daun Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> Bl .....	72
2. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia Daun <i>Picrasma javanica</i> Bl .....	73
3. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi.....	74
4. Metoda Pemisahan dan Pemurnian Senyawa V-1.....	76
5. Nilai Kuantitatif Beberapa Parameter Penapisan Hipokratik.....	77
6. Daftar Faktor Bobot untuk 44 Parameter Penapisan Hipokratik.....	78
7. Contoh Laporan Kertas Kerja Standar.....	79
8. Hasil Skrining Hipokratik Ekstrak Metanol dan Senyawa V-1.....	80
9. Skema Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps".....	82
10. Hasil Perhitungan $LC_{50}$ dengan Program Komputer Finney .....	83
11. Skema Pengujian Aktifitas Antimikroba.....	84
12. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambat Pertumbuhan Jamur Uji.....	85
13. Skema Pengujian Aktifitas Antioksidan .....	87
14. Hasil Pengujian Aktifitas Antioksidan .....	88
15. Karakterisasi Organoleptis dan Pemeriksaan Senyawa V-1.....	89
16. Spektrum UV Senyawa Radikal DPPH.....	90
17. Spektrum UV Senyawa V-1.....	91
18. Spektrum Inframerah Senyawa V-1.....	92
19. Spektrum $^1H$ RMI Senyawa V-1 dalam $CD_3OD$ .....	93
20. Spektrum COSY Senyawa V-1 dalam $CD_3OD$ .....	94
21. Spektrum $^{13}C$ RMI Senyawa V-1 dalam $CD_3OD$ .....	95

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar Langkah-langkah Bioskrining Obat.....	23
2. Gambar Daun Tumbuhan <i>Picrasma javanica</i> Bl.....	72
3. Gambar Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Daun <i>Picrasma javanica</i> .....	74
4. Skema Pemisahan dan Pemurnian Senyawa V-1.....	76
5. Skema Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps".....	82
6. Skema Pengujian Aktifitas Antimikroba.....	84
7. Gambar Diameter acrah Hambat Pertumbuhan <i>Candida albicans</i> .....	86
8. Gambar Diameter Daerah Hambat Pertumbuhan <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	86
9. Skema Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan.....	87
10. Spektrum UV Senyawa Radikal DPPH.....	90
11. Spektrum UV Senyawa V-1.....	91
12. Spektrum Inframerah Senyawa V-1.....	92
13. Spektrum <sup>1</sup> H RMI Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	93
14. Spektrum COSY Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	94
15. Spektrum <sup>13</sup> C RMI Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	95
16. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	96
17. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	98
18. Spektrum Massa Senyawa V-1 dalam CHCl <sub>3</sub> .....	101

22. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	96
23. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD <sub>3</sub> OD.....	98
24. Korelasi Proton dan Karbon Senyawa V-1.....	100
25. Spektrum Massa Senyawa V-1 dalam CHCl <sub>3</sub> .....	101

## I. PENDAHULUAN

### I.1. Latar Belakang

Sumatera merupakan salah satu bagian wilayah Indonesia yang memiliki hutan dengan beragam tumbuhan. Beberapa diantara tumbuhan tersebut telah dipergunakan oleh masyarakat sebagai bahan obat yang diolah secara tradisional. Pada umumnya penggunaan ini diwariskan secara turun temurun berdasarkan pengalaman tanpa diketahui secara pasti aktifitas farmakologis senyawa yang terkandung dalam tumbuhan obat tersebut. Untuk itu diperlukan suatu penelitian yang sistematis terhadap kandungan kimia dan farmakologisnya, sehingga didapatkan data dan informasi ilmiah agar pemakaian tumbuhan sebagai obat dapat dipertanggung jawabkan (Donatus, 1983).

Penyelidikan tentang aktifitas biologis dan kandungan kimia dari suatu tanaman penting sekali, tidak hanya untuk mendapatkan senyawa yang berguna untuk terapi, tapi juga untuk kepentingan ekonomi. Demikian juga struktur kimia baru hasil isolasi suatu tanaman dapat dimodifikasi menjadi struktur lain yang mempunyai nilai ekonomi dan efek terapi yang lebih baik.

Salah satu tumbuhan Sumatera yang digunakan sebagai pengobatan tradisional ini adalah *Pterocarpus javanicus* Bl yang dikenal dengan nama daerah "kayu pale" dari famili Simarubaceae. Tumbuhan ini dikenal baik di daerah Baso, Bukittinggi, Sumatera Barat yang digunakan secara tradisional untuk mengobati penyakit malaria, penyakit kulit dan obat kunt (Arbain, 1987).



Untuk menguji keamanan dan kebenaran khasiat dari tumbuhan *Picrasma javanica* Bl tersebut maka dicoba untuk menguji bioaktivitas ekstrak dan fraksi-fraksinya yang dimulai dengan skrining farmakologi, uji antimikroba dengan metoda difusi agar, uji antioksidan dengan metoda pembastakan radikal DPPH ( 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil ) dan toksisitas dengan metoda "Brine Shrimp". Keempat metoda uji aktifitas biologis ini merupakan skrining awal atau uji pendahuluan aktifitas biologis yang dirancang untuk membedakan senyawa yang bermanfaat dengan senyawa yang tidak bermanfaat secara cepat, dapat dimengerti dan menghemat biaya. Prosedur awal skrining biasanya menentukan aktifitas dan sifat lain yang mungkin ada pada suatu senyawa. Untuk selanjutnya dilaksanakan uji farmakologis yang spesifik.

Dari pendauran kepustakaan telah diisolasi beberapa senyawa dari daun *Picrasma javanica* Bl diantaranya javanicin J, javanicin K, javanicin H, javanicin O, javanicin P, javanicin Q, javanicin R, dan javanicin S (Khan, 2001). Informasi kandungan kimia maupun aktifitas dari tumbuhan *Picrasma javanica* Bl ini baru terbatas pada kulit batangnya saja, sedangkan terhadap daun hanya beberapa saja karena itu kami tertarik untuk mengisolasi senyawa dari daun *Picrasma javanica* Bl ini.

Berdasarkan informasi diatas telah dicoba untuk mengisolasi senyawa aktif dari *Picrasma javanica* Bl ini. Metoda yang digunakan untuk mengisolasi meliputi ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh difraksinasi dengan berbagai pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu pelarut n-heksana, etil asetat dan n-butanol ( Das,1969).

Pemisahan senyawa dengan menggunakan metoda kromatografi diantaranya kromatografi kolom dan kromatografi radial, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian senyawa dengan cara rekristalisasi. Karakterisasi senyawa hasil isolasi meliputi pemeriksaan organoleptis, fisika, kimia dan analisa spektroskopi.

### 1.2. Perumusan Masalah

Tumbuhan obat asli Indonesia antara lain *Picrasma javanica* Bl masih banyak dipakai oleh masyarakat dalam pengobatan berbagai jenis penyakit. Pengetahuan ini telah diwariskan secara turun temurun berdasarkan kepada kebiasaan semata. Dalam rangka inilah diperlukan penelitian ilmiah terhadap kandungan kimia dan efek farmakologisnya sehingga pengobatan secara tradisional ini dapat dipertanggung jawabkan secara ilmiah.

Metabolit sekunder yang terdapat pada daun *Picrasma javanica* Bl beraneka ragam jenisnya, hal ini terlihat dari hasil uji pendahuluan terhadap ekstrak kasar tumbuhan ini. Berdasarkan hal tersebut kami tertarik untuk mengungkapkan senyawa aktif lain yang terdapat pada bagian daun dari tumbuhan *Picrasma javanica* Bl.

### 1.3. Tujuan Penelitian

Untuk mengisolasi dan mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada daun *Picrasma javanica* Bl dan mengelucidasi struktur molekulnya dengan analisa spektroskopi UV, IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS serta melakukan uji pendahuluan terhadap aktifitas biologis ekstrak tumbuh-tumbuhan dan senyawa murni hasil isolasi dengan beberapa uji farmakologis.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan kimia yang terdapat pada daun *Pisonia javanica* Bl, memberikan informasi tentang aktifitas biologis ekstrak dan fraksi-fraksi ekstrak juga memberikan kontribusi dalam rangka menginventarisir dan mendata kekayaan alam Indonesia khususnya Sumatera.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan Botani dan Klasifikasi Tumbuhan *Picramnia javanica* Bl

Tumbuhan *Picramnia javanica* Bl dapat diklasifikasikan sebagai berikut

(Backer, 1965):

Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Angiospermae
Sub kelas	: Dicotyledoneae
Group	: Thalamiflorae
Ordo	: Rutales
Familia	: Simarubaceae
Genus	: <i>Picramnia</i>
Spesies	: <i>Picramnia javanica</i> Bl.

Tumbuhan berbentuk pohon dengan tinggi lebih kurang 20 meter. Daun berbentuk bulat telur, panjang tangkai daun 3-6 cm, anak daun 1-4 pasang ditambah dengan anak daun pada ujungnya, panjang daun 4-21 cm dan lebar 1,5-4,5 cm. Bunga majemuk, panjang 6-20 cm (termasuk tangkai 3-6 cm), kelopak bunga bergigi lebar dengan bentuk segitiga, tidak berbulu (licin), panjang 0,5 cm, tajuk bunga (corolla) berwarna putih kehijauan atau putih kekuningan. Bunga jantan mempunyai 4 benang sari yang terdapat dibawah halagian yang cambung, panjang tangkai sari 2-2,5 mm dan kepala sari dengan panjang 0,75 mm berbentuk bulat telur. Buah terdapat pada tangkai buah, panjang tangkai 1-1,5 cm, berbentuk bulat dan berduri dengan panjang 0,75-1 cm serta lebar 1 cm (Backer 1965, Beckill 1966).



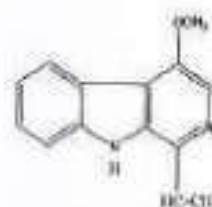
## 2.2. Penggunaan Tradisional Tumbuhan *Picramnia javanica* Bl

Achán dan kawan-kawan pada tahun 1985 melakukan survey fitokimia di daerah Bukittinggi dan didapatkan kayu pahit (*Picramnia javanica* Bl ) yang secara tradisional digunakan untuk obat penyakit malaria, penyakit kulit dan obat kulit yang dikenal baik di daerah Baso-Balutinggi, Sumatera Barat sebagai "kayu pahit".

Dalam laporan singkat yang ditulis oleh Kān, Kabura dan Omoloso (2001) menyatakan tumbuhan *Picramnia javanica* Bl banyak digunakan sebagai obat "colica", obat sakit perut, luka beranah, sebagai "fobefuge", "vomifuge", insektisida dan antidot setelah keracunan makan daging panyu.

## 2.3. Kandungan Kimia Tumbuhan *Picramnia javanica* Bl

Jelen (1970) dan kawan-kawan telah berhasil mengisolasi alkaloid  $\beta$ -karholina dari kulit batang *Picramnia javanica* Bl yang tumbuh di Papua New Guinea yang diberi nama dengan dehidrokarnatina (1).



(1)

Achán dan Sargent (1989) telah berhasil mengisolasi 4 senyawa alkaloid dari kulit batang *Picramnia javanica* Bl yang tumbuh di daerah Baso-Balutinggi,

2 senyawa diantaranya adalah baru yaitu 5-hidroksi-kreatina (2) dan 5-hidroksi-dehidrokreatina (3). 2 senyawa lainnya adalah kreatina (4) dan dehidrokreatina (5).



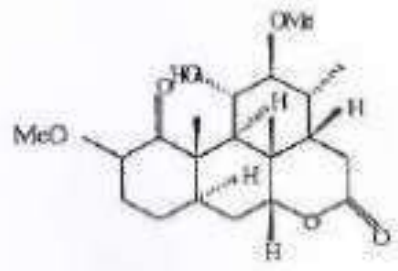
(2) R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
 R<sub>2</sub> = -OH

(4) R<sub>1</sub> = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
 R<sub>2</sub> = -H

(3) R<sub>1</sub> = -CH=CH<sub>2</sub>  
 R<sub>2</sub> = -OH

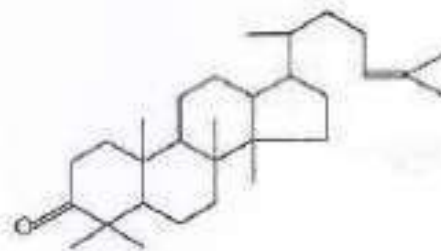
(5) R<sub>1</sub> = -CH=CH<sub>2</sub>  
 R<sub>2</sub> = -H

Yosvalina (1987) berhasil mengisolasi senyawa pahit dari kulit batang *Pisonia javanica* Bl yang tumbuh di daerah Bano- Bukittinggi. Berdasarkan hasil spektroskopi ultraviolet, infra merah, <sup>13</sup>C RMI (<sup>13</sup>C - <sup>1</sup>H "Correlated" dan <sup>13</sup>C - <sup>1</sup>H RMI dua dimensi), <sup>1</sup>H RMI (2D-COSY), serta didukung dengan data spektroskopi massa yang memberikan BM= 378, diketahui senyawa tersebut mempunyai rumus molekul C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>, mengasukan struktur Y (6).



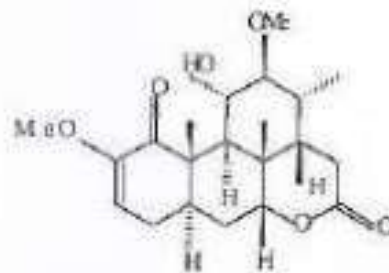
(6)

Minaldi (1988) telah berhasil mengisolasi senyawa terpenoid yang berdasarkan spektroskopi ultraviolet, infra merah,  $^{13}\text{C}$  RMI,  $^1\text{H}$  RMI serta spektroskopi massa yang memberikan  $\text{DM}^+ 424$ , diketahui senyawa tersebut mempunyai rumus molekul  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$  dengan struktur M (7) yang ditunjukkan dengan ketidak pastian ikatan rangkap pada atom C-5,9,14 atau 16.

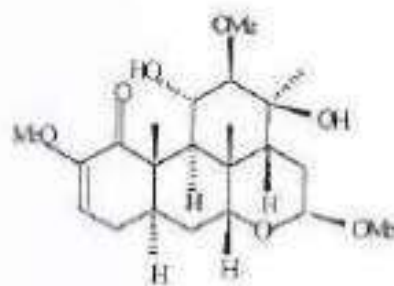


(7)

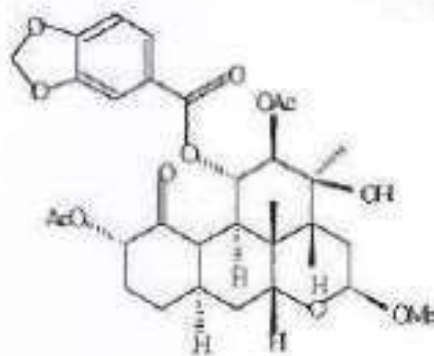
Ohmoto *et al* (1989) telah mengisolasi 3 kuantrinoi baru dari kulit batang *Pteronia javanica* Bl yang dikoleksi dari Kebun Raya Bogor, Indonesia dan diberi nama javanicin A (8), javanicin C (9) dan javanicin D (10).



(8)

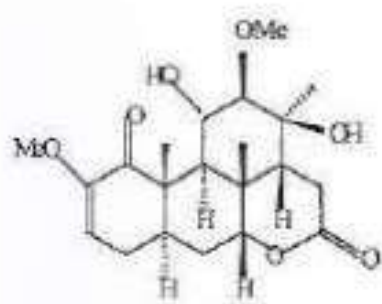


(9)

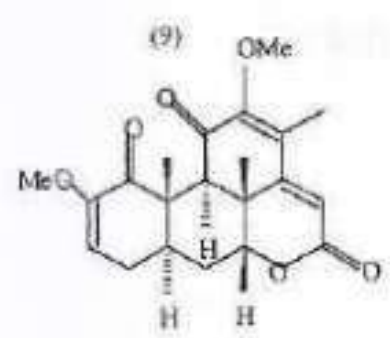


(10)

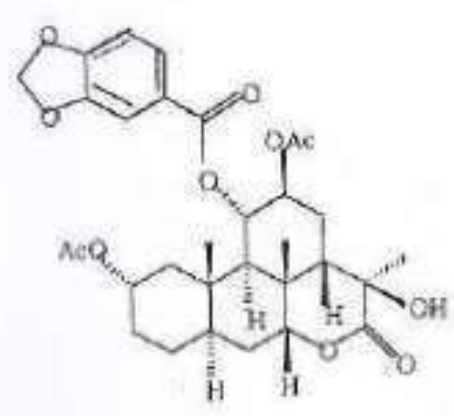
Koike *et al* (1991) juga berhasil mengisolasi 3 senyawa polirit dari *Pterisantha javanica* III yaitu javanicin H (11), javanicin I (12) dan javanicin J (13). Kemudian Ishii *et al* (1991) berhasil mengisolasi 5 glikosida kumaroid dari *Pterisantha javanica* III yaitu javanicinosida D (14), javanicinosida E (15), javanicinosida F (16), javanicinosida G (17), javanicinosida H (18).



(11)

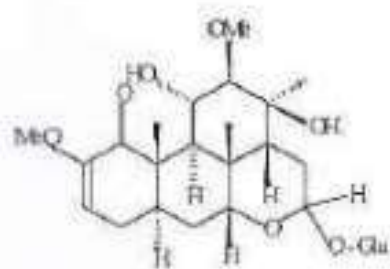


(12)

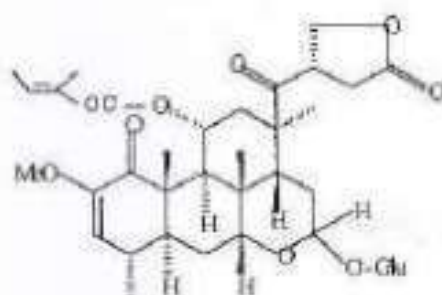


(13)

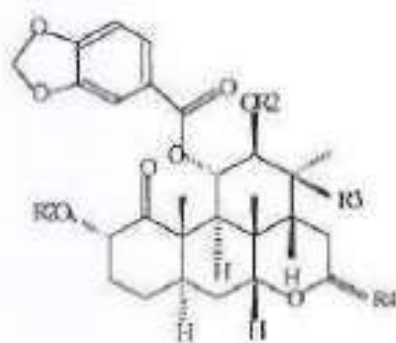




(14)



(15)



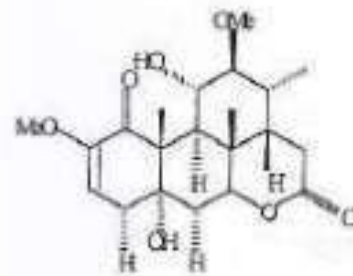
R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub> R<sub>4</sub>

(16) Ac Me H < H  
O-Glu

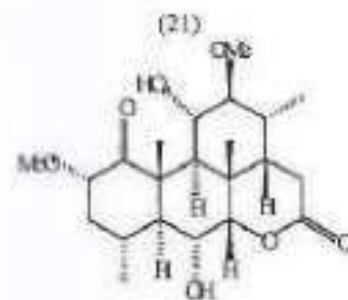
(17) Me Me H < H  
O-Glu

(18) H Ac OH < H  
O-Glu

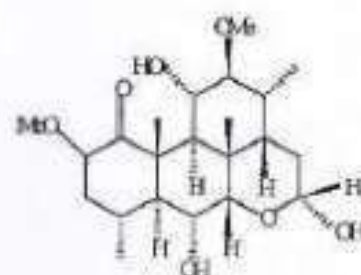
Tahun 1995 Koike *et al* mempublikasikan 3 senyawa baru yang diisolasi dari kulit batang *Picrasma javanicum* Bl yaitu javanicin Z (19), dihidrojavanicin Z (20) dan hemiasacajavanicin Z (21).



(19)



(20)



21

#### 2.4. Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi merupakan proses peyarian senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan mikroorganisme menggunakan pelarut tertentu. Metoda yang umum digunakan dalam ekstraksi adalah maserasi, perkolasi, sokletasi dan destilasi (Harborne, 1987).

Maserasi merupakan metoda ekstraksi yang paling sederhana. Biasanya dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut tertentu dengan beberapa kali pengadukan. Jika tidak dikawatirkan lain, menurut Farmakope Indonesia pelarut untuk maserasi adalah etanol, tetapi dapat pula digunakan air atau campuran air-etanol (Antoninicus, 1995; Antoninicus, 1986).

Fraksinasi merupakan proses memisahkan kandungan senyawa bahan alam yang ada dalam ekstrak menjadi komponen yang lebih sederhana berdasarkan perbedaan sifat kelarutan dalam pelarut yang digunakan. Fraksinasi biasanya menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya dari pelarut non polar, semi polar kemudian polar (Harborne, 1987; Houghton, 1998).

#### 2.5. Metoda Pemisahan dan Pemurnian

Metoda yang umum digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa adalah kromatografi. Dalam kromatografi terdapat dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan senyawa terjadi karena perbedaan distribusi komponen pada fase diam dan fase gerak (Harborne, 1987; Ikin, 1976).

Pada kromatografi lapis tipis (KLT), fase diam umumnya berupa plat silika GF<sub>254</sub> yang digunakan untuk tujuan kualitatif, yaitu untuk melihat pola noda senyawa yang ada dalam sampel. Banyaknya senyawa yang terkandung

dalam ekstrak dapat diketahui dari jumlah noda yang ada pada plat. Pemisahan yang baik terjadi bila antara noda tersebut terdapat pemisahan yang nyata (Houghton, 1998; Ikan, 1976).

Pemisahan senyawa yang dituju dapat dilakukan dengan kromatografi kolom, menggunakan fase diam silika dan fase gerak berupa pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara bertahap (*step gradient polarity*). Persiapan kolom diawali dengan pembuatan bubuk silika menggunakan pelarut yang paling non polar. Sampel yang akan dipisahkan dipreabsorpsi dengan menambahkan alkali pada pada ekstrak dengan perbandingan sama (1:1), kemudian pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai ekstrak berbentuk serbuk. Sampel hasil preabsorpsi ini kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan difasi dengan fase gerak yang sesuai. Pemisahan senyawa terjadi karena perbedaan afinitas terhadap adsorben (Houghton, 1998; Ikan, 1976).

Fraksi yang keluar dari kolom kromatografi ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang memiliki nilai Rf sama digabung, kemudian pelarutnya diuapkan sehingga akan diperoleh beberapa fraksi. Noda pada plat KLT dideteksi dengan penampak noda lampu UV pada panjang gelombang 254 nm untuk senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor, sedangkan gugus yang tak memiliki gugus kromofor dilihat dengan penampak noda up iodam (Houghton, 1998).

Senyawa hasil isolasi jarang didapatkan berupa senyawa murni. Salah satu cara pemurniannya adalah dengan rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat utama yang akan dimurnikan dengan senyawa minor dalam

suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan diternikan. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sehingga didapatkan kristal murni, dituangi dengan jarak leleh yang tajam dan menunjukkan satu noda pada plat KLT dengan berbagai sistem pelarut (Srinier, 1980; Terin, 1980).

Penentuan struktur senyawa dilakukan dengan menggunakan spektrum ultraviolet, inframerah, Resonansi Magnet Inti (RMI), HMBC (Heteronuclear Multiplebond Correlation), HSQC (Heteronuclear Singlet Quantum Correlation), COSY (Correlation Spectroscopy) dan spektrum massa (Harbone,1987; Silverstein, 1991).

Spektrum <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY merupakan spektrum autokorelasi dengan cara menghubungkan titik-titik sinyal dari proton yang terdapat pada spektrum. Jika pola yang dihasilkan membentuk bidang persegi empat berarti proton-proton yang bertangga tersebut saling terkopling (Silverstein, 1991).

Spektrum HSQC memberikan informasi tentang korelasi antara suatu proton dengan karbon dimana proton tersebut melekat. Data spektrum HMBC memberikan informasi tentang korelasi antara masing-masing proton dengan atom karbon tetangganya sampai 2 ikatan (<sup>1</sup>H-C-C) atau 3 ikatan (<sup>1</sup>H-C-C-C) (Silverstein,1991).

## 2.6. Senyawa Fenolik

### 2.6.1. Tinjauan Umum

Senyawa fenolik meliputi beraneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai cincin aromatik mengandung satu atau lebih gugus

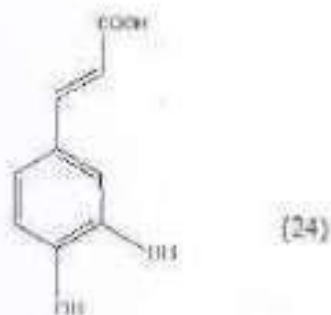
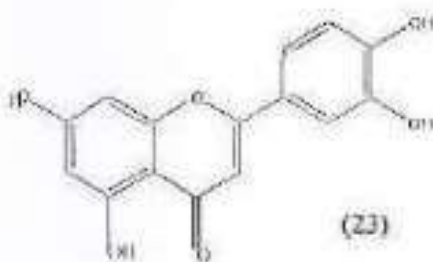
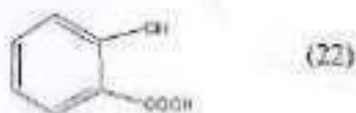


hidroksil yang terikat langsung (Harborne, 1987). Di alam, senyawa fenolik ditemukan dalam jumlah kecil pada lemak dan minyak nabati. Senyawa fenolik ditemukan dalam jumlah besar dari dekomposisi selulosa, lignin, dan material yang mengandung karbon seperti batubara dan minyak bumi (Kirk 1953).

Dalam keadaan murni, senyawa fenolik sederhana berupa zat padat tidak berwarna, tetapi biasanya mudah teroksidasi dan berwarna gelap bila bereaksi dengan udara. Kelarutan senyawa fenolik dalam air bertambah bila gugus hidroksil bertambah banyak (Robinson, 1994). Hal ini juga berlaku bila senyawa fenolik berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel tumbuhan (Harborne, 1987). Senyawa fenolik ini umumnya juga larut baik dalam pelarut organik yang polar. Senyawa fenolik yang kelarutannya kecil dalam air, mudah larut dalam larutan natrium hidroksida encer dalam air. Tetapi dalam suasana basa, laju oksidasi sangat meningkat sehingga penggunaan basa kuat sebaiknya dihindari (Robinson, 1994).

Asam fenolik yang tidak larut dalam air dapat dibedakan dari senyawa fenolik lain yang tidak larut dalam air. Hal ini berdasarkan kenyataan bahwa asam fenolik dapat larut dalam larutan natrium bikarbonat, sementara senyawa fenolik yang keasamannya lebih rendah memerlukan pelarut yang kebasannya lebih besar. Pada umumnya senyawa fenolik alami mengandung sekurang-kurangnya satu gugus hidroksil, dan lebih banyak membentuk senyawa eter, ester, atau glikosida daripada senyawa bebas. Kelarutan senyawa ester atau eter fenol dalam air lebih rendah daripada senyawa fenoliknya, sementara senyawa glikosida fenolik lebih mudah larut dalam air (Robinson, 1994).

Beberapa ribu senyawa fenolik alam telah diketahui strukturnya. Flavonoid merupakan golongan terbesar seperti antara lain luteolin (22), asam salisilat (23), asam kafeat (24) dan manjistin (25). Tetapi fenolik monosiklik sederhana, fenilpropanoid, dan kinaon fenolik juga terdapat dalam jumlah besar. Beberapa golongan bahan polimer penting dalam tumbuhan seperti lignin, melanin, dan tanin adalah senyawa polifenol.





(25)

Peranan beberapa golongan senyawa fenolik seperti lignin sudah diketahui yaitu sebagai bahan pembangun dinding sel, antosianin sebagai pigmen bunga. Terdapat dugaan bahwa senyawa fenolik sederhana terlibat dalam transpor elektron pada fotosintesis dan dalam pengaturan aktifitas enzim tertentu. Senyawa fenolik dapat juga bertindak sebagai pemacu pertumbuhan atau pendiferensiasi, seperti asam salisilat sebagai pemacu alami pembentukan bunga *Scoromonium guttatum* dan juga sebagai senyawa penghambat bunga *Spiraea punctata* (Robinson, 1994)

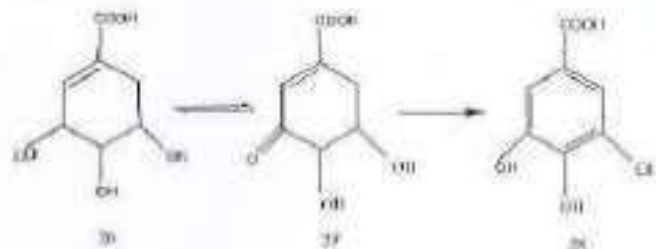
Beberapa jenis tumbuhan terlihat menjadi tahan terhadap serangan jamur karena senyawa fenolik yang dikandungnya, tetapi ketahanan tersebut mungkin bersifat khas, hanya terhadap jenis jamur tertentu, seperti *Macrophomina phaseolina* (Gangopadhyay, 1979).

Beberapa senyawa fenolik bersifat racun terhadap hewan pemangsa tumbuhan dan serangga. Hal ini ditunjukkan oleh aktifitas iritasi yang kuat dari tanaman "poison ivy" (*Rhus toxicodendron*) dan "poison sumac" (*Rhus venita*) dari famili Anacardiaceae akibat adanya senyawa orto-difenol yang mempunyai rantai samping yang panjang (Gangopadhyay, 1979).

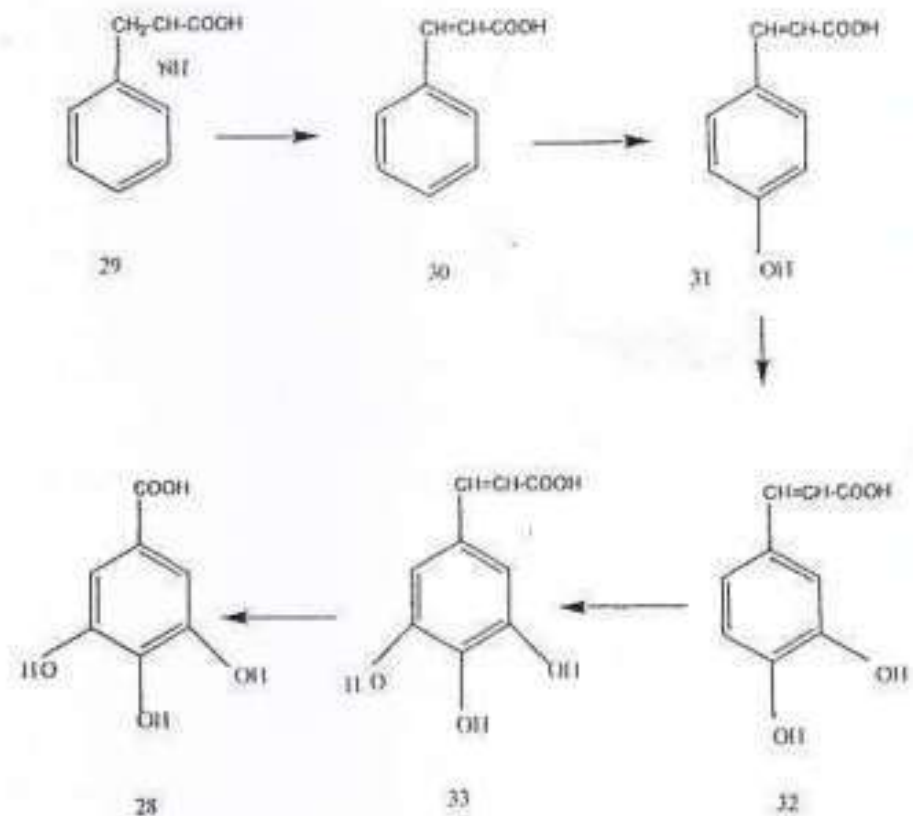
### 2.6.2. Asam Galat

Asam galat adalah asam 3,4,5-trihidroksi benzoat, termasuk ke dalam golongan senyawa asam fenolik. Asam galat berbentuk kristal dan memberikan warna biru tua dengan larutan feri klorida. Didalam tumbuhan, asam galat terdapat dalam bentuk galotanin yang merupakan kelompok tanin yang dapat mengalami hidrolisis dengan suatu asam.

Biosintesis asam galat (28) dalam tumbuhan melalui dua jalur yaitu jalur asam sikimat (26) dan jalur fenilalanin (29). Biosintesis asam galat melalui jalur asam sikimat (27) adalah sbb (Tyler, 1976):



Biosintesis asam galat melalui jalur fenilalanin (29), asam sinamat (30), asam kumarat (31), asam kafeat (32), trihidroksisinamat (33) adalah sbb (Tyler, 1976):



Asam galat terutama terkandung dalam "nutgall", seperti yang terdapat dalam *Rhus chinensis* Mill. (Anacardiaceae), dan *Rosa gallica* Linne (Rosaceae). Selain itu juga terkandung dalam *Hammamelis virginiana* Linne (Hamamelidaceae), dan daun *Quercus douglasii* (Fagaceae) (Tyler, 1976; Stumpf, 1981 dan Goodwin, 1983).



## 2.7. Penapisan Aktifitas Biologi Obat

Penapisan biologi obat adalah suatu cara yang sistematis untuk menentukan efek dari suatu obat terhadap jaringan atau organ hewan percobaan dan manusia serta respon terhadap obat tersebut. Penapisan obat pada dasarnya untuk membedakan substansi yang berguna dan yang tidak berguna secara cepat dan dengan biaya semurah mungkin (Malone,1977). Prosedur pengamatan meliputi serangkaian parameter-parameter yang memungkinkan untuk mendeteksi aktifitas farmakologi. Biasanya pengujian dapat diikuti dengan suatu evaluasi lanjutan agar ketidakpastian hasil pengamatan dapat dihilangkan dan manfaat yang besar dari uji penapisan memungkinkan peneliti mempelajari senyawa kimia yang ada (Thomson,1985).

Konsep yang terpenting dari penapisan obat yaitu kerja obat pada hewan adalah sama dengan pada manusia. Kelemahan konsep ini yaitu adanya perbedaan tertentu antara manusia dengan hewan juga antara variasi spesies hewan. Konsep kedua yang penting dalam penapisan obat adalah bahwa obat-obat lebih mudah dibedakan dan diklasifikasikan berdasarkan perbedaan efek keseluruhannya dari pada hanya pada satu pengujian aktivitas (Thomson,1985).

Ada tiga macam penapisan farmakologi yang perbedaannya terletak pada tujuan dari penapisan tersebut, yaitu (Thomson, 1985; Turner, 1985):

### 1. Penapisan Sederhana

Penapisan sederhana adalah penapisan yang bertujuan untuk menentukan senyawa-senyawa yang memiliki khasiat tertentu dengan menggunakan satu atau dua pengujian. Penapisan ini tidak memerlukan serangkaian pengujian,

contohnya pengujian efek penurunan kadar gula dalam darah dari suatu senyawa yang mungkin dapat digunakan untuk menentukan senyawa-senyawa yang berkhasiat hipoglikemik.

## 2. Penapisan Buta (Hippokratik)

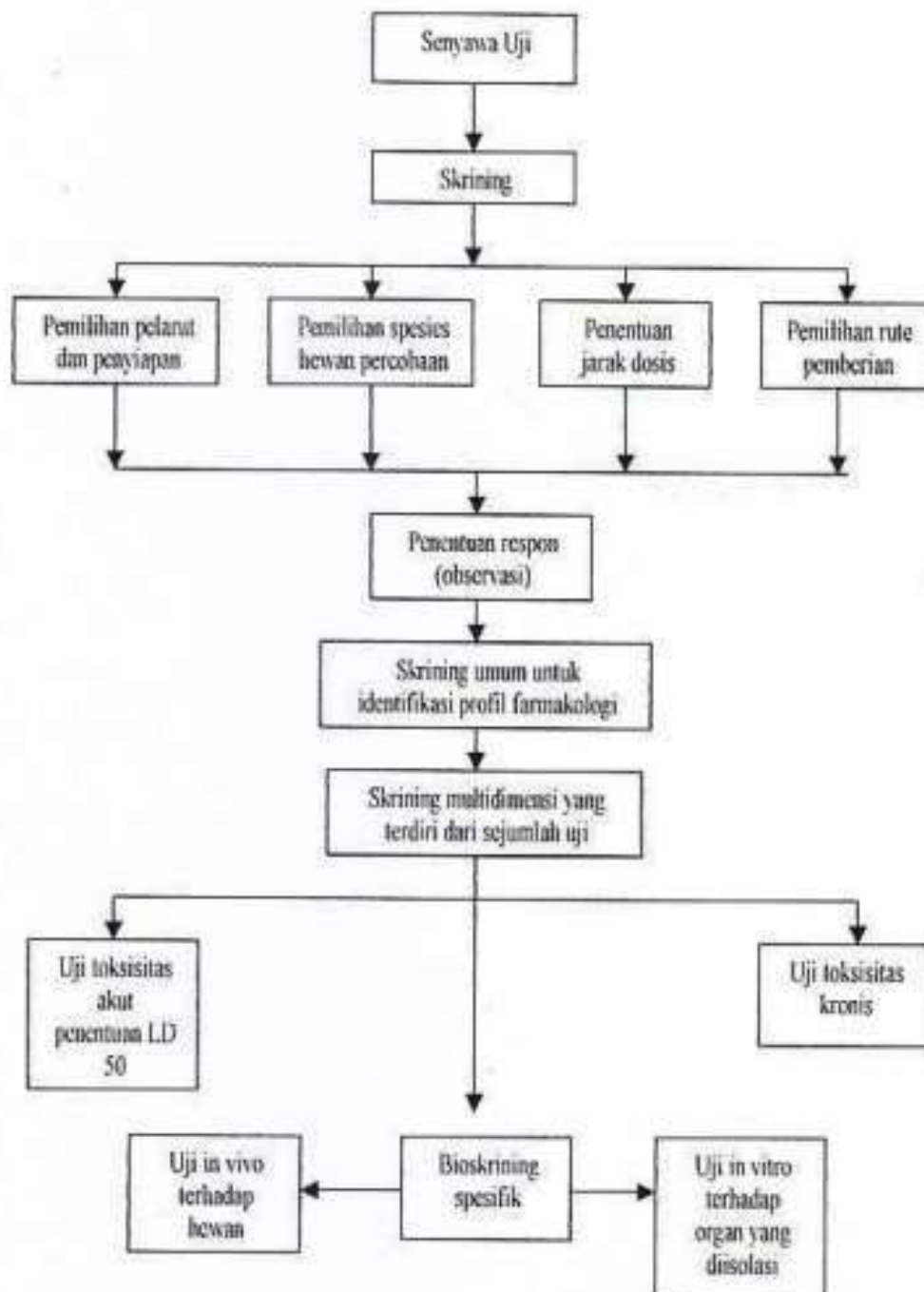
Penapisan hipokratik adalah penapisan terhadap senyawa-senyawa kimia baru yang didapat dari isolasi bahan alam atau dari sintesa, sehingga didapat petunjuk-petunjuk potensial tentang aktivitasnya. Penapisan ini bertujuan untuk menyatakan apakah suatu senyawa baru perlu mendapatkan perhatian lebih lanjut atau tidak.

## 3. Penapisan Spesifik

Penapisan spesifik adalah penapisan yang berdasarkan pada penentuan aktivitas farmakologi tertentu dari suatu obat. Sebuah program pengujian harus dapat memberikan informasi tentang senyawa obat melalui serangkaian pengujian. Penapisan ini lebih terbatas dari penapisan hipokratik, namun hasil yang diperoleh lebih teliti serta dapat memperlihatkan efek sampingnya.

Suatu penapisan obat baru harus memungkinkan peneliti mengumpulkan data-data senyawa yang tidak aktif atau beracun secepat mungkin. Pendekatan penapisan obat yang umum dilakukan adalah secara *in vivo* pada hewan yang tidak sakit atau disakitkan. Semua aktivitas farmakologi, baik yang diinginkan maupun yang tidak diinginkan harus terdeteksi. Efek obat akan terlihat dari aktivitas yang muncul melalui rangsangan atau menekan sistem fisiologi atau patologi yang ada (Thomson, 1985).

Langkah-langkah Bioskrining Obat (Thomson, 1985) :



Gambar 1. Langkah-langkah bioskrining obat (Thomson, 1985).

### 2.7.1. Penapisan Hippokratik

Penapisan hippokratik merupakan serangkaian pengujian sederhana terhadap bahan senyawa baru baik yang berasal dari bahan alam atau dari sintesis, untuk mendapatkan aktivitas farmakologis yang dimilikinya. Hippokratik berasal dari kata *Hippocrates* nama seorang Bapak kedokteran yang menggunakan suatu diagnosa penyakit melalui pengamatan gejala-gejala yang ditimbulkan oleh suatu penyakit. Semua pengamatan dikumpulkan dan dibandingkan dengan pengamatan terdahulu untuk mendapatkan diagnosa penyakit pasien. Diagnosa dengan teknik ini biasanya cepat dan dikenal dengan diagnosa hippokratik (Thompson, 1985).

Aplikasi prinsip diagnosa penyakit untuk penapisan suatu obat disebut dengan penapisan hippokratik. Prosedurnya mencakup pengamatan multidimensi dari perubahan fungsional pada hewan sehat yang diinduksi dengan obat yang dimaksudkan untuk memperoleh suatu profil komplit dari efek obat tersebut (Thompson, 1985).

Teknik penapisan ini menggunakan kertas kerja standar (lampiran 7) yang berisikan tingkah laku hewan pada interval waktu tertentu setelah pemberian obat. Penapisan ini memberikan kejelasan untuk klasifikasi aktifitas biologis senyawa uji, sehingga dapat ditetapkan pengujian spesifik bagi senyawa tersebut.

Beberapa prinsip dasar mengenai penapisan hipokratik ini adalah :

1. Semua obat menunjukkan profil aktivitas dosis respon, sebab semakin tinggi dosis semakin banyak obat yang mencapai tempat kerja.
2. Setiap obat mempunyai karakteristik profil dosis-respon yang dapat dikenal dan bersifat khas.



3. Semua obat mempunyai kemampuan untuk menginduksi toksisitas jika dosis melebihi batas keamanan.
4. Dengan menggunakan profil dosis respon, obat-obat telah diketahui kerja farmakologinya dan didukung pengetahuan tentang efek obat pada hewan, maka dapat diperkirakan kegunaan suatu senyawa yang diuji dengan suatu derajat ketelitian yang tinggi, demikian juga potensi, toksisitas dan efek samping.

Beberapa metoda yang dapat digunakan untuk melakukan penilaian aktifitas respon hewan pada penapisan hippokratik :

1. Metoda Irwin

Dalam prosedur penapisan multidimensi semikualitatif, Irwin menetapkan suatu nilai-nilai untuk menentukan ukuran intensitas perilaku dan respon fisiologis hewan setelah pemberian obat. Efek-efek pada hewan dihitung dengan menggunakan sembilan tingkatan dengan skala 0-8. Pencatatan dilakukan pada waktu puncak respon yang ditentukan dari pengujian pendahuluan. Skor dasar untuk respon normal adalah 4, skor untuk respon subnormal adalah di bawah 4, skor untuk respon super normal adalah di atas 4, skor dasar untuk abnormal adalah 0 dan skor maksimal adalah 8 .

2. Metoda Thompson

Menurut metoda Thompson, aktifitas respon hewan terhadap obat dapat ditentukan dan dibagi dengan nilai angka yaitu untuk jenis respon normal diberi angka 1, respon subnormal diberi angka -1, respon super normal diberi



angka 2, respon abnormal diberi angka 3 atau 4, respon lemah atau tidak ada respon diberi angka 0 (Thompson,1985).

### 3. Metoda Malone-Robichaud

Modifikasi penyederhanaan dari metoda penapisan hipokratik ditentukan oleh Malone-Robichaud untuk mengatasi kesulitan dalam penilaian aktivitas respon hewan. Parameter respon hewan dibagi 2 jenis yaitu respon "ada atau tidak ada" dan respon "bertingkat". Untuk parameter respon ada atau tidak ada, diberi skor 1 untuk ada dan 0 jika tidak ada respon, sedangkan parameter dengan respon "bertingkat" diberi skor 1 sampai 3, dimana skor 1 untuk respon lemah, skor 2 untuk respon sedang dan skor 3 untuk respon kuat (Malone, 1977; Malone,1983 ).

## 2.8.Tinjauan Uji Toksisitas

Senyawa aktif biologis dapat dideteksi dengan menggunakan metoda *in vivo* atau *in vitro* melalui pendekatan aktifitasnya ( Bioassay Guided Isolation ). Beberapa kriteria yang harus dipenuhi untuk melakukan skrining bioassay yaitu cepat, tepat, dapat dipercaya, murah, membutuhkan sedikit sampel dan bisa dilakukan sendiri oleh peneliti yang memiliki pengalaman yang terbatas dalam melakukan bioassay secara mendalam ( Colegate,1982).

Senyawa aktif biologis hampir selalu toksik pada dosis tinggi oleh karena itu daya bunuh dari senyawa ini terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menapis ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktifitas (Colegate,1982).

Salah satu metoda yang digunakan untuk organisme ini adalah metoda "Brine Shrimps Lethality Assay" dimana metoda ini memiliki beberapa keuntungan yaitu (Colegate, 1982; Meyer, 1982):

- Murah : Hanya menggunakan hewan uji kista *Artemia salina*, alat dan bahan yang sederhana.
- Cepat : Waktu yang diperlukan hanya 3 hari untuk persiapan sampel dan pengujian.
- Mudah : Tidak memerlukan lingkungan aseptis dan tidak ada perlakuan khusus.
- Dapat dipercaya.

Metoda "Brine Shrimps" ini juga digunakan untuk berbagai sistim bioassay diantaranya untuk menganalisa residu peptisida, mikotoksin, polutan pada air sungai, anestetik, dan toksin dinoflagellata (Colegate, 1982; Meyer 1982).

Penyakit kanker adalah suatu jenis penyakit akibat terganggunya fungsi homeostatis pada organisme multiselular. Penyakit kanker ini muncul karena adanya faktor endogen dan faktor eksogen. Faktor endogen muncul karena adanya disposisi bawaan akibat terganggunya fungsi imun dan fungsi humoral sedangkan faktor eksogen muncul karena adanya bahan pengionisasi, karsinogen kimia dan virus onkogen (Colegate, 1982; Meyer, 1982).

Penggunaan bahan kimia dalam menangani penyakit kanker merupakan alternatif ke-3 setelah tindakan operasi dan penyinaran tidak dapat dilakukan lagi. Bahan kimia yang digunakan untuk terapi kanker ini bersifat mematikan atau

dapat menghambat pertumbuhan sel yang disebut dengan sitotoksik. Salah satu keuntungan sitotoksik ini adalah dia dapat mempengaruhi sel tumor ganas yang sudah menyebar (Colegate, 1982; Meyer, 1982).

Sebagai langkah awal dalam penemuan senyawa antikanker ini adalah ekstrak tumbuhan diuji aktifitas sitotoksiknya dengan berbagai konsentrasi secara *in vitro*. Ekstrak yang memiliki aktifitas sitotoksik yang paling kuat dapat dilanjutkan pengujiannya secara *in vivo* dengan menggunakan kultur sel seperti sel kanker payudara dan sel hati (Colegate, 1982; Meyer, 1982).

#### 2.8.1. Metoda Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps Lethality Assay"

Salah satu cara untuk menapis senyawa aktif biologis dari tanaman adalah dengan metoda Brine Shrimps yang menggunakan *Artemia salina*. Metoda ini pertama kali dilakukan oleh Meyer *et al* ( 1982 ). Penggunaan kista *Artemia salina* ini sebagai hewan uji mempunyai keuntungan antara lain telurnya mudah didapat, harganya murah, dapat disimpan dalam beberapa tahun ditempat kering, uji nya sederhana karena dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat dan zat uji yang digunakan bisa dalam jumlah yang kecil (Colegate, 1982; Meyer, 1982).

Telur *Artemia salina* Leach dimasukan kedalam air laut, larva yang digunakan setelah berumur 2 hari. Jumlah larva yang digunakan untuk pengamatan adalah 10 ekor untuk masing-masing vial. Senyawa murni yang akan diuji dibuat larutan dengan konsentrasi 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml. Kematian larva udang diamati setelah 24 jam . Data yang dihasilkan diproses dengan menggunakan metoda kurva untuk menghitung nilai LC<sub>50</sub> atau dapat juga menggunakan program komputer Finney. Suatu ekstrak menunjukkan aktifitas



sitotoksik bila harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  dan untuk senyawa murni  $LC_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$ . (Colegate, 1982; Meyer, 1982).

### 2.8.1. Siklus Hidup *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* Leach termasuk kelas Crustacea dalam sub kelas Branchiopoda. *Artemia salina* Leach berkembangbiak secara biseksual dimana populasinya terdiri dari jantan dan betina yang perkembangannya melalui proses perkawinan. Hasil perkembangbiakan dapat terjadi secara ovipar dan ovovivipar yang tergantung dari kondisi lingkungannya (Harefa, 1997). Pada ovovivipar yang keluar dari induknya berupa anak yang disebut dengan *nauphilus* dan terjadi bila kandungan oksigen cukup dan keadaan sanitasinya 80%. Sedangkan cara ovipar yang keluar dari induknya berupa telur yang bercangkang tebal yang disebut dengan kista. Ketika kista-kista tersebut dimasukan kedalam air laut, terjadilah proses embriogenesis dan akan menetas dalam 16-36 jam. Embrio tersebut awalnya masih ditutupi oleh membran luar, namun dengan cepat akan menjadi larva udang yang aktif dengan nama *nauphilus* yang bebas berenang. *Nauphilus* ini lah yang dipakai dalam pengujian toksisitas yang berumur 2 hari yang masih berwarna kemerahan. *Nauphilus* ini hanya bertahan selama 3 hari tanpa diberi makan karena masih memiliki cadangan makanan pada sisa kistanya. Hal ini jugalah yang menjadi alasan yang sangat sederhana kenapa dalam pengujian toksisitas menggunakan larva udang yang baru berumur 2 hari karena larva-larva tersebut tidak membutuhkan perawatan khusus selama pengujian (Harefa, 1997).

### 2.8.3. Metoda Perhitungan $LC_{50}$

Secara umum metoda penentuan  $LC_{50}$  ada dua macam yaitu metoda kurva dan metoda Farmakope Indonesia ed. III tahun 1979 . Kedua metoda ini berdasarkan pengukuran persentase individu yang responsive pada kisaran konsentrasi tertentu (Thompson, 1985; Anonymous, 1979).

#### 2.8.3.1. Metoda Kurva

Metoda ini dikembangkan oleh Miller dan Trainter yang menggunakan kertas log probit yang didesain bagi perhitungan dosis / respon. Garis vertikal menyatakan nilai probit dan persentase respon, dimana nilai probit pada sisi kiri sama dengan nilai 3 sampai 7. Sedangkan garis horizontal menyatakan dosis atau konsentrasi yang digunakan. Dari kurva baku dapat diturunkan harga  $LC_{50}$ . Tabel nilai probit dapat dilihat pada Tabel I.

#### 2.8.3.2. Metoda Farmakope Indonesia Edisi III

$LD_{50}$  atau  $LC_{50}$  dihitung secara matematika dengan menggunakan rumus :

$$m = a - b (\sum p_i - 0,5)$$

Dimana

$m = \text{Log } LC_{50} \text{ atau } LD_{50}$

$a = \text{Log dosis atau konsentrasi terendah yang masih menyebabkan jumlah kematian } 100 \% \text{ pada hewan percobaan.}$

$b = \text{Beda log dosis atau konsentrasi yang berurutan}$

$p_i = \text{Jumlah hewan yang mati menerima dosis, } i \text{ dibagi dengan jumlah hewan seluruhnya yang menerima dosis } i.$



Tabel I : Nilai probit sesuai besarnya persentase :

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	.....	2,674	2,946	3,119	3,249	3,555	3,445	3,524	3,595	3,659
10	3,718	3,773	3,825	3,874	3,920	3,964	4,005	4,046	4,085	4,122
20	4,158	4,194	4,228	4,261	4,294	4,326	4,357	4,387	4,417	4,447
30	4,476	4,504	4,532	4,560	4,597	4,615	4,642	4,668	4,695	4,721
40	4,747	4,773	4,798	4,824	4,849	4,900	4,925	4,950	4,950	4,975
50	5,000	5,025	5,050	5,075	5,100	5,126	5,151	5,202	5,202	5,227
60	5,253	5,279	5,305	5,332	5,358	5,385	5,413	5,468	5,468	5,496
70	5,524	5,553	5,583	5,613	5,643	5,674	5,706	5,772	5,772	5,806
80	5,842	5,878	5,915	5,954	5,994	6,036	6,080	6,175	6,175	6,227
90	6,282	6,341	6,405	6,476	6,555	6,645	6,751	6,881	7,054	7,326

Persyaratan untuk menggunakan metoda Farmakope Indonesia :

1. Menggunakan seri dosis atau konsentrasi dengan pengenceran berkelipatan tetap.
2. Jumlah hewan dalam tiap kelompok harus sama.
3. Dosis atau konsentrasi diatur sedemikian rupa sehingga memberikan efek dari 0% sampai 100% dan perhitungan dibatasi pada kelompok percobaan yang memberikan efek 0% sampai 100 %.

## 2.9. Metoda Pengujian Aktifitas Antimikroba

Metoda pengujian aktifitas antimikroba dibedakan atas:

### 1. Metoda Difusi

Metoda difusi merupakan metoda yang sederhana dalam pengujian aktifitas antimikroba. Pada teknik difusi ini pencadang (reservoir) mengandung sampel uji ( ekstrak tumbuhan / senyawa hasil isolasi ) yang ditempatkan pada permukaan medium yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Setelah inkubasi diameter daerah bening sekitar pencadang (diameter hambat ) diukur. Diameter hambat merupakan daerah inhibisi dari ekstrak sampel terhadap mikroba uji. Pencadang yang digunakan dapat berupa cakram kertas, silinder porselen atau baja tahan yang ditempatkan pada permukaan medium serta cetak lubang pada medium yang telah diinokulasi mikroba uji.

Metoda cakram kertas cocok untuk pengujian antibiotika larut air. Diameter daerah hambatan dapat dihubungkan dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dimana harga KHM dapat ditentukan dengan mengukur diameter daerah hambatan (Dey, 1991; Lorian, 1980).

### 2. Metoda Dilusi

Pada metoda dilusi, sampel uji dicampur dengan medium cair yang cocok yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan mikroorganisme dapat diamati secara visual atau dengan perbandingan turbidimetri / kekeruhan dari kultur uji dengan kultur

kontrol. Kultur kontrol adalah kultur yang tidak diberi sampel yang akan diuji bioaktivitasnya.

Metoda dilusi ini cocok untuk pengujian senyawa larut air, senyawa lipofilik murni, untuk penentuan harga KHM serta untuk mengamati kurva pertumbuhan normal mikroorganisme (Dey, 1991; Lorian, 1980).

### 3. Metoda Bioautografi

Metoda bioautografi adalah sebuah metoda untuk melokalisasi aktifitas antimikroba pada kromatogram. Prosedur umumnya berdasarkan teknik difusi dimana zat antimikroba berdifusi dari kromatogram lapisan tipis atau kromatogram kertas ke plat agar. Daerah hambatan kemudian dinampakkan dengan penampak noda yang cocok ( Dey, 1991).

Pemilihan jenis mikroba uji sebaiknya mewakili semua golongan mikroba patogen, seperti bakteri gram positif, bakteri gram negatif dan jamur.

#### 2.9.1. Bakteri

##### a. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* termasuk dalam famili Micrococcaceae. Selnya berbentuk sferis (bola) berdiameter 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ , terdapat tunggal atau berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombol yang teratur menyerupai anggur, tidak bergerak, tidak berspora, membentuk pigmen kuning emas dan bersifat gram positif dan anaerob fakultatif. Suhu optimum 35-40 °C. S. Aureus

tahan garam dan tumbuh baik pada medium yang mengandung 7,5 % NaCl (Fardiaz, 1989).

b. *Staphylococcus epidermis*

*Staphylococcus epidermis* juga termasuk famili Micrococcaceae. Dikenal juga dengan nama *Staphylococcus albus*. Koloninya berwarna putih atau kuning dan bersifat gram positif serta anaerob fakultatif. Suhu optimum pertumbuhan 37°C (James, 1992).

c. *Micrococcus luteus*

*Micrococcus luteus* termasuk dalam famili Micrococcaceae. Selnya berbentuk bola, berdiameter 0,5 – 3,5 µm, terdapat tunggal dan berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang hingga membentuk gerombolan tak teratur, tetrad atau paket berbentuk kubus, tidak bergerak, bersifat gram positif dan aerob. Suhu optimum pertumbuhan 25-30°C (James, 1992).

d. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* termasuk kedalam famili Pseudomonadaceae. Selnya berbentuk batang, terdapat tunggal dengan ukuran 0,5-1,0 µm x 1,5 – 4,0 µm, bergerak dengan flagellum, bersifat gram negatif dan aerob. Suhu optimum pertumbuhan 35°C (James, 1992).



## 2.9.2. Jamur

### a. *Trichophyton mentagrophytes*

Jamur ini tergolong Deuteromycetes, mempunyai makrokonida uniseluler berbentuk anggur, dinding tipis atau halus, berbentuk pensil (Volk, 1990).

### b. *Candida albicans*

Sel *candida albicans* berbentuk bulat atau bulat lonjong, menghasilkan hifa semu baik dalam biakan maupun dalam jaringan, memperbanyak diri dengan membentuk tunas, mudah ditumbuhkan pada suhu 25 - 37°C pada agar glukosa sabouraud (Volk, 1990).

## 2.10. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas

Akhir-akhir ini perhatian dunia kesehatan terhadap radikal bebas semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena radikal bebas dapat mengakibatkan kerusakan sel dan memicu timbulnya berbagai macam penyakit serta keadaan patologis lainnya. Pengertian radikal bebas sering dibaurkan dengan oksidan. Padahal secara kimia keduanya harus dibedakan (Tjokroprawiro, 1993).

Oksidan merupakan senyawa penerima electron (electron acceptor), contohnya  $Fe^{3+} + e \rightarrow Fe^{2+}$ , sedangkan radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki electron yang tidak berpasangan (unpaired electron). Kemiripan sifat antara oksidan dan radikal bebas dapat digolongkan sebagai oksidan. Tapi tidak semua oksidan dapat digolongkan sebagai radikal bebas.

Radikal bebas merupakan oksidan yang sangat kuat, tidak stabil dan sangat reaktif sehingga radikal bebas sulit untuk dideteksi (Fessenden & Fessenden, 1997). Sifat ini yang menyebabkan radikal bebas dapat memicu



kerusakan sel karena ia mampu menarik elektron dari sel. Peristiwa ini akan menimbulkan reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru.

Radikal bebas selain berasal dari luar juga diproduksi oleh tubuh sendiri. Sel-sel di dalam tubuh ini secara fisiologis memproduksi radikal bebas dalam metabolisme pokoknya. Namun disamping itu juga dimbangi oleh produksi zat antioksidan oleh tubuh sebagai suatu mekanisme pertahanan endogen. (Supari, 1994).

Pada kondisi normal tubuh berada dalam keseimbangan, akan tetapi pada keadaan tertentu keseimbangan ini terganggu dengan kata lain jumlah radikal bebas melebihi antioksidan. Kondisi ini disebut sebagai stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif inilah yang mendasari munculnya penyakit-penyakit dan kondisi patologis yang disebabkan oleh radikal bebas ( Supari , 1994).

Sumber radikal bebas ada dua macam (Salim, 1999; Santoso, 2001):

1. Secara endogen, sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh. Radikal bebas diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, endoplasmic retikulum dan inti sel.
2. Secara eksogen, radikal bebas didapat dari polusi yang berasal dari luar, bereaksi di dalam tubuh dengan jalan inhalasi, digesti (makanan), injeksi atau melalui penyerapan kulit. Contohnya adalah radikal bebas yang berasal dari asap rokok, polutan, radiasi, pestisida, hiperoksida dan obat-obatan contohnya klorpromazin.

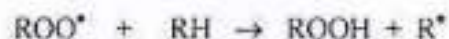
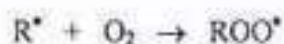
### 2.10.1. Tahap-tahap Reaksi Radikal Bebas

Reaksi berantai yang ditimbulkan oleh radikal bebas melalui beberapa tahapan antara lain (Fessenden & Fessenden, 1997):

1. Fase inisiasi yaitu fase pembentukan awal radikal bebas



2. Fase propagasi yaitu fase dimulainya terjadi reaksi berantai



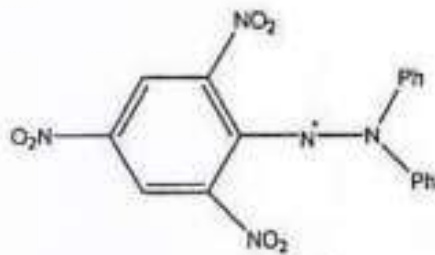
3. Fase terminasi yakni reaksi yang memusnahkan radikal bebas atau mengubah radikal bebas menjadi radikal bebas yang stabil dan tidak reaktif, dapat mengakhiri daur propagasi.



### 2.10.2. Radikal Bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (35)

DPPH adalah radikal bebas yang diperdagangkan serta stabil pada suhu kamar, bentuk serbuk berwarna kehitaman dan cepat teroksidasi oleh temperatur dan udara. DPPH dapat menerima elektron atau radikal hidrogen untuk menjadi molekul diamagnetik yang stabil. Karena adanya elektron sunyi maka larutan DPPH menunjukkan pita serapan yang kuat pada panjang gelombang 517 nm. Pada saat bereaksi dengan agen pereduksi, elektron sunyi dari radikal bebas menjadi berpasangan dan menyebabkan pengurangan serapan. Secara

stoikiometri, reaksi dapat diamati melalui perubahan warna larutan dari violet gelap menjadi larutan tidak berwarna (Sultanova, 2001).



(35)

### III. PELAKSANAAN PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan Juli 2003 – Agustus 2004, bertempat di Laboratorium Penelitian, Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Farmasi Fisika, dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas Padang.

#### 3.2. Bahan dan Peralatan

##### 3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan untuk pengerjaan isolasi : Seperangkat alat destilasi, seperangkat alat *rotari evaporator*, gelas ukur dengan berbagai ukuran, corong pisah, corong, penangas air, lemari pengering atau oven, plat tetes, tabung reaksi, lampu UV 254 nm (Betracher Camag<sup>®</sup>), kolom kromatografi, seperangkat alat kromatografi radial (Chromatotron Model 7024 Harrison Research USA), kertas saring, vial, spatel, pinset, aluminium foil, chamber, pipa kapiler, kapas, *Fisher-John Melting Point Aparatus*, spektrofotometer IR Perkin Elmer FTIR System, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu<sup>®</sup>), spektrofotometer RMI (<sup>1</sup>H dan <sup>13</sup>C), spektroskopi 2D (<sup>1</sup>H-COSY, HSQC, HMBC) dan spektrofotometer massa.

Alat untuk skrining farmakologi : *rotary rod*, *hot plate*, *stopwatch*, *plateform*, alat suntik 1 ml, jaring kawat, kaca pembesar, senter kecil, timbangan digital, timbangan mencit, termometer rectum, jarum oral, mortil, stamfer, misai, termometer, kawat gelantung.



Alat untuk pengerjaan uji aktifitas "Brine Shrimps Lethality Assay" antara lain : wadah pembiakan larva, pipet mikro, pipet tetes dan vial yang telah dikalibrasi.

Alat untuk pengerjaan uji aktifitas antimikroba dan uji antioksidan: Petridisk, pipet mikro berbagai ukuran, kertas cakram, *Autoclav All American model 25X*, lemari aseptis, magnetik stirer, kertas cakram, vorteks, jarum Ose, pinset, lampu spritus, spektronik -21, inkubator, kain kasa, jangka sorong, pipet gondok.

### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan pada pengerjaan isolasi adalah daun *Picrasma javanica* Bl, air suling, metanol, n-heksana, etil asetat, n-butanol, kloroform, diklorometana, silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ), silika gel 60 PF 254, silika gel 60 GF 254, asam sulfat pekat, logam magnesium, besi (III) klorida, asetat anhidrat, asam klorida pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Liebermann-Burchard.

Bahan untuk pengerjaan uji skrining farmakologi, uji aktifitas "Brine Shrimps", antimikroba dan antioksidan antara lain: metanol, dimetil sulfoksida (DMSO), air laut, kista udang *Artemia salina* berasal dari Great Salt Lake Utah yang diproduksi oleh *Sanders Brine Shrimps Company*, Utah, Amerika Serikat., natrium klorida 0,9 %, etanol, klotrimazol, tetrasiklin, media NA (Nutrient Agar)(Merck®) dengan komposisi: pepton daging 5 g, ekstrak daging 3 g, agar 12 g, media SDA (Sabouroud Dekstroza Agar) (Merck®) dengan komposisi : pepton 10 g, glukosa 40 g, agar 15 g. Biakan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC



9342, biakan bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 8739, biakan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 5431 (Biofarma, Bandung), DPPH, Na CMC.

### 3.3. Prosedur Penelitian

#### 3.3.1. Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Sampel berupa daun segar *Picrasma javanica* Bl yang diambil didaerah Baso, Bukittinggi, Sumatera Barat pada bulan Juli 2003. Identifikasi dilakukan di herbarium Universitas Andalas (AND) Padang dengan nomor koleksi DA 230.

#### 3.3.2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Daun tumbuhan *Picrasma javanica* Bl dipisahkan dari rantingnya, dibersihkan, dirajang dan ditimbang sebanyak 5 kg. Daun ini dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol, proses maserasi dilakukan dalam botol gelap masing-masing selama 3x5 hari sambil sekali-kali dikocok. Hasil maserasi diuapkan *in vacuo*, didapatkan ekstrak kental metanol kemudian diasamkan dengan asam asetat 5%. Sari asam ini diuapkan semalam dan disaring, diperoleh endapan dan larutan asam/air (I). Endapan diasamkan lagi dengan asam asetat 5%, diuapkan dan disaring. Diperoleh endapan dan larutan asam/air (II). Larutan asam/air I dan II digabung. Endapan dilarutkan dalam metanol : aquadest (2:1) kemudian difraksinasi dengan n-heksana diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi metanol/air. Fraksi metanol/air difraksinasi dengan etil asetat diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi MeOH/air (a). Fraksi etil asetat dicuci dengan aquadest diperoleh

fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi air digabung dengan fraksi metanol/air (a) diatas kemudian difraksinasi dengan n-butanol diperoleh fraksi n-butanol dan fraksi sisa.

Fraksi asam/air I dan II digabung kemudian difraksinasi dengan n-heksana., biarkan sampai terbentuk dua fraksi yaitu fraksi n-heksana dan fraksi asam/air. Fraksi n-heksana dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan rotari evaporator hingga diperoleh fraksi kental n-heksana.

Fraksi asam/air sisa dari fraksinasi n-heksana difraksinasi dengan menggunakan pelarut etil asetat hingga terbentuk dua lapisan yaitu fraksi etil asetat (asam) dan fraksi sisa. Fraksi etil asetat (asam) dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotari evaporator sehingga didapatkan berat kental fraksi ini. Fraksi sisa ditambah amoniak sampai pH 8-9 kemudian difraksinasi lagi dengan etil asetat diperoleh fraksi etil asetat (basa) dan fraksi sisa. Fraksi sisa dinetralkan dengan asam asetat kemudian difraksinasi dengan butanol sampai terbentuk dua lapisan yaitu fraksi butanol dan fraksi sisa. Fraksi butanol dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator untuk mendapatkan berat kental fraksinya.

Jenis fraksi yang sama digabung sehingga diperoleh berat total untuk semua jenis fraksi dan diuji aktifitas farmakologinya bersama-sama dengan ekstrak metanol meliputi uji skrining hipokratik, uji toksisitas dengan metoda "Brine Shrimps Lethality Assay", uji antimikroba dan uji antioksidan dengan metoda radikal bebas DPPH.

Fraksi etil asetat (asam) gabungan (50 g) selanjutnya dikromatografi cair vakum menggunakan fase diam silika gel BDH-40-63  $\mu\text{m}$  dan fase gerak

n-heksana, etil asetat dan metanol dengan system SGP (Step Gradient Polarity). Setiap fraksi yang keluar ditampung dengan botol ukuran 200 ml dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan penampak noda lampu UV 254 nm. Fraksi dengan pola noda yang sama ( $R_f$  yang sama) digabung dan dipekatkan sehingga diperoleh fraksi A, B, C, D dan fraksi E. Fraksi A (6 g) yang pola pemisahannya cukup baik dibanding yang lainnya dikromatografi kolom dengan fase diam silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ). Silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ) disuspensikan dengan menggunakan pelarut n-heksana diaduk homogen kemudian dimasukkan kedalam kolom kromatografi yang ujungnya telah diberi kapas. Sampel disiapkan secara preadsorpsi dengan melarutkannya dalam metanol dan ditambah silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ) sebanyak 6 g, pelarut diuapkan dengan rotari evaporator sampai kering lalu dikerok dengan spatel. Hasil preadsorpsi dimasukkan kedalam kromatografi kolom lalu dielusi dengan menggunakan fase gerak yang kepolarannya ditingkatkan secara bertahap yaitu pelarut n-heksana, n-heksana-etil asetat, etil asetat, etil asetat-metanol dan metanol. Hasil kromatografi ditampung dengan vial. Tiap fraksi dimonitor dengan KLT dan penampak noda lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Fraksi dengan pola noda yang sama digabung sehingga diperoleh fraksi Aa (vial 1-7), Ab (vial 8-23), fraksi Ac (vial 24-31), fraksi Ad (vial 32-34), fraksi Ae (vial 35-40) dan fraksi Af (41-96). Hasil monitor ketujuh fraksi tersebut memperlihatkan fraksi Ad memiliki noda yang kuat intensitasnya dan pemisahannya cukup jelas dibanding dengan noda yang lainnya.

Fraksi Ad (1,87 g) dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ) dan fase gerak n-heksana, n-



heksana-etil asetat, etil asetat, etil asetat-metanol, metanol menggunakan sistem kepolaran bertingkat. Fraksi yang keluar ditampung dalam vial, tiap fraksi dimonitor dengan KLT dan penampak noda lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Vial dengan pola noda yang sama digabung sehingga didapatkan fraksi Ad1 (vial 1-20) dan fraksi Ad2 (vial 21-47).

Dari hasil monitor dengan KLT, fraksi Ad1 memiliki satu noda utama yang bagus pemisahannya sehingga fraksi ini dilanjutkan pengerjaannya. Fraksi Ad1 (0,243 g) dipisahkan dengan kromatografi radial menggunakan fase diam silika gel PF 254 dan fase gerak n-heksana-etilasetat (8:2, 7:3, 6:4), etil asetat dan metanol. Hasil kromatografi radial ditampung dalam vial, tiap fraksi dimonitor dengan KLT dan penampak noda lampu UV 254 nm. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabung dan diperoleh fraksi Ad1" dan Ad2". Fraksi Ad1" dipreparatif menggunakan fase diam silika gel PF 254 dan diklorometana - metanol (19:1) sebagai fase gerak kemudian terbentuk pita yang dapat dilihat dibawah lampu UV 254 nm lalu pita tersebut dikerik dan ditampung dalam vial dan dilarutkan dalam etil asetat lalu disaring, sehingga didapatkan larutan bening dan dibiarkan menguap sehingga didapatkan amorf berwarna putih.

Amorf ini direkristalisasi menggunakan etil asetat dan n-heksana sehingga diperoleh senyawa murni V-1 berupa kristal jarum berwarna putih sebanyak 0,054 g yang dimonitor dengan KLT menggunakan fase gerak n-heksana-etil asetat (3:2) memperlihatkan satu noda dibawah lampu UV 254 nm.

### 3.3.3. Pemeriksaan Kandungan Kimia ( Harborne,1987)

Pemeriksaan kandungan kimia dilakukan terhadap ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol 1 g dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 5 ml air suling dan 5 ml  $\text{CHCl}_3$ , dikocok, biarkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan air diambil untuk uji senyawa flavonoid, saponin, dan fenolik. Lapisan kloroform digunakan untuk uji senyawa terpenoid, steroid, dan alkaloid.

a. Uji flavonoid

Ambil 1-2 tetes lapisan air teteskan pada plat tetes lalu tambahkan serbuk Mg dan 1-2 tetes HCl pekat. Timbulnya warna merah mengindikasikan adanya flavonoid.

b. Uji saponin

Lapisan air diambil dimasukkan dalam tabung reaksi lalu dikocok sampai terbentuk busa yang tidak hilang selama 5 menit, yang menandakan adanya saponin

c. Uji fenolik

Lapisan air ditetaskan 1-2 tetes pada plat tetes lalu ditambahkan 1-2 tetes  $\text{FeCl}_3$ , terbentuknya warna hijau menunjukkan adanya fenolik.

d. Uji terpenoid dan steroid

Lapisan  $\text{CHCl}_3$  ditetaskan pada plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Setelah kering, ditambahkan asetat anhidrat dan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Terbentuknya warna merah mengindikasikan adanya terpenoid dan warna biru menunjukkan adanya steroid.



e. Uji alkaloid

Lapisan kloroform diambil 2-3 tetes lalu dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi Mayer. Positif adanya alkaloid bila terbentuk endapan putih.

### 3.3.4. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Pemisahan dan pemurnian senyawa dilakukan dengan kromatografi kolom, kromatografi radial dan rekristalisasi.

### 3.3.5. Uji Bioaktivitas Skrining Hippokratik

#### 3.3.5.1. Persiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit putih jantan galur DDY Japan. Sebelum percobaan mencit terlebih dahulu diaklimatisasi selama 1 minggu. Hewan percobaan dinyatakan sehat apabila selama aklimatisasi tidak menunjukkan perubahan berat badan lebih dari 10 % dan secara visual tidak memperlihatkan gejala penyakit (Annonymous, 1979).

#### 3.3.5.2. Penentuan Dosis

Dosis yang digunakan untuk penapisan hippokratik terhadap ekstrak metanol adalah 100,300,1000 mg/kg BB, sedangkan untuk senyawa hasil isolasi V-1 adalah 300 mg/kg BB (Thompson, 1985).

#### 3.3.5.3. Pembuatan Sediaan Uji

Ekstrak metanol daun *Picrasma javanica* Bl disuspensikan dengan Na CMC 0,5 %, dengan cara :

- Na CMC ditimbang sebanyak 50 mg, lalu dikembangkan dengan air panas sebanyak 20 kali berat Na CMC, kemudian digerus hingga homogen.
- Ekstrak metanol daun *Picrasma javanica* Bl ditimbang sesuai dengan variasi dosis, kemudian masing-masing ekstrak yang telah ditimbang digerus dalam lumpang, lalu ditambahkan sedikit demi sedikit larutan Na CMC 5 %, gerus sampai homogen.

Volume sediaan uji yang diberikan pada hewan percobaan yaitu 1 % dari berat badan hewan.

#### 3.3.5.4. Penapisan Aktifitas Farmakodinamik dengan Metoda Malone-Robichaud (Malone, 1977)

Hewan percobaan dikelompokkan secara acak menjadi 3 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 3 mencit. Hewan percobaan ditimbang dan diberi tanda. Setiap hewan pada masing-masing kelompok diinjeksikan secara intraperitoneal dengan sediaan uji. Dosis yang diberikan adalah 100, 300, 1000 mg/kg BB. Kemudian 44 parameter respon hewan percobaan tersebut diamati pada waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit, 30 menit, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 24 jam, dan 48 jam setelah penyuntikan. Pencatatan parameter dengan respon "ada" diberi skor 1 atau "tidak ada" diberi skor 0, sedangkan respon bertingkat diberi nilai 1 untuk respon lemah, 2 untuk respon sedang, dan 3 untuk respon kuat (lampiran 4). Sebagai kontrol digunakan hewan percobaan itu sendiri sebelum penyuntikkan sampel. Laju pernafasan dihitung dengan *stop watch*, kesadaran diukur dengan *rotary rod*, tonus otot dilihat dari kekuatan hewan mencengkram *jaringan kawat*, analgetik dilihat dengan *hot plate* pada suhu 55-60 °C, reflek mata dan kornea

dengan menggunakan *musai* dan reaksi jepit ekor dengan menggunakan *pinsset*. Perhitungan respon dihitung dengan metoda Malone-Robichaud. Dengan cara yang sama skrining juga dilakukan terhadap senyawa V-1, dengan dosis pemberian 300 mg/kg BB.

### 3.3.6 Uji Aktifitas "Brine Shrimps" terhadap Ekstrak dan Fraksi ekstrak (Colegate, 1982)

#### a. Pembenuhan hewan

Hewan percobaan yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* Leach. Larva ini diperoleh dengan cara menetasakan telur udang *Artemia salina* selama 48 jam pada wadah pembiakan sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara memasukan kista *Artemia salina* Leach kedalam air laut dan ditempatkan pada bagian gelap dari wadah. Setelah menetas, larva akan berenang ketempat yang terang.

#### b. Persiapan ekstrak dan fraksi uji

Siapkan 9 vial uji dan 3 vial kontrol yang telah dikalibrasi 5 ml. Vial uji ditandai dengan konsentrasi 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml. Masing-masing sebanyak 3 vial.

Persiapan larutan induk dilakukan dengan menimbang masing – masing 40 mg ekstrak dan fraksi kemudian dilarutkan dalam 4 ml metanol (10 mg/ml). Larutan induk ini dimasukkan kedalam vial uji masing masing sebanyak 500 µl dan 50 µl dengan konsentrasi 1000 µg/ml dan 100 µg/ml sedangkan larutan dengan konsentrasi 10 µg/ml dibuat dengan memipet

50  $\mu$ l larutan uji 1000  $\mu$ g/ml. Sebagai kontrol disiapkan 3 vial yang tidak diisi larutan sampel. Selanjutnya vial yang berisi larutan sampel dibiarkan sampai pelarut menguap tambahkan 50  $\mu$ l DMSO kedalam vial uji dan vial kontrol, setelah sampel bercampur dengan DMSO tambahkan 2 ml air laut pada masing- masing vial.

c. Uji toksisitas dengan menghitung  $LC_{50}$

Dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva udang yang baru menetas kedalam vial uji dan vial kontrol, kemudian volumenya dicukupkan 5 ml dengan air laut. Letakkan ditempat yang cukup cahaya. Setelah 24 jam, dihitung jumlah larva yang mati. Nilai  $LC_{50}$  ditentukan dengan menggunakan metoda Finney.

### 3.3.7. Pemeriksaan Aktifitas Antimikroba Dengan Metoda Difusi Agar

#### 3.3.7.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. Tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, vial dan pipet ditutup mulutnya dengan kapas steril, kemudian dibungkus dengan perkamen, kertas cakram dimasukan kedalam salah satu cawan Petri dan semua cawan Petri dibungkus terpisah dengan perkamen. Kemudian semua alat disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}$  C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara flambier pada lampu spiritus. *Laminar Air Flow Cabinet* disterilkan dengan menyalakan lampu UV nya selama lima menit.



### 3.3.7.2. Pembuatan Media Pembelian

#### 1. Nutrien Agar (NA) (Merck<sup>®</sup>)

Sebanyak 20 gram serbuk Nutrien Agar, dicampur dengan 1 liter air suling dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hot plate* menggunakan magnetik stirer sampai terbentuk larutan jernih. Kemudian disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### 2. Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) (Merck<sup>®</sup>)

Sebanyak 65 gram SDA dicampur dengan 1 liter air suling dalam erlenmeyer dan dipanaskan diatas *hot plate* menggunakan magnetik stirer sampai terbentuk larutan jernih. Kemudian disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

### 3.3.7.3. Peremajaan Mikroba Uji

Mikroba uji dari stok kultur murni ditanam pada agar miring NA dan SDA, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C untuk bakteri, dan 72 jam pada suhu kamar 25-27° C untuk jamur ( Dwidjoseputro, 1982).

### 3.3.7.4. Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Koloni mikroba uji diambil dari agar miring 1-2 Ose lalu disuspensikan dalam NaCl fisiologis steril dalam tabung reaksi steril, kemudian dihomogen dengan vorteks. Kekeruhan atau konsentrasi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga diperoleh suspensi dengan transmittan 25 % pada panjang gelombang 580 nm untuk bakteri dan transmittan 90 % pada panjang gelombang 530 nm untuk jamur (Dwidjoseputro, 1982).



### 3.3.7.5. Pembuatan sampel Uji

Masing-masing fraksi n-heksana, etil asetat dan n-butanol ditimbang masing-masing seberat 5 mg kemudian dilarutkan dalam metanol 500 µl sehingga didapatkan konsentrasi 1 % b/v. Untuk ekstrak metanol dibuat 10 % b/v dengan melarutkan 50 mg ekstrak dalam 500 µl metanol dan senyawa V-1 dibuat pada konsentrasi 0,05 % (Marshall, M.S, 1951).

### 3.3.7.6. Pengujian Aktifitas Antimikroba

Sebanyak 0,1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan ke dalam cawan Petri kemudian ditambahkan 12 ml media NA untuk bakteri dan media SDA untuk jamur, lalu dihomogenkan dengan cara cawan Petri digoyang-goyang hingga homogen. Setelah media memadat diletakkan kertas cakram steril dan ditetesi dengan 10 µl larutan uji menggunakan pipet mikro diatas permukaan media. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri dan selama 72 jam pada suhu kamar (25-27°C) untuk jamur. Diamati adanya pertumbuhan mikroba uji dan diukur diameter daerah hambatan dengan jangka sorong. Sebagai kontrol digunakan kertas cakram steril yang telah ditetesi dengan metanol sebanyak 10 µl. Sebagai pembanding untuk antibakteri digunakan larutan tetrasiklin 0,3% dan untuk antijamur digunakan larutan klotrimazol 0,1% masing masing sebanyak 10 µl/cakram (Dwidjoseputro, 1982).

### **3.3.8. Pengujian Aktifitas Antioksidan dengan metode Pembentukan Radikal DPPH (Santi Y, Hayati R, 2002).**

#### **3.3.8.1. Pembuatan Pereaksi DPPH**

Ditimbang sebanyak 1,97 mg DPPH kemudian dilarutkan dalam 100 ml metanol pa dalam labu ukur 100 ml sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 0,05 mM.

#### **3.3.8.2. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH**

Sebanyak 3,8 ml larutan DPPH 0,05 mM dipipet dan ditambahkan dengan 0,2 ml metanol. Setelah dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm.

#### **3.3.8.3. Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan**

Sampel berupa ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol masing-masing ditimbang 10 mg kemudian dilarutkan dengan 10 ml metanol dalam labu ukur 10 ml. Senyawa V-1 ditimbang sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 ml metanol sehingga didapatkan konsentrasi larutan sampel 1 mg/ml.

Untuk penentuan aktifitas antioksidan, dipipet 0,2 ml larutan sampel dengan pipet mikro kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3,8 ml larutan DPPH 0,05 mM. Campuran larutan dihomogenkan dengan vorteks dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui penghitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100 \%$$

Abs kontrol : serapan radikal DPPH 0,05 mM pada panjang gelombang 517 nm.

Abs sampel : serapan sampel dalam radikal DPPH 0,05 mM pada panjang gelombang maksimum (517 nm).

Untuk pembandingan digunakan asam askorbat dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Hasil

1. Pemeriksaan pendahuluan kandungan metabolit sekunder ekstrak metanol daun *Picrasma javanica* Bl memperlihatkan adanya senyawa alkaloid, fenolik dan saponin. (Lampiran 2)
2. Dari 5 kg daun segar *Picrasma javanica* Bl diperoleh fraksi kental heksana seberat 61,1 g (1,22, %), fraksi etil asetat 99 g (1,98 %) dan berat fraksi butanol 21,97 g (0,44 %). (Lampiran 3)
3. Dari skrining hippokratik ekstrak metanol daun *Picrasma javanica* Bl dengan 3 variasi dosis (100,300,1000 mg/kgBB) terlihat adanya aktifitas farmakologi yang nyata. Aktifitas tersebut meningkat dengan naiknya dosis, secara berurutan memberikan aktifitas penekanan SSP ( 15,73 %, 20,35 %, 21,79 %), relaksasi otot (22,85 %, 28,72 %, 31,45 %). Dari skrining hippokratik senyawa V-1 memberikan aktifitas penekanan SSP 17,17 % dan relaksasi otot 22,85 %. (Lampiran 8)
4. Uji toksisitas (penentuan  $LC_{50}$ ) terhadap ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan senyawa V-1 memperlihatkan fraksi n-heksana memiliki toksisitas  $LC_{50}$  lebih tinggi yaitu 2,40  $\mu\text{g/ml}$  diikuti berturut-turut oleh senyawa V-1 64,97  $\mu\text{g/ml}$ , fraksi etil asetat 78,77  $\mu\text{g/ml}$ , fraksi n-butanol 166,02  $\mu\text{g/ml}$  dan ekstrak metanol 282,24  $\mu\text{g/ml}$ . (Lampiran 10)



5. Pemeriksaan pendahuluan aktifitas antimikroba ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan senyawa V-1 memperlihatkan aktifitas antimikroba (antijamur) pada fraksi etil asetat dengan diameter daerah hambat terhadap pertumbuhan jamur uji berkisar 14,23 – 14,80 mm. Sedangkan terhadap bakteri uji, ekstrak metanol, fraksi-fraksi ekstrak dan senyawa V-1 tidak memperlihatkan aktifitas antibakteri samasekali. (Lampiran 12)
6. Uji aktifitas antioksidan terhadap ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat, n-butanol dan senyawa V-1 memperlihatkan persentase inhibisi berturut-turut sebesar 82,19 %, 81,64 %, 78,57%, 87,07 % dan 95,37 % pada konsentrasi 1mg/ml terhadap DPPH 0,05 mM. (Lampiran 14)
7. Hasil isolasi fraksi etil asetat (50 g) diperoleh senyawa murni V-1 berbentuk kristal berwarna putih sebanyak 0,054 g, jarak leleh 189-190°C yang larut dalam etil asetat dan metanol. (Lampiran 15)
8. Pemeriksaan spektrum UV dari senyawa V-1 memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 224,5 nm dan 275,0 nm.  
(Lampiran 17)
9. Pemeriksaan spektrum IR senyawa V-1 dengan pellet KBr memperlihatkan serapan pada bilangan gelombang 3400  $\text{cm}^{-1}$  adanya regang OH, 1750  $\text{cm}^{-1}$  adanya C=O, 1650  $\text{cm}^{-1}$  adanya C=C.  
(Lampiran 18).
10. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa V-1 dalam  $\text{CD}_3\text{OD}$  memberikan 4 buah sinyal singlet pada 7,06 ppm menunjukkan adanya proton pada cincin aromatis,



sinyal pada 3,84 ppm menunjukkan adanya atom H yang berasal dari gugus OCH<sub>3</sub>. (Lampiran 19)

11. Spektrum <sup>13</sup>C-RMI senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD menunjukkan senyawa ini memiliki 8 buah atom karbon yang terdiri dari 5 buah atom karbon kuarterner pada pergeseran kimia 167,86 ppm, 145,35 ppm, 138,62 ppm, 120,28 ppm, 2 buah atom C tersier pada pergeseran kimia 108,87 ppm dan 1 buah atom C primer pada pergeseran kimia 51,08 ppm.

(Lampiran 21)

12. Spektrum massa senyawa V-1 menunjukkan senyawa ini mempunyai bobot molekul 184,7 dengan rumus molekul C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>. (Lampiran 25)

#### 4.2. Pembahasan

Isolasi senyawa metabolit sekunder dari daun *Pterocarpus javanicus* Bl dimulai dari perajangan sampel segarnya. Perajangan ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan sampel agar kontak antara pelarut dengan sampel semakin luas tanpa merusak dinding sel sehingga mempermudah penetrasi pelarut kedalam membran sel dan proses pelarutan senyawa yang terkandung didalam sampel (proses osmosis). Penyarian sampel dilakukan dengan cara maserasi karena maserasi merupakan prosedur sederhana untuk mendapatkan ekstrak karena hanya dengan merendam sampel dalam pelarut selama beberapa hari dan sesekali dikocok. Metanol digunakan sebagai pelarut dalam maserasi ini karena metanol merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa organik dalam tumbuh-tumbuhan baik polar maupun non polar. Ekstrak metanol yang diperoleh diuapkan pelarutnya secara *in vacuo*, karena dalam keadaan

vakum tekanan uap pelarut akan menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi kerusakan senyawa termolabil yang ada dalam sampel.

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yang dimulai dari n-heksana, etil asetat dan n-butanol. Pelarut n-heksana akan menarik senyawa-senyawa non polar seperti lemak, lilin dan klorofil. Komponen yang tidak larut dalam n-heksana selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat yang akan menarik senyawa semi polar sedangkan senyawa polar akan ditarik oleh pelarut butanol. Fraksi yang didapatkan dipekatkan *in vacuo* sehingga didapat ekstrak kental untuk tiap fraksi.

Fraksi etil asetat selanjutnya dikromatografi cair vakum (Flash Kromatografi) menggunakan fase diam silika gel BDH (40-63  $\mu\text{m}$ ) dan fase gerak n-heksana, etil asetat dan metanol dengan sistem SGP ( Step Gradient Polarity) yaitu dengan menggunakan kombinasi pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara bertahap sehingga didapatkan pemisahan yang baik lalu dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan dilihat dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Pada KLT adsorpsi fase normal, senyawa-senyawa yang non polar akan naik lebih cepat dan yang lebih polar akan naik lebih lambat. KLT dapat digunakan untuk analisa komponen senyawa dalam suatu campuran, untuk menentukan pelarut yang baik dalam pemisahan pada kromatografi kolom, untuk memonitor hasil pemisahan dan untuk menentukan apakah hasil penumian sudah murni atau belum.

Pemurnian senyawa dilakukan dengan kromatografi radial yang bagus untuk pemisahan campuran senyawa –senyawa dimana pola kromatogramnya pada KLT menunjukkan pola yang berdekatan yang sukar dipisahkan dengan kromatografi kolom biasa. Pada prinsipnya kromatografi radial merupakan kromatografi lapis tipis preparatif dengan aliran fase gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal.

Fraksi yang telah menunjukkan satu noda pada kromatografi lapis tipis selanjutnya direkristalisasi dengan menggunakan campuran pelarut n-heksana dan etil asetat sehingga diperoleh senyawa murni yang telah menunjukkan satu noda pada KLT. Dari fraksi etil asetat ini didapatkan senyawa murni V-1 yang berupa kristal putih.

Pada skrining hippokratik digunakan metoda Malone-Robichaud yang dimodifikasi. Pemilihan metoda ini merupakan modifikasi dan penyederhanaan dari skrining hipokratik yang dapat mengatasi kesulitan dalam pemberian skor /nilai pada parameter yang muncul. Dalam metoda ini parameter yang muncul dibagi dalam 2 kelompok yaitu parameter ada atau tidak ada, diberi skor 1 atau 0. Sedangkan untuk parameter kuantitatif juga diberi nilai skor sesuai dengan bobot efek yang ditimbulkan. Pemberian nilai dengan cara ini lebih mudah dibanding metoda lainnya.

Dosis yang digunakan pada uji aktifitas farmakologi ini adalah dosis 100,300,1000 mg/kg BB, hal ini karena pada uji pendahuluan efek timbul pada dosis 1000 mg/kg BB. Dosis ini lalu diturunkan secara bertingkat sesuai dengan rumus Thomson. Dipilih hanya 3 variasi dosis, dengan pertimbangan pada dosis



yang lebih kecil efek tidak akan kelihatan. Dosis untuk senyawa uji V-1 digunakan 300 mg/kg BB karena pada dosis tersebut parameter yang muncul bisa diamati.

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit, karena mencit mudah didapat, mudah ditangani dan harganya murah, disamping itu dengan mencit respon yang diamati sudah dapat dilihat dengan jelas. Pemberian ekstrak dilakukan secara intraperitoneal, tujuannya agar respon yang diamati muncul pada waktu yang cepat, karena cara ini memberikan penyerapan yang cepat di pembuluh darah. Selain itu cara ini lebih mudah dibandingkan dengan cara lain.

Dari hasil skrining terhadap ekstrak metanol dan senyawa V-1 dari daun *Pterocarpus javanicus* Bl, diperoleh efek penekanan SSP dan relaksan otot. Relaksan otot muncul dalam persentase yang cukup besar, diduga senyawa bekerja menghambat enzim kolinesterase di daerah celah sinaptik, sehingga meningkatkan aktifitas kolinergik dan merangsang reseptor kolinergik secara terus menerus menyebabkan terjadinya kekosongan asetilkolin pada vesikel atau memblokir reseptor asetilkolin pada membran otot secara antagonis kompetitif (Ganiswara, 1995).

Efek penekanan SSP yang timbul diperkirakan akibat pengaruh ekstrak yang menekan jaringan peka rangsangan pada sel somatik saraf dengan jalan menstabilkan membran sel saraf, sehingga terjadi penurunan jumlah neurotransmitter eksitasi yang dibebaskan oleh impuls saraf otak. (Mutschler 1991).

Aktifitas yang diperoleh dari penapisan hipokratik merupakan informasi pendahuluan yang harus diteliti lebih lanjut melalui uji spesifik supaya dapat diketahui aktifitas yang benar-benar dapat dikembangkan.

Pengujian aktifitas antimikroba menggunakan 7 jenis mikroba uji yang mewakili golongan bakteri gram positif dan gram negatif serta jamur yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 9342, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 5431. Dasar pemilihan mikroba uji adalah berdasarkan latar belakang penggunaan secara tradisional dari daun *Picrasma javanica* Bl yang digunakan untuk mengobati penyakit kulit, colics, vermifuge, febrifuge. Disamping itu ketujuh mikroba uji yang digunakan adalah mikroba yang patogen, menginfeksi kulit manusia dan terdapat disaluran pencernaan.

Metoda yang digunakan untuk uji antimikroba adalah metoda difusi agar menggunakan kertas cakram sebagai pencadang (reservoir). Metoda difusi agar ini merupakan metoda yang sederhana, jumlah sampel yang dibutuhkan lebih sedikit dan hasil yang didapat cukup teliti untuk uji semikuantitatif (Barry, 1980).

Dari hasil pengujian antimikroba memperlihatkan bahwa ekstrak metanol fraksi etil asetat dan butanol memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes*, fraksi n-heksana memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan *Candida albicans*, sedangkan senyawa V-1 sendiri tidak memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan mikroba uji.



Aktifitas anti mikroba ekstrak metanol, fraksi n-heksan dan fraksi butanol terhadap pertumbuhan mikroba uji adalah lemah, karena memiliki diameter daerah hambatan 10-11,30 mm, sedangkan fraksi etil asetat adalah fraksi yang paling aktif dalam menghambat pertumbuhan mikroba uji dengan diameter daerah hambatan 14,23-14,80 mm sedangkan senyawa murni V-1 tidak memberikan daerah hambatan sama sekali. Aktivitas anti mikroba dikatakan lemah apabila memiliki diameter daerah hambatan 7-11 mm, aktifitas sedang jika diameter hambatan 12-16 mm dan aktifitas kuat jika diameter daerah hambatan besar dari 17mm (Ontengco, 1996).

Diameter daerah hambatan ekstra metanol, fraksi-fraksi dan senyawa murni V-1 dibandingkan dengan suatu antibiotik pembanding tetrasiklin 0,3 % untuk bakteri dan klotrimazol 0,1% untuk jamur bertujuan untuk melihat sensitifitas ekstrak metanol dan masing-masing fraksi terhadap mikroba uji. Penggunaan tetrasiklin sebagai pembanding karena merupakan antibiotik yang mempunyai spektrum luas dan aktif menghambat bakteri gram (+) dan gram (-) yang bekerja menghambat sintesa protein pada ribosomnya, sedangkan klotrimazol merupakan anti jamur yang aktif terhadap jamur sistemik dan jamur dermatofit dan biasa digunakan secara topikal (Ganiswara, 1995; Reeves, 1978).

Penentuan  $LC_{50}$  dengan metoda "Brine Shrimps" dipilih karena metoda ini merupakan skrining awal terhadap ekstrak, fraksi-fraksi ataupun senyawa murni yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Pengujian dengan cara ini memiliki beberapa keuntungan yaitu cepat, murah, mudah penyajiannya, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya (Meyer, 1982).

Metoda ini menggunakan larva *Artemia salina* sebagai hewan percobaan karena mempunyai beberapa keuntungan antara lain telurnya mudah didapat, murah dapat disimpan beberapa tahun ditempat kering dan memiliki sensitifitas yang lebih tinggi terhadap senyawa toksik ( Anderson, 1991 ).

Untuk melarutkan ekstrak, fraksi-fraksi dan senyawa murni dalam pengujian toksisitas digunakan metanol, karena metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa dan mudah menguap. Penambahan DMSO kedalam vial uji bertujuan untuk melarutkan senyawa yang sukar larut dalam air laut, sehingga dapat terdistribusi secara merata.

Dari hasil pengujian menggunakan metoda "Brine Shrimps" ini memperlihatkan ekstrak metanol mempunyai  $LC_{50} = 282,24 \mu\text{g/ml}$ , fraksi n-heksan  $LC_{50} = 2,41 \mu\text{g/ml}$ , fraksi etil asetat  $LC_{50} = 78,77 \mu\text{g/ml}$ , fraksi n butanol  $LC_{50} = 166,02 \mu\text{g/ml}$  dan senyawa murni V-1 mempunyai  $LC_{50} = 64,97 \mu\text{g/ml}$ . Dari hasil diatas menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi-fraksi dan senyawa murni V-1 toksik terhadap larva udang, suatu ekstrak menunjukkan aktifitas sitotoksik bila memiliki harga  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$  dan senyawa murni dikatakan toksik bila memiliki harga  $LC_{50} < 200 \mu\text{g/ml}$  ( Colegate, 1982 ; Meyer, 1982 ).

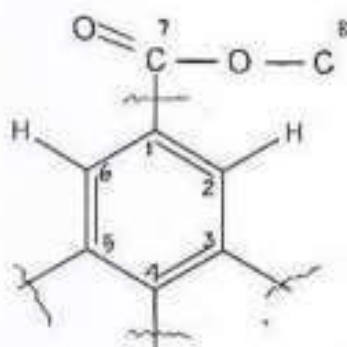
Penentuan struktur senyawa V-1 hasil isolasi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, IR, RMI dan spektrum massa (MS).

Dari spektrum UV senyawa V-1 memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 224,5 nm dan 275 nm yang merupakan daerah serapan khas untuk senyawa fenolik dengan satu cincin aromatis ( Silverstein, 1991).

Dari spektrum IR diketahui bahwa senyawa V-1 memberikan serapan pada bilangan gelombang  $3400\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan yang khas untuk gugus OH. Serapan pada bilangan gelombang  $1750\text{ cm}^{-1}$  memperlihatkan sinyal yang khas untuk gugus ester. Sekitar  $1650\text{ cm}^{-1}$  memperlihatkan adanya ikatan C=C.

Dari spektrum  $^1\text{H}$  RMI senyawa V-1 dalam  $\text{CD}_3\text{OD}$  terlihat 4 buah sinyal yang muncul pada pergeseran kimia  $3,33\text{ ppm}$  (s),  $3,84\text{ ppm}$  (s),  $4,87\text{ ppm}$  (s) dan  $7,06\text{ ppm}$  (s). Sinyal singlet pada pergeseran kimia  $3,84\text{ ppm}$  diduga berasal proton dari gugus metoksi. Proton pada cincin aromatik muncul pada sinyal dengan pergeseran kimia  $7,06\text{ ppm}$  (s). Spektrum  $^1\text{H}$ -RMI ini menunjukkan adanya 2 buah atom H yang ekuivalen yaitu H-2 dan H-6.

Spektrum  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY merupakan spektrum autokorelasi dengan cara menghubungkan titik-titik sinyal dari proton yang terdapat pada spektrum. Jika pola yang dihasilkan membentuk bidang persegi empat berarti proton-proton yang bertetangga tersebut saling terkopling. Dari spektrum  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY senyawa V-1 terlihat bahwa tidak ada kopling antara proton tetangga.



Dari Spektrum  $^{13}\text{C}$  RMI senyawa V-1 didalam  $\text{CD}_3\text{OD}$  terlihat 6 sinyal yang mengandung 8 atom karbon yang terdiri dari 4 buah atom karbon kuarterner aromatis, 2 buah atom karbon tersier aromatis, 1 buah atom karbon kuarterner karboksilat dan 1 buah atom karbon primer. Pada pergeseran kimia 167,86 ppm menunjukkan adanya atom karbon kuarterner karboksilat (C-7). Puncak pada 138,62 ppm menunjukkan letak C-4. Puncak pada 120,28 ppm menunjukkan adanya atom karbon kuarterner aromatis (C-1). Puncak pada 108,87 ppm menunjukkan adanya dua buah atom karbon tersier aromatis yang simetris yaitu atom C-2 dan C-6. dan puncak pada 51,08 ppm menunjukkan adanya atom karbon primer (C-8). Puncak pada 145,35 menunjukkan adanya dua buah atom C simetris yaitu C-3 dan C-5.

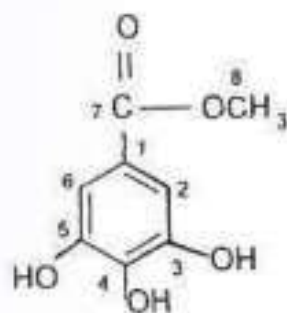
Spektrum HSQC memberikan informasi tentang korelasi antara suatu proton dengan karbon dimana proton tersebut melekat serta dengan tetangganya. Dari analisis spektrum HSQC senyawa V-1 diketahui proton pada  $\delta_{\text{H}}$  7,06 ppm memiliki korelasi dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  108,87 ppm. Proton pada  $\delta_{\text{H}}$  3,86 ppm memiliki korelasi dengan karbon pada  $\delta_{\text{C}}$  51,08 ppm.

Dengan menganalisis spektrum HMBC diketahui bahwa proton pada  $\delta_{\text{H}}$  7,06 ppm memiliki korelasi dengan atom C pada  $\delta_{\text{C}}$  167,86 ppm, 145,32 ppm, 138,62 ppm, 120,28 ppm dan 108,87 ppm. Kemudian proton pada  $\delta_{\text{H}}$  3,84 ppm yang berikatan langsung dengan atom C pada  $\delta_{\text{C}}$  51,08 ppm memiliki korelasi dengan atom C pada  $\delta_{\text{C}}$  167,86 ppm.

Dari pemeriksaan spektrum massa senyawa V-1 dengan metode EI (Electron Impact) menunjukkan berat molekul senyawa V-1 184,7. Senyawa



dengan berat molekul yang hampir sama yaitu 184 (SDBS Mass, 2005) menunjukkan bahwa adanya 8 atom C, 8 atom H dan 5 atom O dengan rumus molekul  $C_8H_8O_5$ . Ion molekul  $m/z$  153,1 mengindikasikan lepasnya fragmen dengan  $m/z$  31,6 yang merupakan fragmen dari gugus  $OCH_3$ . Setelah pengolahan dan penggabungan semua data yang berasal dari spektrum UV, IR,  $^1H$  RMI,  $^{13}C$  RMI, COSY, HSQC, HMBC, Massa dan dibandingkan dengan penemuan terdahulu dari peneliti Hildayani (1998) yang mendapatkan senyawa asam galat dari daun sumbek-sumbek (*Leea culeata* Bl) dapat disimpulkan bahwa senyawa V-1 ini adalah metil 3,4,5 trihidroksi benzoat atau metil galat dengan struktur sbb:

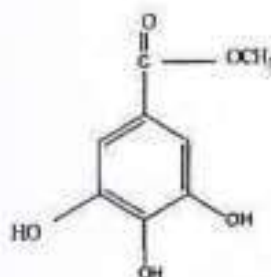




## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Hasil skrining hipokratik terhadap ekstrak metanol dan senyawa V-1 dari daun *Picrasma javanica* Bl, memperlihatkan aktifitas farmakologi yang paling menonjol sebagai relaksasi otot dan penekanan sistem saraf pusat.
2. Ekstrak metanol, fraksi-fraksi ekstrak dan senyawa V-1 dari daun *Picrasma javanica* Bl menunjukkan aktifitas sitotoksik dengan nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ .
3. Fraksi yang paling aktif menghambat pertumbuhan jamur adalah fraksi etil asetat pada konsentrasi 10 mg/ml.
4. Hasil uji antioksidan menunjukkan senyawa V-1 sangat aktif sebagai antioksidan pada konsentrasi 1 mg/ml.
5. Berdasarkan data spektroskopi yang ada dapat disimpulkan bahwa senyawa V-1 adalah 3,4,5 trihidroksibenzoat dengan rumus molekul  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$  dengan struktur sebagai berikut:



## 5.2. Saran

Disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melakukan pengujian aktifitas lebih lanjut terhadap senyawa V-1 dengan metoda yang lebih spesifik dan melakukan isolasi senyawa lain dari fraksi n-heksana daun *Picrasma javanica* Bl.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.E., C.M. Goetz and J.L. Mc Laughlin, "A Blind Comparison of Simple Bench-Top Bioassay and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens", *Phytochemical Anal*, **2**, 1991, 107-111
- Arbain, D., L.T. Byrne., M.V. Sargent., B.W. Skelton., and A.H., White, "The Alkaloids of *Picrasma javanica* Bl " Further Studies, *Aust.J.Chem*, **43**, 1990, 433-437
- Arbain, D., " A Study of the Alkaloids of Some West Sumatran Plants", Ph.D. Thesis, University of Western Australia, 1986, 103-114
- Annonymous., Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Farmakope Indonesia, Edisi III, Jakarta, 1979
- Burkill, I.H., " A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula" volume I, Government of Malaya and Singapore by the Ministry of Agriculture and Cooperatives, Kuala Lumpur, Malaysia, 1966
- Backer., C.A and R.C.B. Van Den Brink, " Flora of Java," Vol. II, The Netherlands, 1965
- Bonang, G dan E.S. Koeswardono, " Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium Klinik", PT Gramedia, Jakarta, 1982
- Barry, A.L., " Procedure for Testing Antimicrobiology Agent in Agar Medical Theoretical Consideration in Laboratory Medicine, Ed. Lorian, The William & Wilkins Company, Baltimore, 1980
- Colegate, S and R.J. Molynevy., " Bioactive Natural Product, Toxicity Testing Using the Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent", *Planta Med*, **45**, 1982, 31-33
- Donatus I.A., " Peranan Farmakologi Dalam Pengembangan Obat Tradisional" Penerjemah Husin.M., Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, 1983, 1-10
- Dey, P.M and Harborne, J.B., " Methods in Plant Biochemistry in Assay for Bioactivity," vol 6, Academic Press Limited, London, 1991
- Das, A.K and A.K.Bhattacharjee, "A Systematis Approach to Phytochemical Screening", *Tropical Sentence*, **12**, 1969, 54-58

Goodwin, T.W and E.I. Mercer, "Introduction to Plant Biochemistry," 2<sup>nd</sup> ed, Pergamon Press Ltd., Oxford, 1983

Ganiswara, S.G., dkk, "Farmakologi dan Terapi," Farmakologi Fakultas Kedokteran UI, Edisi IV, Jakarta, 1995

Harefa, F., "Pembudayaan *Artemia* untuk Pakan Udang dan Ikan," Penchar swadaya, Jakarta, 1997

Hayati, R., "Uji Antioksidan Ekstrak Metanol daun Benalu *Elytrante maingoyi* Gamble", *Skripsi Sarjana Farmasi*, FMIPA Universitas Andalas, Padang, 2002

Hildayani, "Isolasi Komponen Utama Fraksi Aktif Antimikroba dari Daun Sumbek-Sumbek (*Leuca aculeata* Bl)", *Skripsi Sarjana Farmasi*, Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas, Padang, 1998

<http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/owa/sdbs>, tanggal akses 18 Januari 2005

Harborne, J.B., "Phytochemical Methods (Metoda Fitokimia)", Terbitan ke-2, Penerjemah Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB, Bandung, 1987

Ishii, K., Koike and Ohmoto, T., "Javanicinosides D-H, Quassinoid Glucosides From *Pterasma javanica*", *Phytochemistry*, **30** (12), 1991, 4099-4103

James, W.D., and R.R. Roth, "Skin Microbiology, Encyclopedia of Microbiology S-Z indeks", Academic Press, 1992

John, S>R., J.A. Lambertson and A.A. Siomis, *Aust.J.Chem*, **23**, 1970, 629

Khan, M.R., M.Kihara and A.D.Omoloso, "Antibacterial Activity of *Pterasma javanica*", *Fitoterapia*, **72**, 2001, 406-408

Koike, K., Ishii, K., Mitsunaga, K and Ohmoto, T., "Quassinoids From *Pterasma javanica*", *Phytochemistry*, **30** (3), 1991, 933-936

Koike, K., Yokoh, M., Furukawa, M., Ishii, S and Ohmoto, T., "Pterasane Quassinoid From *Pterasma javanica*", *Phytochemistry*, **40**(1), 1995, 233-238

Lorian, V., "Antibiotics in Laboratory Medicine," William and Wilkins, Baltimore, 1980



Malone, M.H., and R.A. Carrano, "Hippocratic and Pharmacodynamic Screening", Compilation of Symposium Papers Presented at the Fifth National Meeting of the A.Ph.A.A Academy of Pharmaceutical Sciences, American Pharmaceutical Association, Washington, 1977

Minaldi, "Isolasi Senyawa Terpenoida dari Kulit Kayu Pahit *Picrasma javanica* Bl, Skripsi Sarjana Kimia, FMIPA, Universitas Andalas, Padang, 1988

Malone, M.H., "The Pharmacological Evaluation of Natural Products General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceutical," *J. Ethnopharmacology*, 1983

Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam., L.B. Jacobsen, D.E. Nicholas and J.L. McLaughlin., Brine Shrimps : "A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent", *Planta Med*, 45, 1982, 31-34

Mutschler, E., "Arzneimittelwirkungen, 5 Vollig Neubearbeitete und Erweiterte Auflage, Penerjemah Widianto, M.B., dan A.R. Satiadi., "Dinamika Obat", Edisi V, Penerbit ITB, Bandung, 1991

Marshal, M.S., "Laboratory Guide in Elementary Microbiology, 2 nd, McGraw-Hill Book Company, New York, 1951

Ontengco, D.C and Dayap, L.A., "Invitro Antibacterial Activity of Rind Essential Oil of *Citrus grandis* (L) Osbeck vs Common Clinical Pathogen", Proceeding ASOMPS VIII, Eds, I.M.Said, L.B.Din, N.H. Lajis, R.Kiew R, Melaka, 13 Juni 1996

Ohmoto, T., Koike, K., Mitsunaga, K., Fukuda, H and Kagei, K., "Studies on the Constituents of Indonesian *Picrasma javanica* III. Structures of New Quassinoids, javanicins A, C and D," *Chem.Pharm.Bull*, 37 (11), 1989, 2991-1994

Perry, L.M., "Medicinal Plants of East and Southeast Asia, Attributed Properties and Uses," MIT Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, 1980

Reeves., S.David., "Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York, 1978

Sultanova, N., T. Makhmoo, Z.A. Aollov, Z. Parween, V.B. Omurkamzinova, Atta-ur-Rahman and M.I. Choudary, "Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Tamaris ramosissima*", *J. Ethnopharmacology*, 78, 2001, 201-205

Stumpf, P.K and E.E. Conn, "The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise," Vol 7, Secondary Plant Products, Academic Press, New York, 1981

Silverstein, R.M., G.C. Bassler and T.C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds," 5<sup>th</sup> Ed., John Wiley & Sons Inc, New York, 1991

Santi, Y., "Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Benalu *Loranthus ferrugineus* Roxb, *Skripsi Sarjana Farmasi*, FMIPA Universitas Andalas, Padang, 2002

Thompson, E.B., "Drug Bioscreening, Fundamental of Drug Evaluation Technigues in Pharmacology," Graceway Publishing Co.Inc., New York, 1985

Turner, R.A., "Screening Method in Pharmacology," Academic Press, New York, 1985

Volk, W.A and M.F. Wheeler, "Basic Microbiology ( Mikrobiologi Dasar)", Jilid 2, edisi V, diterjemahkan oleh S. Adisumartono, Penerbit Erlangga, 1990

Yosvalina, "Zat Pahit dari Kayu Paik *Picrasma Javanica* BL, *Skripsi Sarjana Kimia*, FMIPA Universitas Andalas, Padang, 1987

Lampiran 1. Gambar Daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl.



Gambar 2. Daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl

Lampiran 2. Uji Pendahuluan Kandungan Kimia dari daun *Picrasma javanica* Bl

Tabel II. Hasil Uji Pendahuluan Kandungan Kimia dari Daun *Picrasma javanica*

No	Kandungan Kimia	Pereaksi	Hasil
1.	Alkaloid	Mayer	+
2.	Flavonoid	Sianidin	-
3.	Terpenoid	Liebermann-Burchard	-
4.	Steroid	Liebermann-Burchard	-
5.	Saponin	Aquadest/test busa	+
6.	Fenolik	FeCl <sub>3</sub>	+

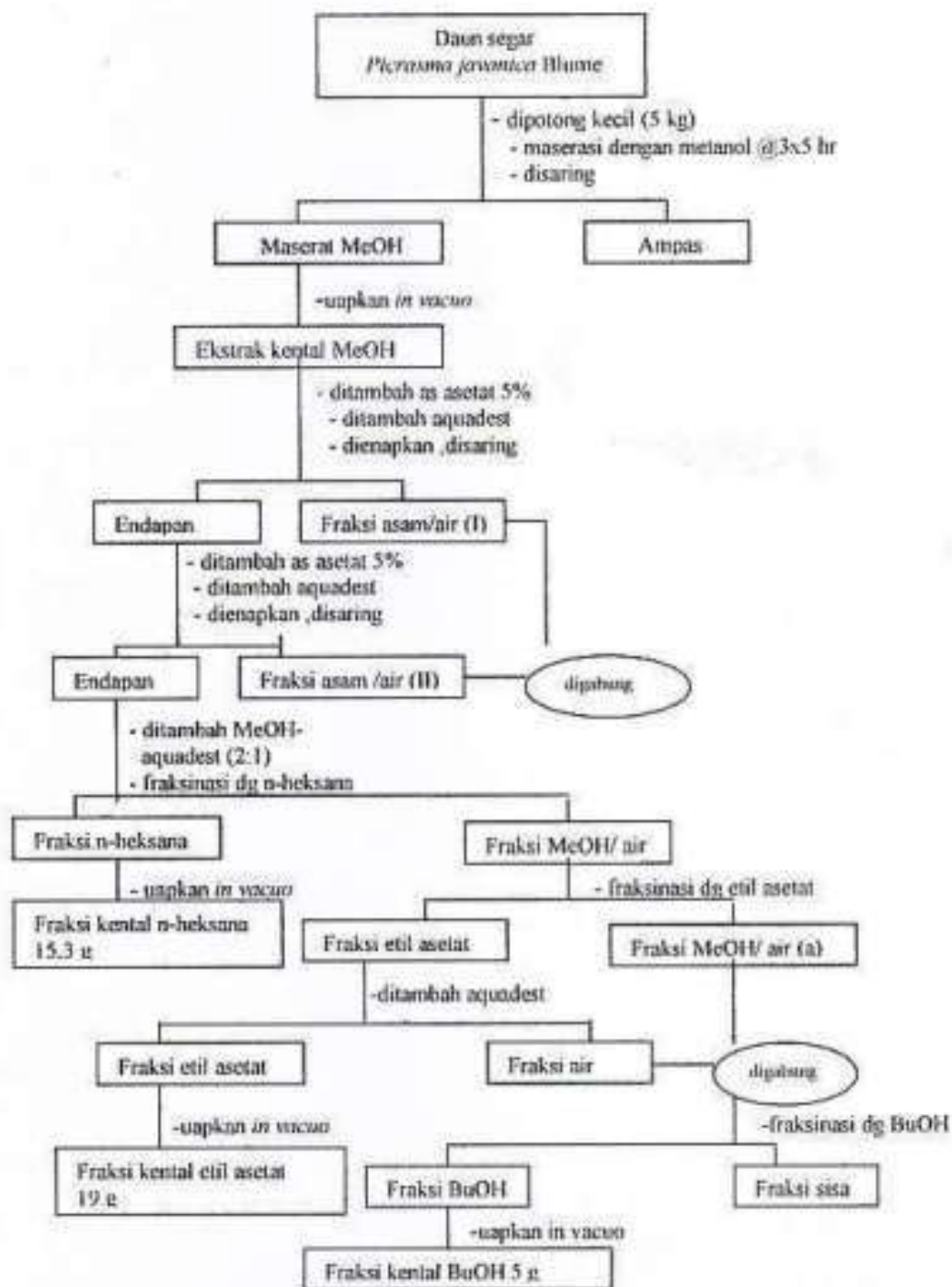
Keterangan

+ = Bereaksi

- = Tidak bereaksi

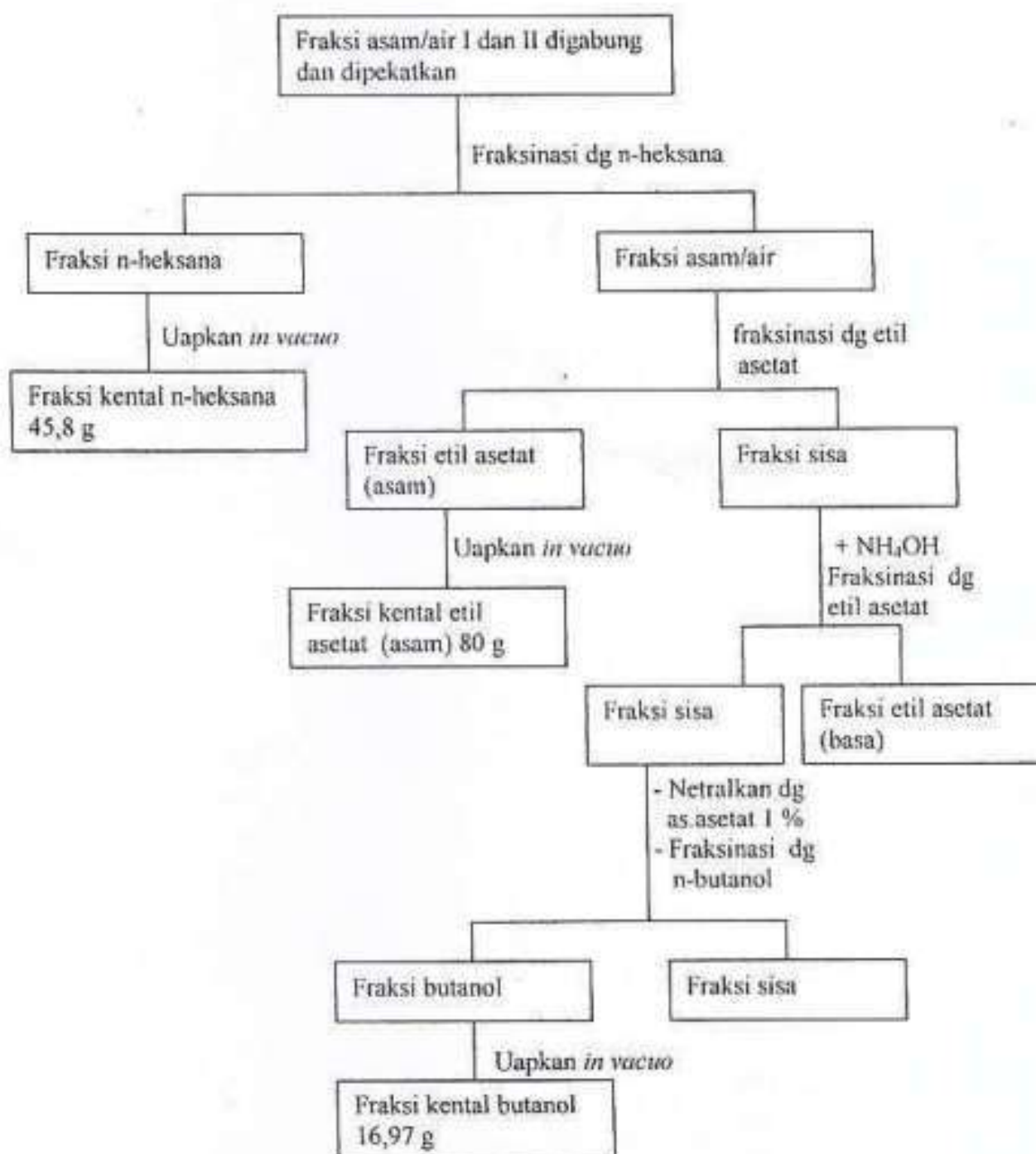


Lampiran 3. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl.



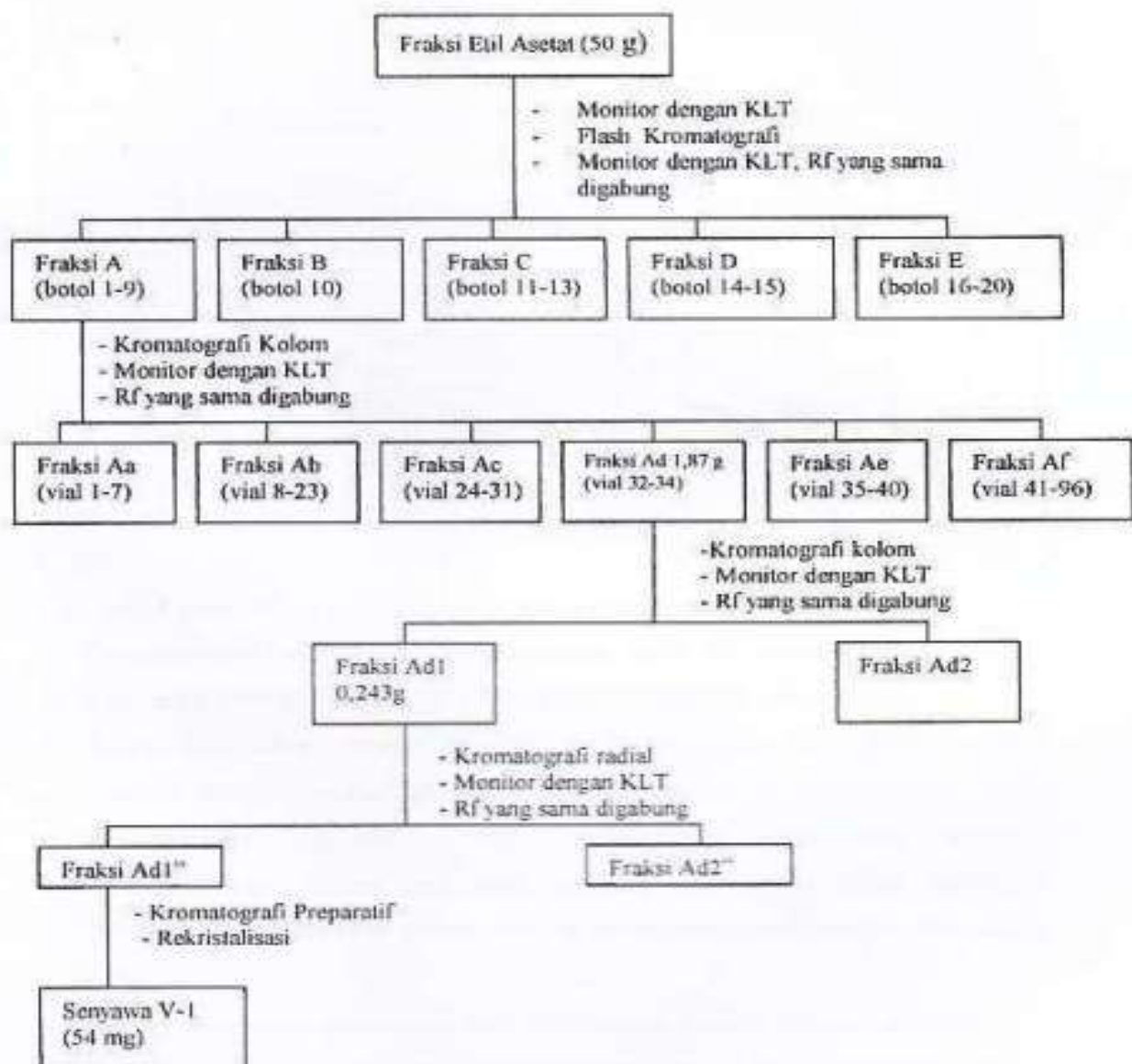
Gambar 3. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl.

Lampiran 3. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl. (Lanjutan)



Ket : Fraksi kental n-heksana, etil asetat (asam), butanol digabung sesamanya (fraksi yang sama) dan diuji aktifitas farmakologinya.

Lampiran 4. Metoda Pemisahan dan Pemurnian Senyawa V-1 dari Fraksi Etil Asetat Daun Tumbuhan *Pterasma javanica* Bl.



Gambar 4. Skema Pemisahan dan Pemurnian Senyawa V-1 dari Fraksi Etil Asetat Daun Tumbuhan *Pterasma javanica* Bl

Lampiran 5. Nilai Kuantitatif Beberapa Parameter pada Penapisan Hipokratik

Tabel III. Nilai Kuantitatif Beberapa Parameter pada Penapisan Hipokratik (Malone,1977)

Parameter	Nilai		
	1	2	3
Sudut hilang daya cengkram	180°	90°	45°
Peningkatan/penurunan laju pernapasan (%)	25	50	85
Peningkatan lebar pupil (mm)	1	2	3
Angka lakrimasi (mm)	6	10	14
Angka kromodakriorea(mm)	1	5	10
Peningkatan suhu rektum (°C)	1	2	3
Penurunan suhu rektum (°C)	2	4	7
Waktu jatuh dari <i>rotary rod</i> (detik)	21 - 30	11 - 20	<10
Peningkatan waktu jepit ekor (detik)	5	10	15
Peningkatan waktu plat panas (detik)	5	10	15
Penurunan berat badan (gram)	3	4,5	6

Cara untuk pengolahan data dari kertas kerja penapisan hipokratik :

1. Data kuantitatif ditransformasikan ke dalam skala nilai menurut tabel II.
2. Semua parameter diberi faktor bobot menurut nilai FB pada tabel III.
3. Kumpulkan setiap catatan parameter dan jumlahkan skor yang teramati menurut dosis, kemudian kalikan dengan faktor bobot.
4. Kelompokkan parameter yang menunjukkan salah satu aktivitas farmakodinamik dalam satu tabel bersama skor bobot setiap parameter tersebut. Jumlahkan skor bobot menurut dosis sehingga didapatkan skor bobot total.
5. Hitung skor bobot maksimum total dari masing- masing kategori aktivitas dihitung dengan cara mengalikan faktor bobot dengan frekuensi pengamatan dan nilai maksimum yang dapat diberikan.
6. Persentase efek dihitung dengan cara membagi skor bobot total dengan skor maksimum total dikali 100%.



## Lampiran 6. Daftar Faktor Bobot Untuk Parameter Penapisan Hipokratik

Tabel IV. Daftar Faktor Bobot untuk 44 Parameter Penapisan Hipokratik

(Malone, 1977)

Parameter	Faktor Bobot	Aktivitas
Aktivitas motorik menurun	1	Penekanan SSP/ Simpatolitik/ Relaksasi otot
Aktivitas motorik meningkat	1	Stimulan SSP
Hilang reflek berdiri	1	Penekanan SSP
Hilang reflek kornea	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Hilang reflek pinal	1	Penekanan SSP
Paralisa kaki	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Hilang daya cengkram	1,5	Penakan SSP/ Relaksasi otot
Laju pernapasan meningkat	2	Stimulan SSP
Laju pernapasan menurun	2	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Tremor	1	Stimulan SSP
Pasikulasi	1	Stimulan SSP/ Parasimpatomimetik
Kemulusi	1	Stimulan SSP/ Simm / Parasia / Simpatolitik
Eksoftalmus	1,5	Simpatomimetik
Palpebra ptosis	1	Penekan SSP/ Simpatolitik/ Relaksasi otot
Pupil melebar	0,5	Analgetik/ Parasimpatolitik
Pupil mengecil	1,5	Parasimpatomimetik/ Siml / Penekanan SSP
Nistagnus	2	Penekanan SSP
Lakrimasi meningkat	0,5	Parasimpatomimetik
Lakrimasi menurun	2	Simpatolitik
Kromodakriorea	1	Parasimpatomimetik
Telinga/ekor memucat	2	Vasokonstriksi
Telinga/ekor hyperemia	1	Vasodilatasi
Salivasi	2	Parasimpatomimetik
Ekor naik	0,5	Analgetik
Bulu berdiri	2,5	Parasimpatomimetik/ Simpatomimetik
Urinasi	2	Parasimpatomimetik
Diare	1	Parasimpatomimetik
Gerak berputar	1	Stimulan SSP/ Simpatomimetik
Ekor bergerak	1	Stimulan SSP
Writhing	0,5	Relaksasi otot
Temperatur rektum naik	2	Stimulan SSP/ Simpatomimetik
Temperatur rektum turun	1	Penekanan SSP/ Siml / Parasimpatomimetik
Jatuh dari rotary rod	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Melompat dari rotary rod	1	Stimulan SSP
Tonus tubuh menurun	1,5	Penekanan SSP/ Relaksasi Otot
Tonus tubuh naik	2	Stimulan SSP
Agresi	1	Stimulan SSP
Katalapsi	1	Penekanan SSP
Rasa ingin tahu menurun	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Rasa ingin tahu meningkat	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot
Reaksi plat panas menurun	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot/ Analgetik
Reaksi jepit ekor menurun	1	Penekanan SSP/ Relaksasi otot/ Analgetik
Berat badan naik	2	
Berat badan turun	1,5	

## Lampiran 7. Contoh Laporan Kertas Kerja

Tabel V. Contoh laporan kertas kerja

Berat badan :  
 Jam mulai :  
 Tanda :

No. Sampel :  
 Dosis :

Parameter	Tingkat Respon dan Pengukuran										
	K	5'	10'	15'	30'	1J	2J	3J	24J	48J	
Aktivitas motorik menurun											
Aktivitas motorik meningkat											
Hilang reflek berdiri											
Hilang reflek kornea											
Hilang reflek pinal											
Paralisis kaki											
Hilang daya cengkram											
Laju pernapasan meningkat											
Laju pernapasan menurun											
Tremor											
Fasikulasi											
Konvulsi											
Eksoftalmus											
Palpebral ptosis											
Pupil melebar											
Pupil mengocil											
Nistagmus											
Lakrimasi meningkat											
Lakrimasi menurun											
Kromodakriorea											
Telinga/ekor memucat											
Telinga/ekor hyperemia											
Salivasi											
Ekor naik											
Bulu berdiri											
Urinasi											
Diare											
Gerak berputar											
Ekor bergerak											
Weithing											
Temperatur rektum naik											
Temperatur rektum turun											
Jatuh dari rotary rod											
Melompat dari rotary rod											
Tonus tubuh menurun											
Tonus tubuh naik											
Agresif											
Katalepsia											
Rasa ingin tahu menurun											
Rasa ingin tahu meningkat											
Reaksi plat panas menurun											
Reaksi jepit ekor menahan											
Berat badan naik											
Berat badan turun											

Keterangan : K = Kontrol  
 ' = menit  
 J = jam

Lampiran 8. Hasil Skrining Hipokratik Ekstrak Metanol Daun *Picrasma javanica* Bl.

Tabel VI. Efek Skrining Hipokratik Ekstrak Metanol Daun *Picrasma javanica* Bl.

Aktifitas	Parameter yang diamati	FB	Dosis (mg/kg BB)		
			100	300	1000
Penekanan SSP	Aktivitas motorik menurun	1	7	7	9
	Hilang daya cengkram	1,5	13,5	13,5	13,5
	Temperatur rectum turun	1	2	2	2
	Jatuh dari rotarod	1	23	27	27
	Laju pernafasan menurun	2	6	16	18
	Rasa ingin tahu menurun	1	3	5	6
	SBT		54,5	70,5	75,5
	SBM = 346,5				
	% Efek		15,73	20,35	21,79
Relaksasi otot	Aktivitas motorik menurun	1	7	7	9
	Hilang daya cengkram	1,5	13,5	13,5	13,5
	Writhing	0,5	2	0	1,5
	Jatuh dari rotarod	1	23	27	27
	Laju pernafasan menurun	2	6	16	18
	Rasa ingin tahu menurun	1	3	5	6
	SBT		54,5	68,5	75,0
	SBM = 238,5				
	% efek		22,85	28,72	31,45

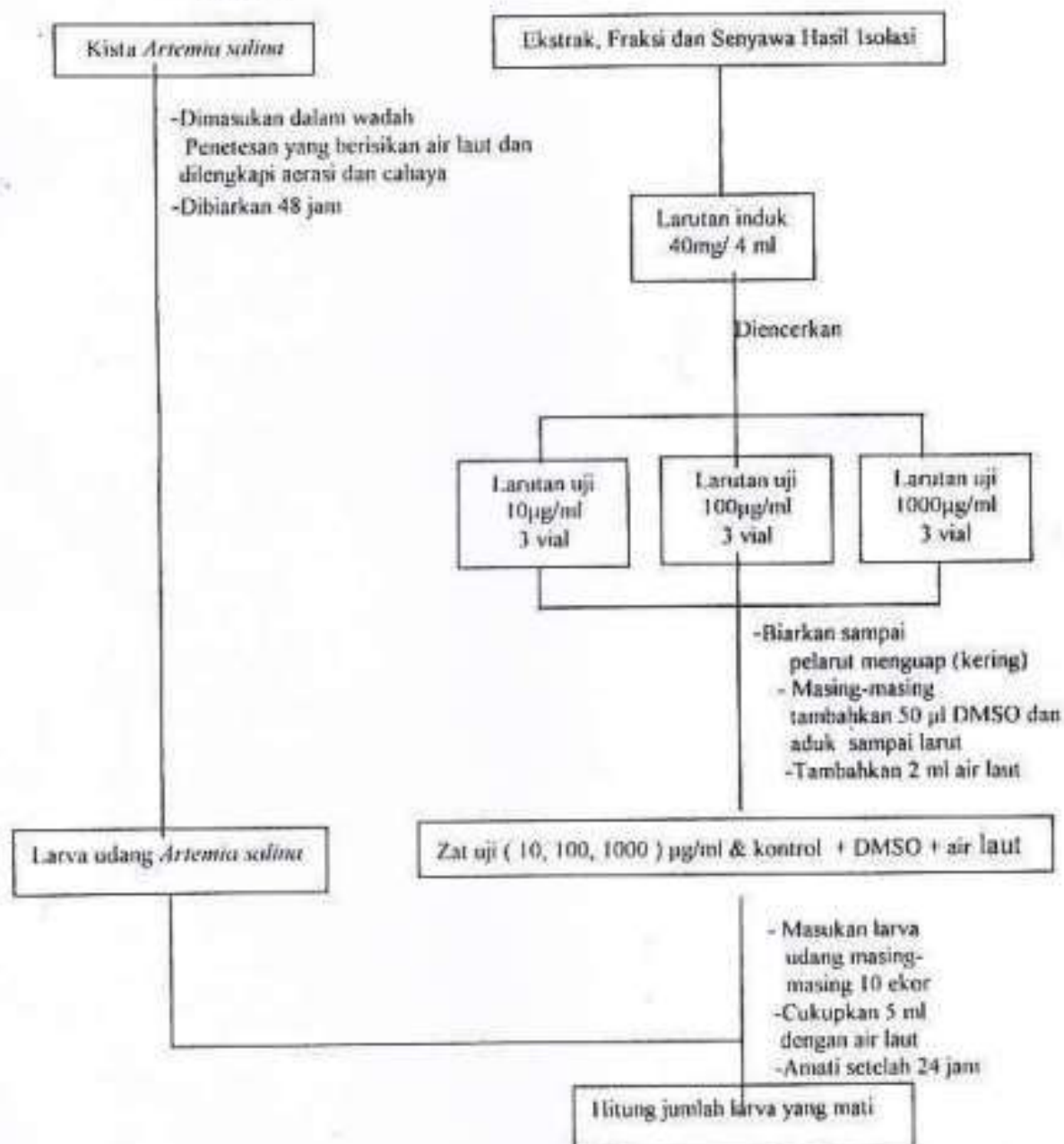
## Lampiran 8. (Lanjutan)

Tabel VII. Efek Skrining Hipokratik Senyawa V-1 Daun *Picrasma javanica* Bl.

Aktifitas	Parameter yang diamati	FB	Dosis 300 mg/kg BB
Penekanan SSP	Aktivitas motorik menurun	1	7
	Hilang daya cengkram	1,5	13,5
	Laju pernafasan menurun	2	18
	Jatuh dari rotarod	1	10
	Rasa ingin tahu menurun	1	6
	Katalepsi	1	5
	SBT		59,5
	SBM = 346,5		
	% Efek		17,17
Relaksasi otot	Aktivitas motorik menurun	1	7
	Hilang daya cengkram	1,5	13,5
	Laju pernafasan menurun	2	18
	Jatuh dari rotarod	1	10
	Rasa ingin tahu menurun	1	6
	SBT		54,5
	SBM = 238,5		
		% efek	



Lampiran 9. Skema Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps" menggunakan Larva *Artemia salina* Leach terhadap Ekstrak, Fraksi dan Senyawa Hasil Isolasi



Gambar 5. Skema Pengujian Toksisitas "Brine Shrimps" menggunakan Larva *Artemia salina* Leach terhadap Ekstrak, Fraksi Ekstrak dan Senyawa Hasil Isolasi

Lampiran 10. Perhitungan  $LC_{50}$  dengan Program Komputer Finney

Tabel VIII Hasil Perhitungan  $LC_{50}$  dengan Program Komputer Finney

Sampel Uji	$LC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ekstrak metanol	282,24
Fraksi n-heksana	2,40
Fraksi etil asetat	78,77
Fraksi n-butanol	166,02
Senyawa V-1	64,97

### Lampiran 1. Skema Pengujian Aktifitas Antimikroba



Gambar 6 : Skema pengujian aktifitas antimikroba

Lampiran 12. Pengujian Aktifitas Antimikroba Ekstrak , Hasil Fraksinasi dan Senyawa V-1 Hasil Isolasi Dari Daun *Picrasma javanica* Bl

Tabel IX. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambat Pertumbuhan Jamur Uji dari Daun *Picrasma javanica* Bl

Sampel	Diameter daerah hambat rata-rata (mm) terhadap	
	A	B
Ekstrak metanol	9,89	10,00
Fraksi n-heksana	0,00	10,00
Fraksi etil asetat	14,80	14,23
Fraksi n-butanol	11,30	10,00
Senyawa V-1	0,00	0,00
K-	0,00	0,00
K+	17,05	17,15

Ket: A = *Candida albicans* ATCC 1023

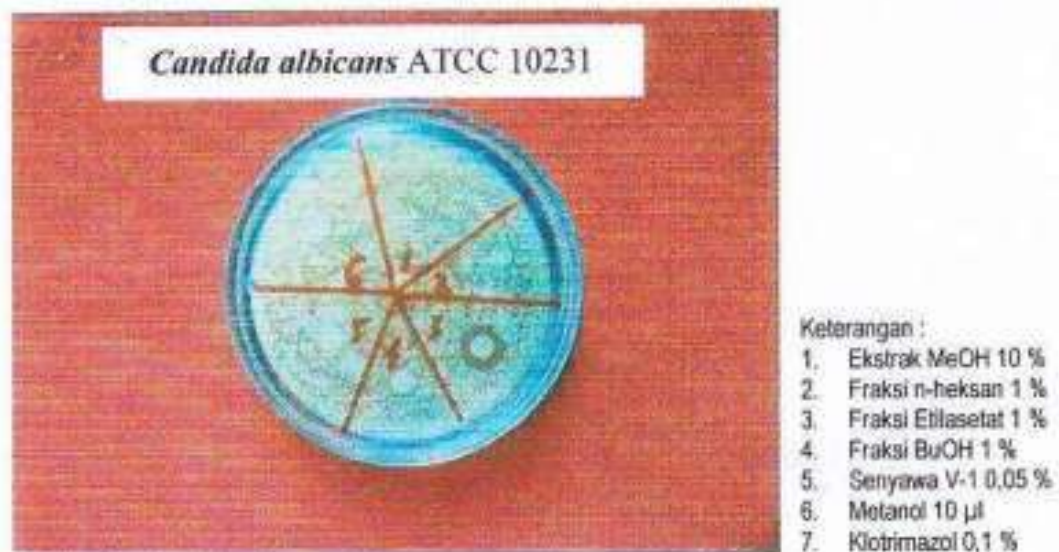
B = *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 5431

K+ = Klotrimazol 0,1 %

K - = Metanol



## Lampiran 12. (Lanjutan)



Gambar 7. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Jamur Uji CA



Gambar 8. Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan Jamur Uji TM

**Lampiran 13. Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan dengan Metoda Radikal DPPH**

Gambar 9. Skema Pemeriksaan Aktifitas Antioksidan dengan Metoda Radikal DPPH

## Lampiran 14. Pengujian Aktifitas Antioksidan

Tabel X. Hasil Pengujian Aktifitas Antioksidan Ekstrak metanol, Fraksi n-heksana, Fraksi etil asetat, Fraksi Butanol dari Senyawa V-1 daun Tumbuhan *Picrasma javanica* Bl

Sampel	Absorban	Persentase Inhibisi
Ekstrak metanol	0,0719	82,19%
Fraksi n-heksana	0,0741	81,64 %
Fraksi etil asetat	0,0865	78,57 %
Fraksi butanol	0,0522	87,07 %
Senyawa V-1	0,0187	95,37 %
Vitamin C	0,0134	96,68 %

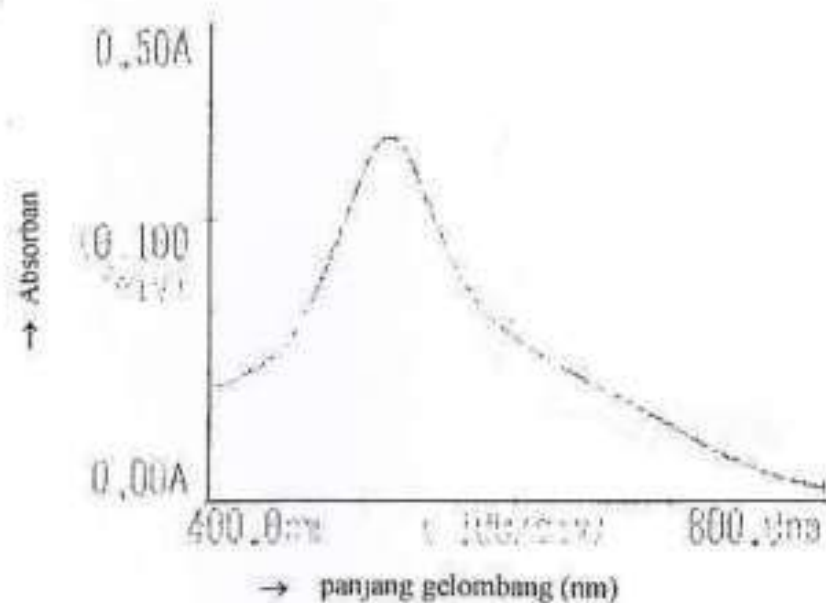
## Lampiran 15. Karakterisasi Organoleptis dan Pemeriksaan Senyawa V-1

Tabel XI. Hasil Karakterisasi Organoleptis dan Pemeriksaan Senyawa V-1

Karakterisasi	Senyawa V-1
Bentuk	Kristal
Warna	Putih
Bau	Tidak berbau
Kelarutan	Larut dalam etil asetat dan metanol
Jarak leleh	189-190°C
FeCl <sub>3</sub>	Hijau
NaOH	Jingga kemerahan
Uap Amoniak	Abu-abu



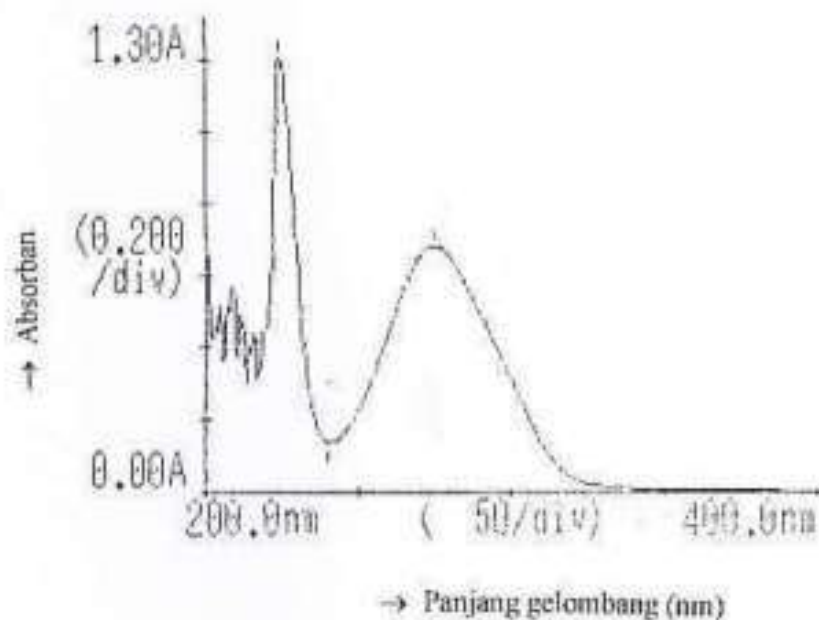
## Lampiran 16. Spektrum UV Senyawa Radikal DPPH



Gambar 10. Spektrum UV Senyawa Radikal DPPH

Tabel XII. Data Hasil Pengukuran Serapan DPPH 0,05 mM Dalam Metanol Pada Panjang Gelombang 517 nm

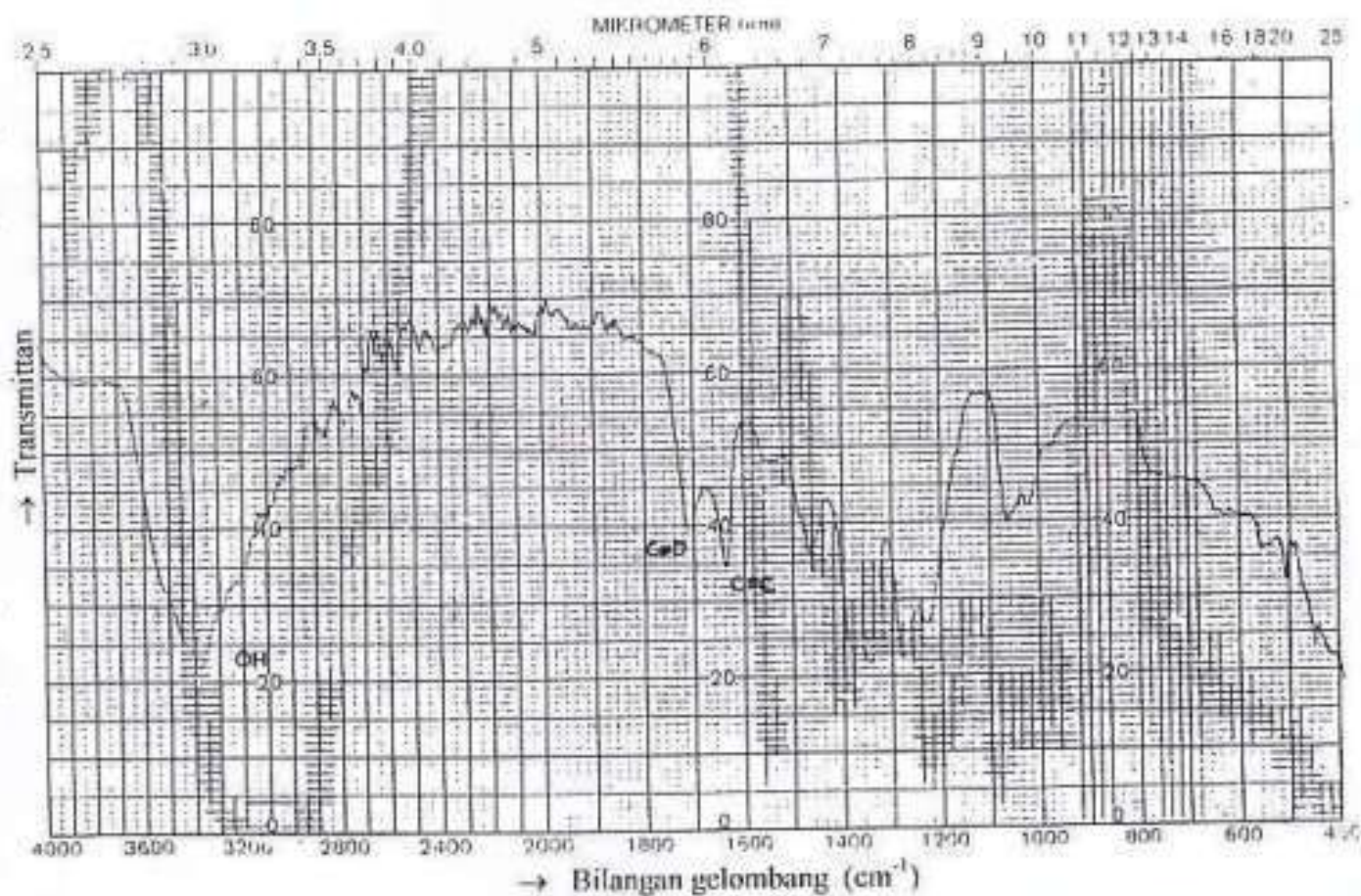
Sampel	Konsentrasi	Serapan
DPPH	0,05 mM	0,4037



Gambar 11 . Spektrum UV Senyawa V-1

Tabel XIII. Data Hasil Pemeriksaan Spektrum UV Senyawa V-1

No	Panjang Gelombang Maksimum (nm)	Serapan
1.	275,0	0,6868
2.	224,5	1,2084

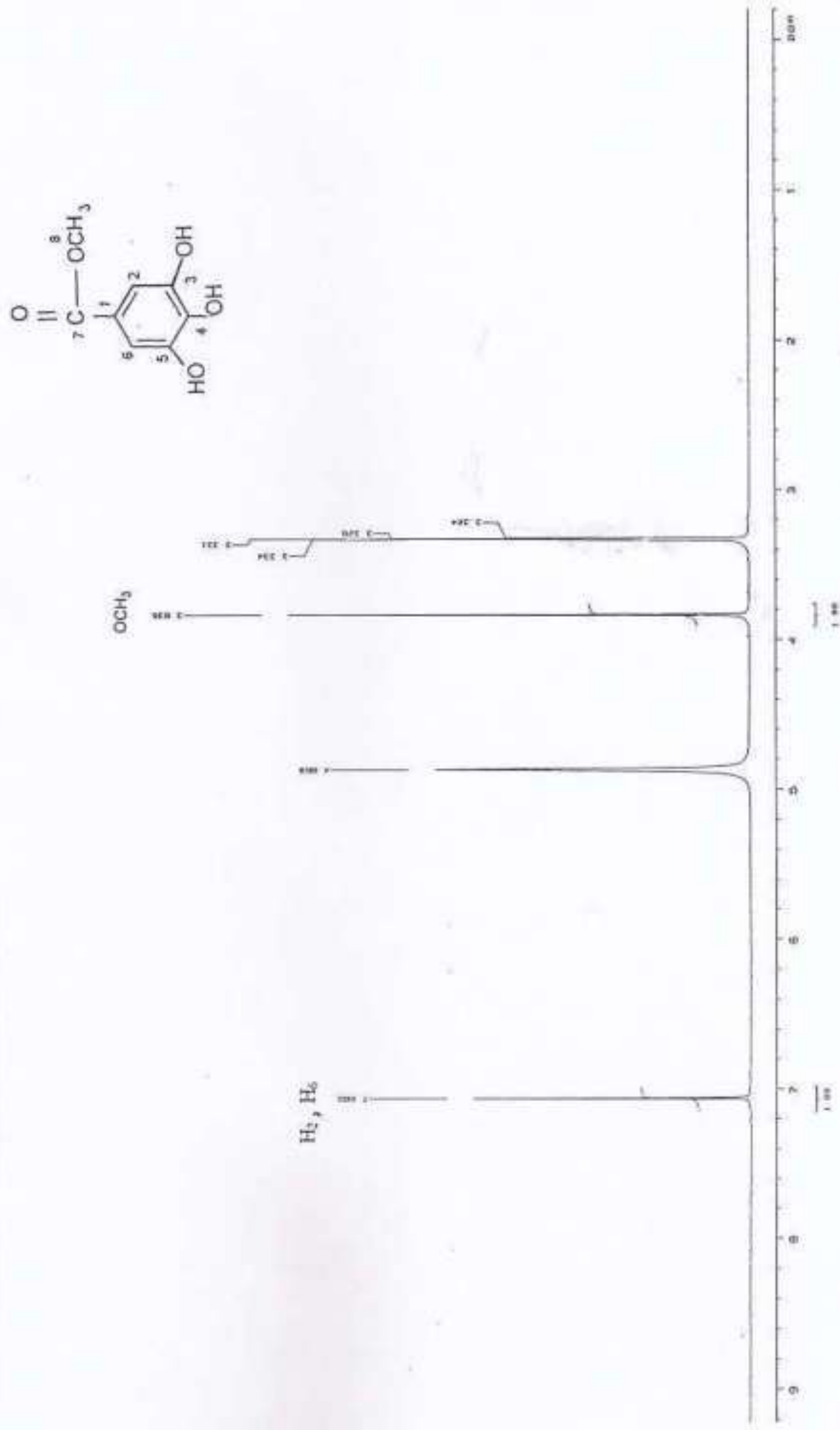


Gambar 12. Spektrum Inframerah Senyawa V-1

Tabel XIV. Data Hasil Pemeriksaan Spektrum Infra merah Senyawa V-1

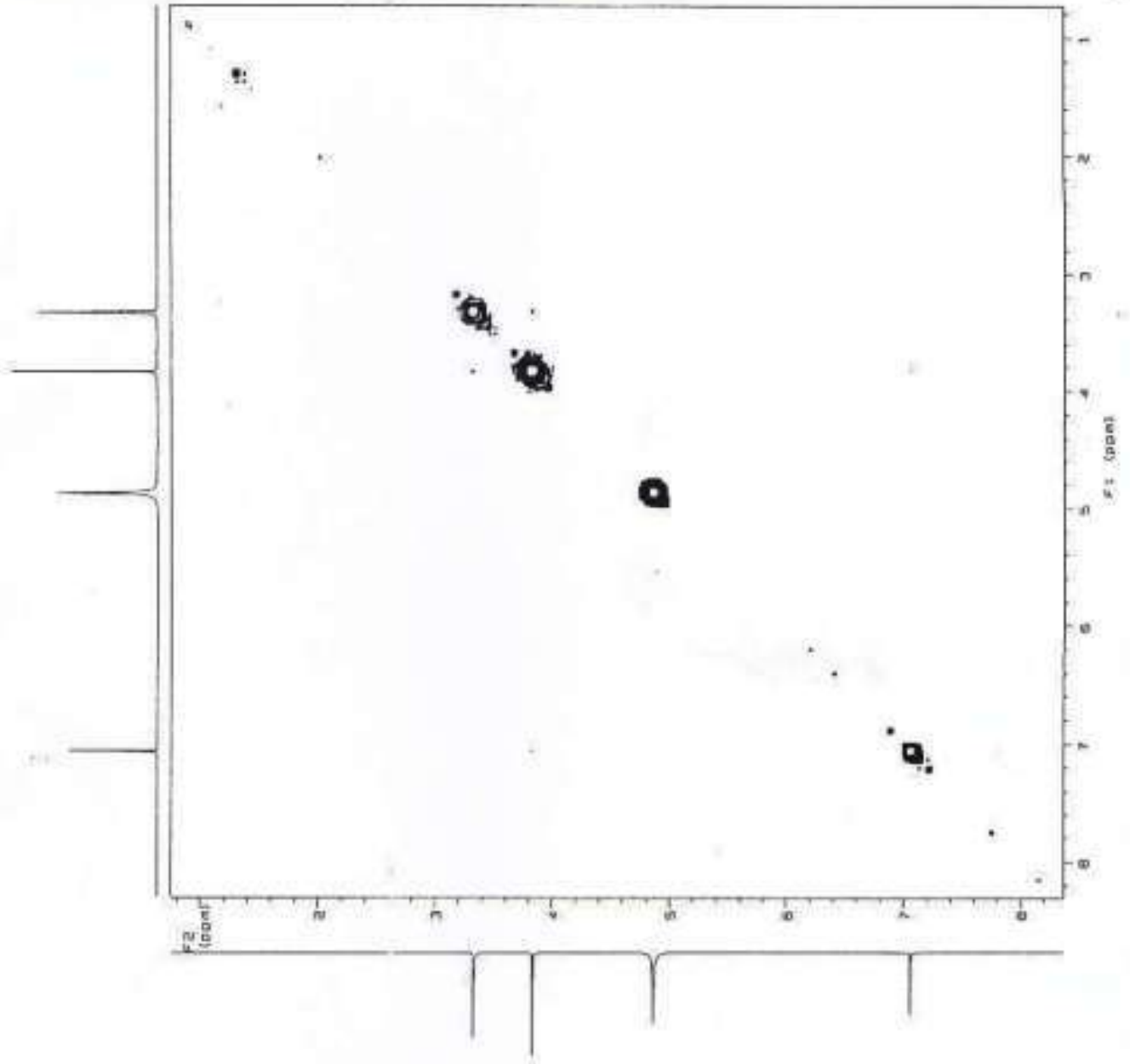
Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Keterangan
3400	Regang OH
1750	Regang C=O
1650	Regang C=C

Lampiran 19. Spektrum <sup>1</sup>H RMI Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD



Gambar 13. Spektrum <sup>1</sup>H RMI Senyawa V-1 ( CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz )

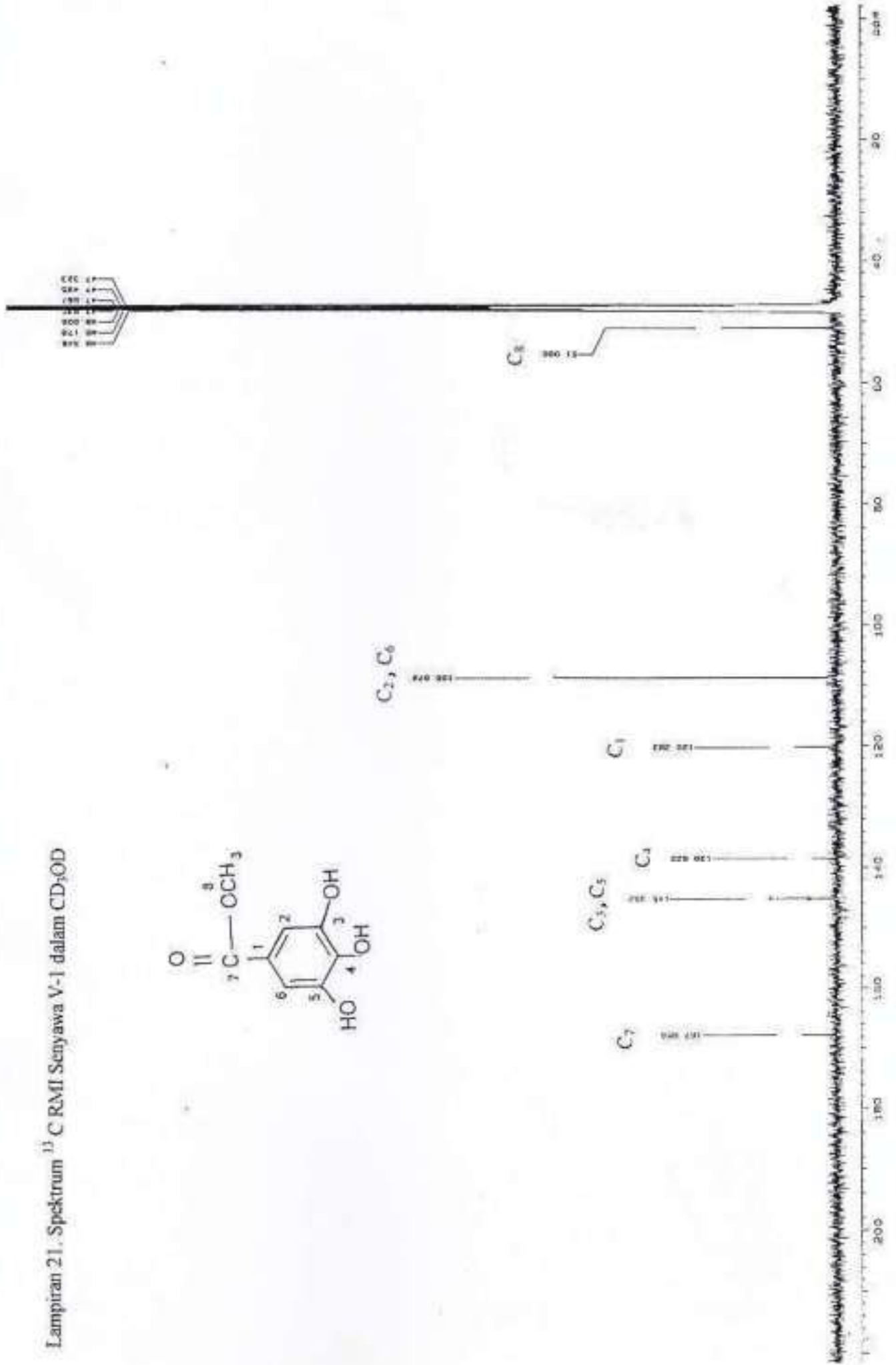
Lampiran 20. Spektrum COSY Senyawa V-I dalam CD<sub>2</sub>OD



Gambar 14. Spektrum COSY Senyawa V-I dalam CD<sub>2</sub>OD

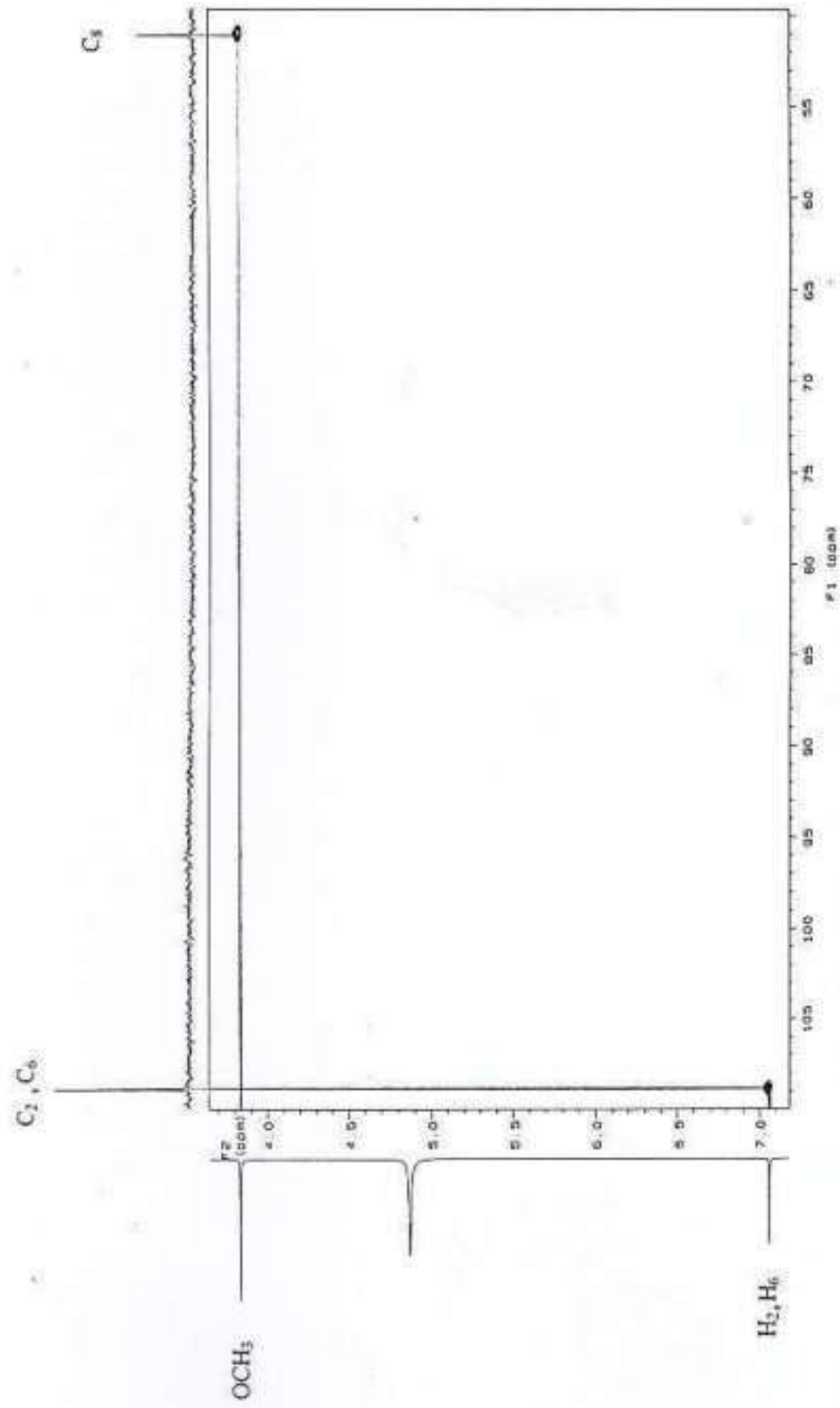


Lampiran 21. Spektrum <sup>13</sup>C RMI Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD

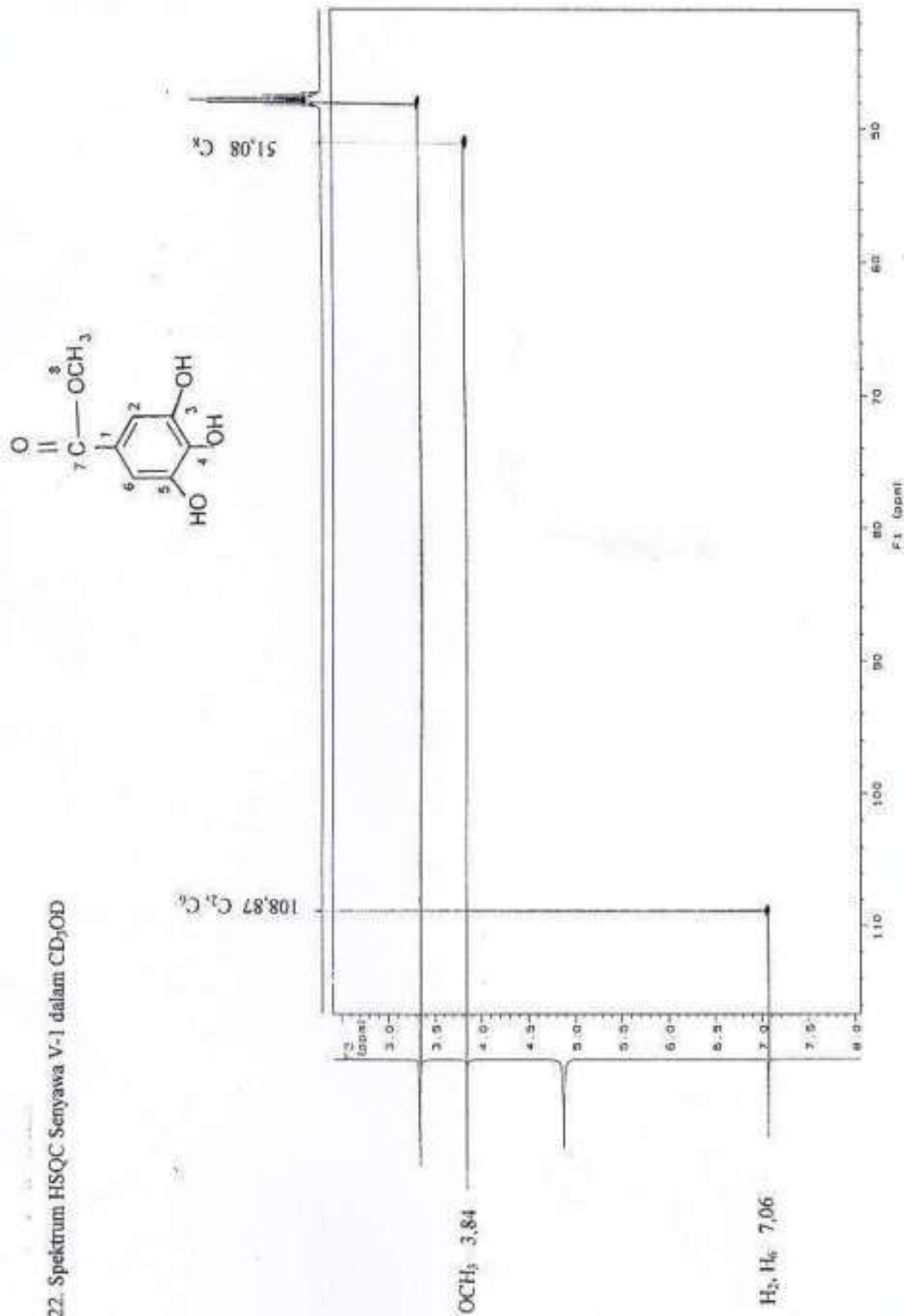


Gambar 15. Spektrum <sup>13</sup>C RMI Senyawa V-1 ( CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz )

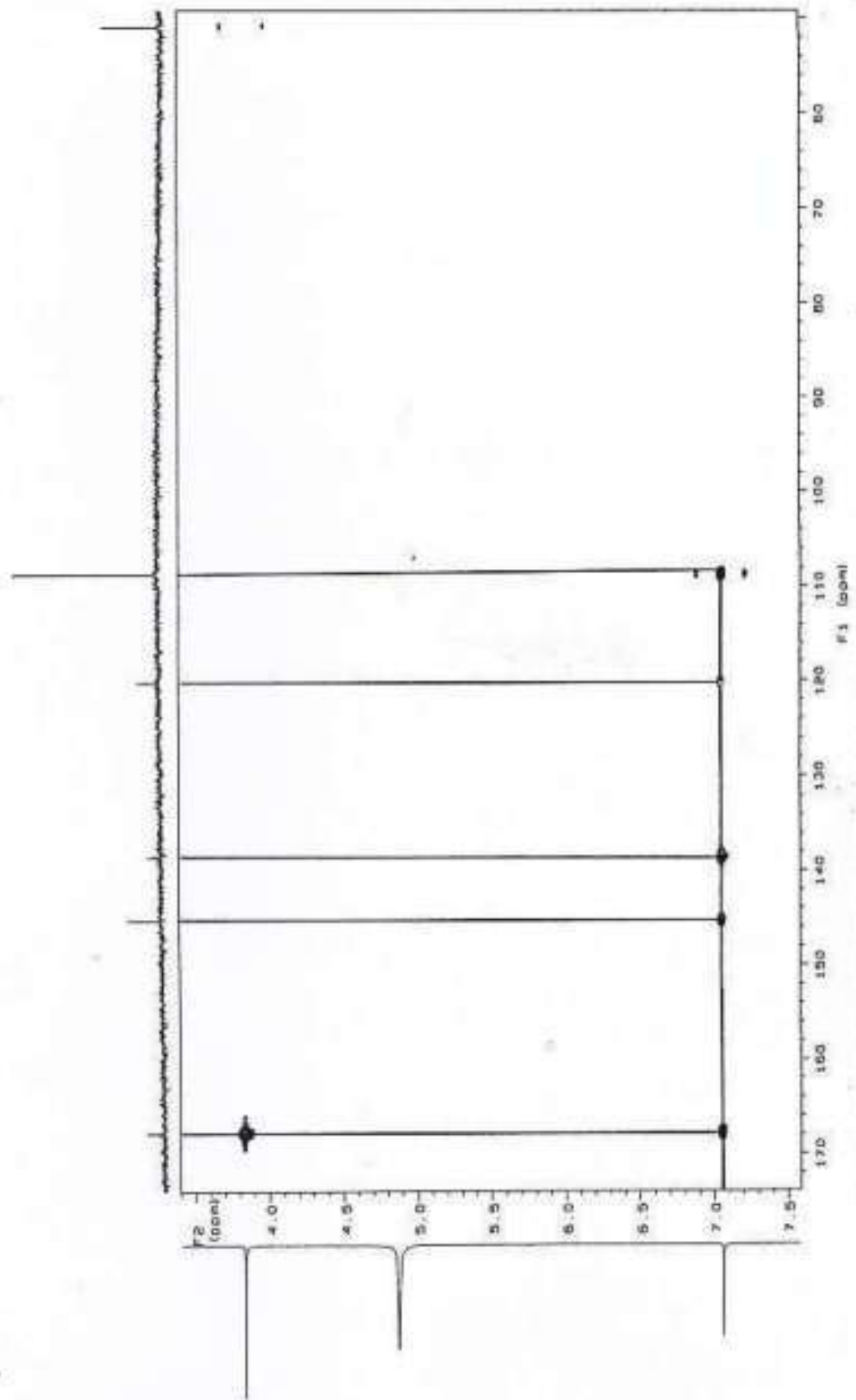
Lampiran 22. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam  $CD_3OD$



Gambar 16. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam  $CD_3OD$

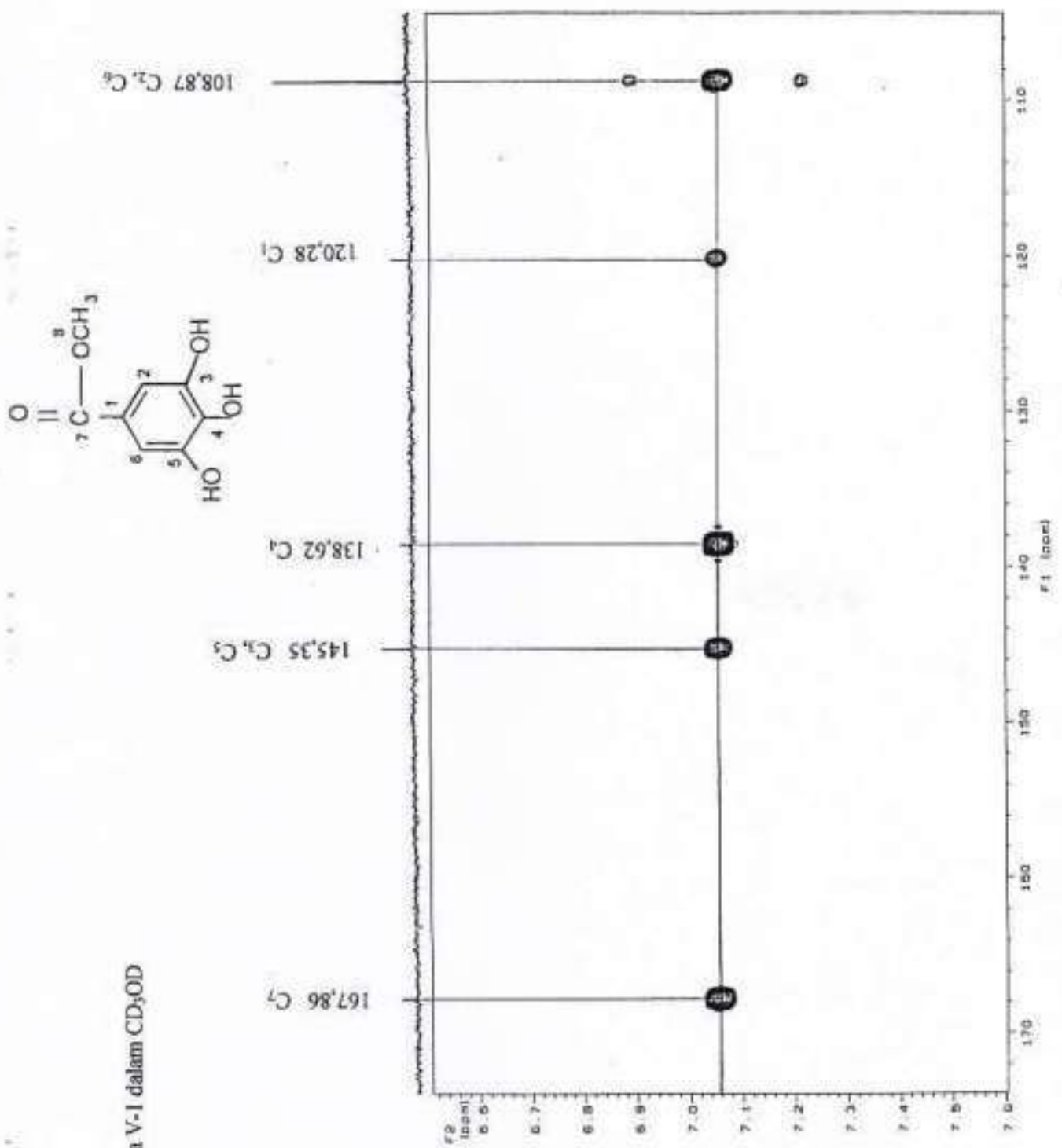
Lampiran 22. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam  $CD_3OD$ Gambar 16. Spektrum HSQC Senyawa V-1 dalam  $CD_3OD$  (perbesaran)

Lampiran 23. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD



Gambar 17. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD

Lampiran 23. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD



Gambar 17. Spektrum HMBC Senyawa V-1 dalam CD<sub>3</sub>OD (perbesaran)

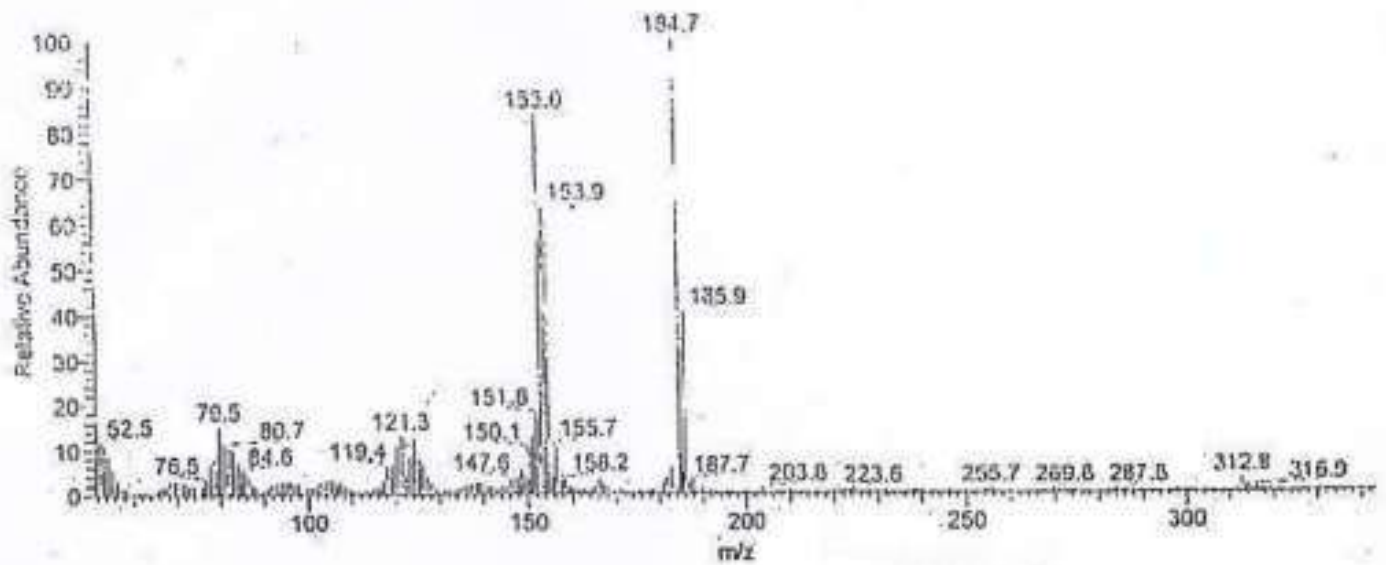


## Lampiran 24. Korelasi Proton dan Karbon Senyawa V-1

Tabel XIV. Korelasi Proton dan Karbon Senyawa V-1 Berdasarkan Hasil Pemeriksaan Spektrum  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC dan  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

Penomoran C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Jenis C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC
1	120,28	C		
2,6	108,87	CH	7,06	167,86;145,35;138,62;120,28;108,87
3,5	145,35	C		
4	138,62	C		
7	167,86	COO'		
8	51,08	OCH <sub>3</sub>	3,84	167,86

## Lampiran 25. Spektrum Massa Senyawa V-1



Gambar 18. Spektrum Massa Senyawa V-1 (EI)

Tabel XV. Data Pemeriksaan Fragmen Senyawa V-1

m/z	Fragmen yang lepas	Keterangan
184,7	-	M <sup>+</sup>
153,0	OCH <sub>3</sub>	M <sup>+</sup> -31

