

# **JURNAL KIMIA UNAND**

ISSN No. 2303-3401

**Volume 8 Nomor 3**

**Agustus, 2019**

*Media untuk mempublikasikan  
hasil-hasil penelitian seluruh  
dosen dan mahasiswa Kimia  
FMIPA Unand*

**Jurusan Kimia**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**Universitas Andalas**

# Tim Editorial Jurnal Kimia Unand

Emil Salim, M.Sc, M.Si  
Dr. Syukri  
Prof. Dr. Adlis Santoni  
Prof. Dr. Rahmiana Zein  
Prof. Dr. Syukri Arief  
Dr. Mai Efdi

## Alamat Sekretariat

Jurusan Kimia FMIPA Unand  
Kampus Unand Limau Manis, Padang – 25163  
PO. Box 143, Telp./Fax. : (0751) 71 681  
Website Jurnal Kimia Unand: [www.jurnalsain-unand.com](http://www.jurnalsain-unand.com)  
Corresponding E-mail: [salim\\_emil17@yahoo.com](mailto:salim_emil17@yahoo.com)  
[syukri@fmipa.unand.ac.id](mailto:syukri@fmipa.unand.ac.id)

## DAFTAR ISI

JUDUL ARTIKEL	Halaman
1. <b>PENGARUH PENAMBAHAN FITOHORMON 6-BENZIL AMINO PURIN (BAP) DAN VITAMIN C UNTUK MENINGKATKAN PRODUKSI PROTEIN PADA MIKROALGA <i>Chlorella vulgaris</i></b> Marniati Salim, Zulkarnain Chaidir, Ratih Andini Putri	1-7
2. <b>UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIBAKTERI DARI FRAKSI EKSTRAK METANOL DAUN TIN (<i>Ficus carica</i> Linn)</b> Bustanul Arifin, Suryati, Arif Rahman Hakim	8-16
3. <b>IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN UJI FENOLIK TOTAL DARI EKSTRAK DAUN BENALU JENGKOL (<i>Scurrula ferruginea</i> (Jack) Danser)</b> Norman Ferdinal, Adlis Santoni, Alldila Ramadhani Rusita	17-22

# PENGARUH PENAMBAHAN FITOHORMON 6-BENZIL AMINO PURIN (BAP) DAN VITAMIN C UNTUK MENINGKATKAN PRODUKSI PROTEIN PADA MIKROALGA *Chlorella vulgaris*

**Marniati Salim\*, Zulkarnain Chaidir, Ratih Andini Putri**

Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia,

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas,

Kampus Limau Manis, Padang, 25163 Indonesia

\*Email: [bundosalim@gmail.com](mailto:bundosalim@gmail.com)

**Abstrak:** Protein merupakan salah satu senyawa makromolekul yang dihasilkan oleh mikroalga. Tujuan dari penelitian ini yaitu menentukan pengaruh penambahan fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP) dan Vitamin C ke dalam media Bold's Basal Media (BBM) untuk meningkatkan biomassa dan produksi protein mikroalga *Chlorella vulgaris*. Penentuan kadar protein menggunakan metode Bradford dengan larutan standar protein Bovin Serum Albumin (BSA). Pemanenan mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan pada akhir fase eksponensial. Pemanenan pada media BBM dan BBM+BAP dilakukan pada hari ke-6, sedangkan pemanenan pada media BBM+Vitamin C dilakukan pada hari ke-7. Hasil pemanenan total biomassa terbanyak pada penelitian ini yaitu pada media BBM+vitamin C 8 mg/L 1116,6 mg, sedangkan untuk media BBM+BAP yang tertinggi pada konsentrasi 2,5 mg/L yaitu 900,0 mg. Produksi protein yang dihasilkan secara optimum terjadi pada media BBM+BAP 2,5 mg/L dan media BBM+vitamin C 8 mg/L masing-masingnya yaitu 11,846 mg/L dan 14,885 mg/L.

**Kata kunci:** Mikroalga *Chlorella vulgaris*, Fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP), Vitamin C, Analisis Protein

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara dengan jumlah penduduk tertinggi keempat setelah China, India, dan Amerika Serikat. Tingkat pertumbuhan penduduk yang begitu tinggi akan menimbulkan suatu dampak bagi kehidupan Indonesia. Terdapat beberapa potensi masalah yang ditimbulkan dari bertambahnya jumlah penduduk. Salah satunya adalah melambungnya tingkat kebutuhan akan pangan dan nutrisi. Hal ini akan berbanding lurus seiring dengan bertambahnya jumlah penduduk dimana semakin banyak jumlah penduduk, maka akan semakin banyak kebutuhan pangan dan akan mengganggu ketahanan pangan yang ada di Indonesia [1].

Melihat masalah di atas, perlu dikembangkan suatu tanaman yang kandungannya berpotensi sebagai salah satu solusi dari melemahnya ketahanan pangan. Salah satu bentuk kemajuan teknologi dan informasi adalah ditemukannya mikroflora (tumbuhan dengan ukuran mikro) atau yang biasa disebut mikroalga. Mikroalga dapat tumbuh dan berkembang biak pada media dan membutuhkan CO<sub>2</sub> serta cahaya sebagai sumber kehidupannya. Namun dalam proses pembentukan kandungan esensial, dipengaruhi beberapa faktor diantaranya, nutrisi yang diberikan pada mikroalga

*Chlorella vulgaris* selama masa kultivasi melalui media perkembangbiakannya [1].

Dalam penelitian ini, mikroalga *Chlorella vulgaris* dipilih karena memiliki pertumbuhan yang cepat, mudah dirawat dan mampu tumbuh pada heterotrofik dan mesotrofik. Bagjuz (2010) menyarankan bahwa ada hormon tanaman yang mampu meningkatkan laju pertumbuhan dan biomassa mikroalga. Hormon tanaman atau fitohormon merupakan bagian dari senyawa kimia yang berperan dalam metabolisme tanaman dan bekerja sebagai molekul sinyal, karena memiliki hubungan antara tanaman dan alga. Fitohormon dikategorikan dalam kelompok yang berbeda, mulai dari auksin sebagai pertumbuhan dan merangsang sel, dan sitokinin sebagai pembentukan dan pembelahan sel [2].

Sitokinin sering digunakan sebagai nutrisi tambahan pada media pertumbuhan mikroalga karena memiliki kadar nitrogen yang cukup tinggi sehingga baik untuk biosintesis protein, asam lemak dan mempercepat pertumbuhan mikroalga. Kadar nitrogen yang tepat pada hormon sitokinin mampu meningkatkan pembelahan sel pada mikroalga. Nitrogen juga berperan penting dalam proses pembentukan protein dan lipid. Proses pembentukan asam lemak diawali dengan pembentukan asetil-koA yang berasal

dari proses glikolisis dan juga pemecahan molekul protein. Adanya nitrogen yang berperan dalam pembentukan protein diharapkan mampu meningkatkan pembentukan asetil-koA yang juga dapat membantu proses biosintesis asam lemak [3].

6-Benzyl Amino Purine (BAP) merupakan sitokinin sintesis yang memiliki berat molekul sebesar 225,26 g/mol. Wattimena (1988) menambahkan bahwa BAP merupakan turunan adenin yang disubstitusi pada posisi 6 yang strukturnya serupa dengan kinetin [4].

Huanmin Du (2017) juga meneliti pengaruh fitohormon BAP, ABA, EBR, ETH, GA3, NAA, SA, dan SPD terhadap pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa* dengan konsentrasi yang berbeda. Hasilnya pada BAP didapatkan laju pertumbuhan tertinggi pada konsentrasi 1 mg/L setelah 12 hari kultivasi, sedangkan untuk produksi protein tertinggi pada konsentrasi 0,02 mg/L yaitu  $43,3 \pm 4,0$  mg/g [5].

Selain fitohormon, asam askorbat atau vitamin C juga berperan dalam pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*, karena asam askorbat dapat membantu proses fotosintesis menjadi lebih cepat terjadi. Asam askorbat atau vitamin C dapat berfungsi sebagai donor elektron dan peran fisiologinya sebagai donor untuk komponen rantai transpor elektron fotosintesis [6].

Kandungan nutrisi pada media menentukan kualitas *Chlorella* yang ditumbuh kembangkan di dalamnya. Dengan demikian penentuan jenis media yang akan digunakan untuk memperbanyak sel *Chlorella* dapat diatur tergantung pada tujuan dari perbanyakan sel tersebut. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini, yaitu menggunakan fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP) dan Vitamin C untuk mendapatkan biomassa dan meningkatkan kandungan protein mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan menambahkan fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP) dan Vitamin C ke dalam media Bold's Basal Media (BBM).

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; perlengkapan kultivasi (pompa akuarium, selang akuarium, botol kaca 500 mL, karet, plastik, dan sedotan), peralatan gelas, bola hisap, labu semprot, corong, botol vial, spektrofotometer UV-Vis, oven, autoclave, freezer, mikroskop cahaya, hotplate, dan neraca analitis.

### 2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Chlorella vulgaris* yang sudah tersedia di laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia Universitas Andalas, stok zat media BBM ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MoO}_3$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), reagen Bradford, larutan Bovin Serum Albumin (BSA), akuades, asam askorbat (Vitamin C), dan 6-Benzil Amino Purin (BAP), alumunium foil, dan plastik warp.

### 2.3 Prosedur Penelitian

#### 2.3.1 Pembuatan Larutan Fitohormon BAP dan Vitamin C

Fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP) didapatkan dari Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Agroekoteknologi Universitas Andalas. Fitohormon 6-Benzil Amino Purin (BAP) ditimbang 10 mg, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan akuades, sehingga didapatkan larutan BAP dengan konsentrasi 100 mg/L. Larutan stok BAP 100 mg/L dipipet sebanyak 2 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan diencerkan dengan akuades, sehingga didapatkan konsentrasi 10 mg/L. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan diencerkan dengan akuades, sehingga didapatkan larutan BAP dengan variasi konsentrasi 1,5; 2; dan 2,5 mg/L, dimana volume penggunaan pada media 1 mL/L. Larutan BAP yang telah dibuat disimpan pada lemari pendingin.

Asam askorbat (vitamin C) didapatkan dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Andalas. Vitamin C ditimbang 10 mg dan diencerkan dengan akuades pada labu ukur 100 mL dengan akuades sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 100 mg/L. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan diencerkan dengan akuades, sehingga didapatkan larutan vitamin C dengan variasi konsentrasi 6; 8; dan 10 mg/L, dimana volume penggunaan dari vitamin C yaitu 1 mL/L. Larutan Vitamin C yang telah dibuat disimpan pada tempat yang terhindar dari sinar matahari.

#### 2.3.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Kultivasi mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan dalam 7 variasi media pada botol kaca 500 mL. Komposisi masing-masing media sebagai berikut:

**Tabel 1.** Variasi media pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*

Media	BBM	BAP	Vitamin C
-------	-----	-----	-----------

	(mL)	(mL)	(mL)
BBM	500	-	-
BBM+BAP 1,5 mg/L	500	0,5	-
BBM+BAP 2 mg/L	500	0,5	-
BBM+BAP 2,5 mg/L	500	0,5	-
BBM+Vitamin C 6 mg/L	500	-	0,5
BBM+Vitamin C 8 mg/L	500	-	0,5
BBM+Vitamin C 10 mg/L	500	-	0,5

**2.3.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella vulgaris***  
Mikroalga *Chlorella vulgaris* dikultivasi pada media yang telah dimodifikasi. Isolat *Chlorella vulgaris* diperoleh dari Laboratorium Biokimia Universitas Andalas Padang, dikultur pada masing-masing media ke dalam botol kaca 500 mL pada kondisi yang sama. Bibit yang digunakan 1:9 dari volume kultur, yaitu 50 mL isolat mikroalga *Chlorella vulgaris* dan 450 mL media. Setiap hari dilakukan *sampling* kultur dengan mengukur nilai *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm, nilai OD yang diperoleh setiap hari diplotkan ke dalam kurva pertumbuhan.

#### 2.3.4 Pemanenan dan Pengeringan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga *Chlorella vulgaris* dipanen pada akhir fase eksponensial. Kultur dipanen menggunakan metode pengendapan mikroalga, yaitu dengan cara mematikan aerasi dan didiamkan. Endapan yang terbentuk dipipet dan dikumpulkan di dalam *petri dish*, kemudian didiamkan sambil dikering anginkan untuk mengurangi volume air, sehingga diperoleh biomassa kering dan ditimbang.

#### 2.3.5 Penentuan Kandungan Protein

Kandungan protein pada mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultur dalam berbagai variasi media ditentukan menggunakan metode Bradford. Tahapan pertama, dilakukan pembuatan larutan standar protein yaitu larutan Bovin Serum Albumin (BSA). Larutan induk BSA 1000 mg/L dipipet 10 mL dan diencerkan dengan akuades pada labu ukur 100 mL, sehingga didapatkan larutan BSA dengan konsentrasi 100 mg/L. Kemudian dibuat larutan deret standar dengan konsentrasi 0; 1; 7; 14; 21; 28 mg/L. Larutan tersebut diencerkan dengan akuades pada labu ukur 10 mL. Masing-masing konsentrasi dipipet 0,5 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen Bradford masing-masingnya 10 mL dan diinkubasi selama 20 menit. Setelah itu

diukur larutan standar menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 595 nm. Tahapan kedua, dilakukan persiapan sampel. Sampel kultur dari masing-masing media dipipet sebanyak 0,5 mL ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL reagen Bradford, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Setelah itu diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm.

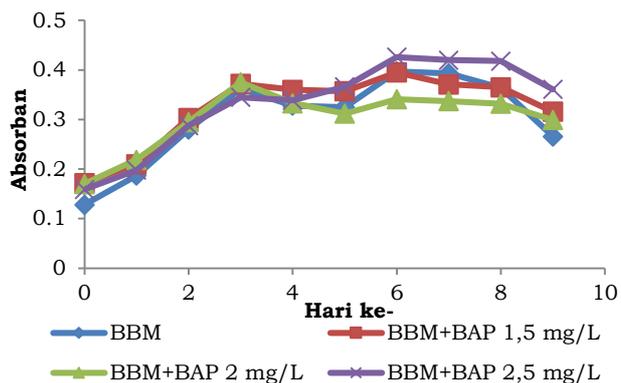
### 3. Hasil dan Diskusi

Kultivasi mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor umum seperti faktor lingkungan. Faktor-faktor lingkungan tersebut berpengaruh terhadap laju pertumbuhan dan metabolisme dari mikroalga ini [7]. Salah satu faktor yang berpengaruh pada penelitian ini adalah nutrisi. Konsentrasi nutrisi untuk mikroalga yang dikultur secara umum lebih tinggi daripada yang ada di alam. Pengaruh nutrisi terhadap mikroalga ditentukan dengan laju pertumbuhan spesifik mikroalga [6].

Pertumbuhan mikroalga secara visual dapat ditandai dengan berubahnya warna kultur. Perubahan warna kultur mikroalga terjadi karena mikroalga berfotosintesis. Mikroalga *Chlorella vulgaris* merupakan alga hijau yang memiliki banyak klorofil didalam selnya. Dengan adanya klorofil, mikroalga dapat membentuk makanannya sendiri yang diperoleh dari reaksi fotosintesis. Fotosintesis dapat diartikan sebagai proses sintesis bahan organik dari bahan anorganik dengan bantuan cahaya. Sumber cahaya yang digunakan secara alami adalah sinar matahari [8].

#### 3.1 Laju Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

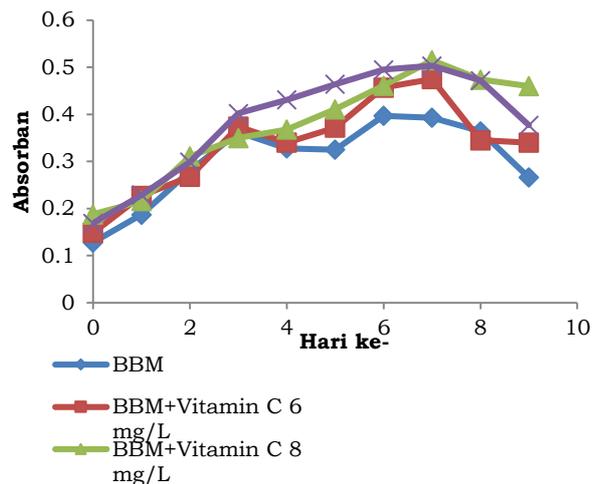
Pertumbuhan sel dalam media diamati melalui pengukuran OD pada panjang gelombang 450 nm. Karena pada panjang gelombang tersebut terjadi penyerapan maksimum oleh klorofil-a. Tujuan dari pengukuran OD adalah untuk menentukan kepadatan sel [9]. Dari hasil pengamatan selama 9 hari, diperoleh kurva pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dalam media BBM, BBM+BAP, BBM+vitamin C. Nilai OD yang didapatkan pada pertumbuhan mikroalga mewakili jumlah sel pada kultur.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* berdasarkan OD dalam variasi media BBM dan BBM+BAP.

Fitohormon BAP mengandung nitrogen yang dapat membantu pertumbuhan, peningkatan pembelahan sel pada sintesis DNA, dan pembentukan protein pada mikroalga [10]. Gambar 1 diatas dapat dilihat bahwa, nilai OD yang tinggi terjadi pada hari ke-6 yaitu pada media BBM+BAP 2,5 mg/L. Hal ini terjadi karena, semakin besar konsentrasi BAP yang diberikan, maka semakin cepat terjadinya pembelahan sel dan semakin besar kerapatan sel yang ditandai dengan warna hijau pekat pada kultur.

Menurut Ali (2017), penambahan fitohormon sintesis dapat meningkatkan pertumbuhan mikroalga, karena fitohormon memiliki unsur nitrogen, akan tetapi fitohormon juga dapat menyebabkan stress pada mikroalga apabila konsentrasi fitohormon yang ditambahkan ke dalam media mikroalga terlalu tinggi, sehingga akan menyebabkan racun atau mengganggu pertumbuhan mikroalga akibat menumpuknya sisa-sisa metabolisme dan zat organik. Jika konsentrasi fitohormon yang diberikan terlalu rendah, pertumbuhan mikroalga menjadi kurang optimum karena nutrisi tambahan yang diberikan kurang terhadap mikroalga. Oleh karena itu penambahan fitohormon ke dalam media mikroalga dapat diberikan pada konsentrasi yang sesuai dan jumlah yang sedikit [11].



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* berdasarkan OD dalam variasi media BBM dan BBM+Vitamin C.

Gambar 2 menunjukkan nilai OD tertinggi terjadi di hari ke-7 pada media BBM+vitamin C 8 mg/L, sedangkan pada media BBM+vitamin C 10 mg/L mikroalga *Chlorella vulgaris* mengalami kejenuhan karena tidak mampu menyerap banyak nutrisi, sehingga laju pertumbuhannya menurun. Saat proses transport elektron pada fotosintesis, vitamin C mendonorkan elektronnya. Vitamin C mendonorkan elektronnya pada fotosistem yang kehilangan elektron, sehingga dapat meningkatkan kerja fotosistem pada saat fotosistem tidak aktif bekerja dalam kondisi stress. Donor elektron dari vitamin C mampu mengembalikan fungsi dari fotosistem dan menjaga agar proses aliran elektron tetap berlangsung [6].

### 3.2 Pemanenan dan Pengeringan mikroalga *Chlorella vulgaris*

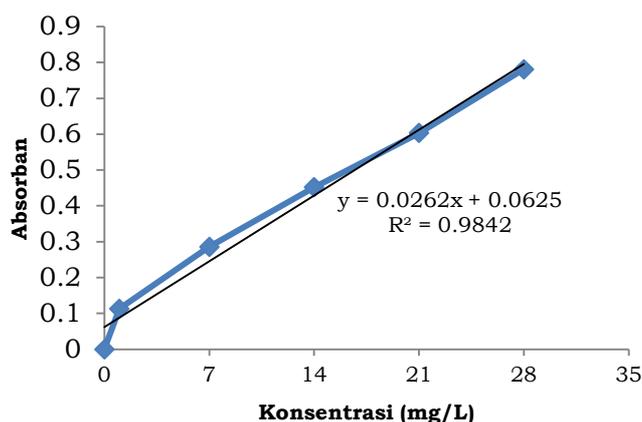
Pemanenan mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan pada akhir fase eksponensial tercapai, karena pada fase ini terjadi pertumbuhan sel yang konstan dan kelimpahan sel sedang tinggi. Pemanenan dilakukan dengan menggunakan metode flokulasi, yaitu pemanenan dengan cara mengendapkan mikroalga pada tabung kultur, sehingga mikroalga akan saling berkumpul membentuk suatu gumpalan massa yang lebih besar [8]. Kultivasi mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan.

Pengeringan dilakukan dengan cara dikering anginkan, karena jika dikeringkan dengan pemanas berkemungkinan senyawa protein di dalam mikroalga akan rusak atau terdenaturasi. Senyawa protein akan terdenaturasi pada suhu 40°C. Hasil total biomassa terbanyak didapatkan pada media

BBM+BAP 3,5 mg/L sebesar 900 mg, dan pada media BBM+Vitamin C 8 mg/L sebesar 1116,6 mg. Fitohormon BAP dan vitamin C berpengaruh terhadap meningkatnya biomassa mikroalga, karena dengan mendonorkan elektron pada fotosistem, proses fotosintesis menjadi meningkat, sehingga semakin cepat dan banyak mikroalga melakukan pembelahan sel yang ditandai dengan pekatnya warna kultur.

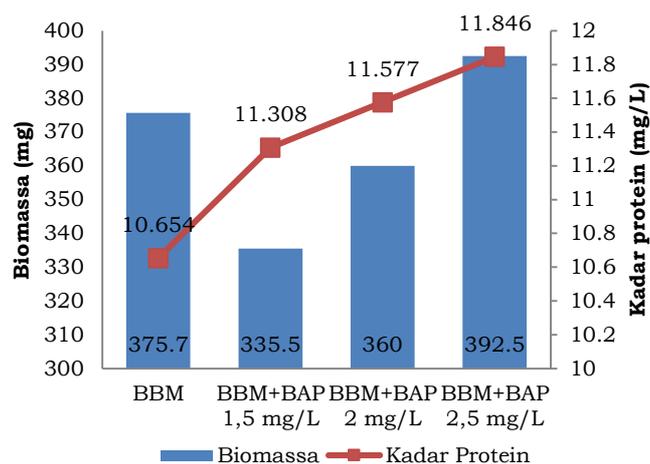
### 3.3 Penentuan Kadar Protein dari Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Pengukuran kadar protein menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 595 nm, karena pada panjang gelombang tersebut protein menyerap cahaya dengan maksimum di daerah sinar tampak. Warna larutan yang dihasilkan dari percobaan ini adalah warna biru keunguan. Berdasarkan perolehan data, maka kurva kalibrasi standar yang terbentuk adalah sebagai berikut:



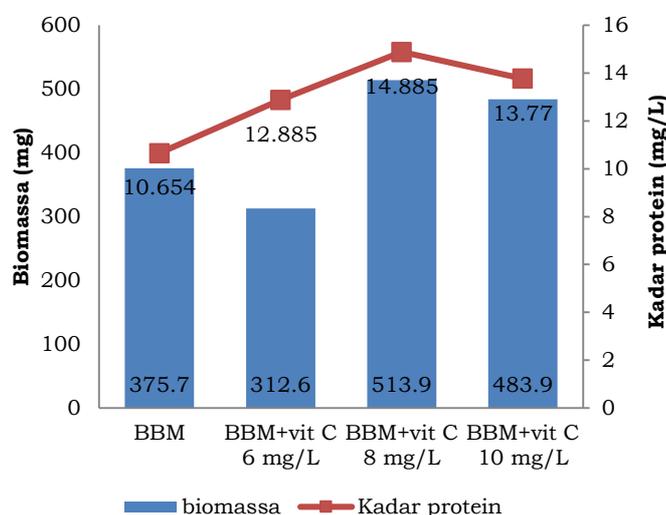
**Gambar 3.** Kurva larutan standar BSA

Nilai persamaan regresi larutan standar BSA digunakan untuk menghitung kadar protein pada mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultur dalam media BBM, BBM+BAP, dan BBM+Vitamin C. Nilai absorbansi masing-masing sampel protein dapat di *input* pada persamaan garis regresi larutan standar BSA tersebut. Hasil dari nilai absorbansi kultur mikroalga *Chlorella vulgaris* akan mempengaruhi nilai kadar protein.



**Gambar 4.** Pengaruh variasi media BBM dan BBM+BAP terhadap biomassa dan kadar protein.

Gambar 4 menunjukkan kadar protein pada media BBM+BAP 2,5 mg/L menghasilkan nilai yang maksimum, yaitu 11,846 mg/L. Hal ini menandakan bahwa, fitohormon BAP berpengaruh terhadap bertambahnya kandungan protein yang terdapat pada mikroalga *Chlorella vulgaris*. Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, maka semakin tinggi pula kadar protein yang dihasilkan.



**Gambar 5.** Pengaruh variasi media BBM dan BBM+Vitamin C terhadap biomassa dan kadar protein.

Kadar protein tertinggi pada Gambar 5 didapatkan sebesar 14, 885 mg/L pada medium BBM+Vitamin C 8 mg/L. Hasil ini didapatkan karena mikroalga *Chlorella vulgaris* menyerap nutrisi sangat baik saat pengkulturan selama 9 hari. Medium BBM+Vitamin C 10 mg/L mengalami penurunan kadar protein, hal ini terjadi

karena terjadinya kejenuhan pada mikroalga untuk mengikat senyawa protein.

Penambahan fitohormon BAP dan Vitamin C merupakan salah satu solusi yang tepat dalam meningkatkan kadar protein mikroalga *Chlorella vulgaris*, sehingga dapat dijadikan sebagai sumber makanan fungsional. Hasil pengujian kandungan protein tidak dapat digunakan langsung sebagai produk makanan fungsional, karena pengujian yang dilakukan bukanlah ekstraksi langsung melainkan hanya uji kuantitatif dari protein, sehingga hasil yang didapatkan masih bercampur dengan pelarut yang tergolong berbahaya bagi tubuh manusia [1].

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa penambahan fitohormon BAP dan Vitamin C berpengaruh terhadap pertumbuhan sel mikroalga *Chlorella vulgaris* untuk produksi protein. Medium BBM dengan penambahan fitohormon BAP 2,5 mg/L menghasilkan total biomassa dan kadar protein sebesar 900,0 mg dan 11,846 mg/L, sedangkan dengan penambahan vitamin C 8 mg/L menghasilkan total biomassa dan kadar protein sebesar yaitu 1116,6 mg dan 14,885 mg/L.

#### 5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dosen, Analis dan Rekan-rekan yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Andalas.

#### Referensi

- [1] Wijoseno, Tangguh.: Uji pengaruh variasi media kultur terhadap tingkat pertumbuhan dan kandungan protein, lipid, klorofil, dan karotenoid pada mikroalga *Chlorella vulgaris* *Buitenzorg*, *Skripsi*, Fakultas Teknik Universitas Indonesia, Depok, 2011.
- [2] Allaf, Malihe Mehdizadeh.: Effect of plant hormones on the production of biomass and lipid in microalgae, *Thesis*, Chemical and Biochemical Engineering, The University of Western Ontario, Ontario, 2013.
- [3] Tarakhovskaya, E.R.; Yu. I. Maslov.; M.F. Shisova.: Phytohormones in algae, *Russian Journal of Plant Physiology* 2007, 54, 163-170.
- [4] Wardani, Imaniah Bazlina.: Pengaruh kombinasi BAP (6-benzyl amino purine) dan NAA (naphtalen acetic acid) terhadap induksi tunas aksilar cendana (*Santalum album* L.), *Skripsi*, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2016.
- [5] Du, Huanmin.; Faruq, Ahmed.; Bin, Lin.; Zhe, Li.; Yuhan, Huang.; Guang, Sun.; Huan, Ding.; Chang, Wang.; Chunxiao Meng.; Zhengquan, Gao.: The effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* ZF strain, *Energies* 2017, 10 (1696), 2-23.
- [6] Ivanov, B. N.: Role of ascorbic acid in photosynthesis, *Biochemistry* 2014, 79(3), 364-372.
- [7] Chrismadha, Tjandra.; Lily, M. Panggabean.; Yayah, Mardiaty.: Pengaruh konsentrasi nitrogen dan fosfor terhadap pertumbuhan, kandungan protein, karbohidrat, dan fikosianin pada kultur *Spirulina fusiformis*, *Berita Biologi* 2006, 8(3), 163-169.
- [8] Pratama, Irfan.: Pengaruh metode pemanenan mikroalga terhadap biomassa dan kandungan esensial *Chlorella vulgaris*, *Skripsi*, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, Depok, 2011.
- [9] Rahman, Miftahur.; Andi, Setiawan.: Pengujian kandungan protein mikroalga *Spirulina sp.* dalam media pupuk, *Praktek Kerja Lapangan*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung, 2014.
- [10] Javid M.G.; Sorooshzadeh A.; Moradi F.; Sanavy Seyed A.M.M.; Allahdadi I.: The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants, *Australian Journal of Crop Science* 2011, 5, 726-734.
- [11] Parsaeimehr, Ali.; Elena, I.; Mancera-Andrade.; Felipe, Robledo

Padilla,; Hafiz, M. N. Iqbal,; Roberto, Parra-Saldivar.: A chemical approach to manipulate the algal growth, lipid content and high-value, alpha-linolenic acid for biodiesel production, *Algal Research* 2017, 26, 312-322.

# UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN ANTIBAKTERI DARI FRAKSI EKSTRAK METANOL DAUN TIN (*Ficus carica* Linn)

Bustanul Arifin\*, Suryati, Arif Rahman Hakim

Laboratorium Kimia Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas  
Jurusan Kimia FMIPA Unand, Kampus Limau Manis, 25163  
\*E-mail: [bustanularifin@sci.unand.ac.id](mailto:bustanularifin@sci.unand.ac.id)

**Abstrak:** Tumbuhan tin (*Ficus carica* Linn) banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat Timur Tengah seperti obat pencernaan, gatal-gatal dan peradangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder, aktivitas sitotoksik dan aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol dan masing-masing fraksi daun tin. Ekstraksi dilakukan secara langsung menggunakan pelarut metanol yang kemudian hasil ekstrak kental akan di fraksinasi menggunakan pelarut heksana, etil asetat, butanol dan air. Fraksinasi dilakukan secara berurutan sesuai tingkat kepolaran dimulai dari pelarut non polar hingga polar. Aktivitas sitotoksik dilakukan dengan metoda *Brine Shrim Lethality Test* (BSLT). Aktifitas antibakteri dilakukan dengan metoda difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid steroid dan triterpenoid, fraksi heksana mengandung steroid dan triterpenoid, fraksi etil asetat mengandung steroid dan triterpenoid, fraksi etil mengandung steroid dan triterpenoid dan fraksi sisa (air) hanya mengandung saponin. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol dan masing-masing fraksi aktif sebagai senyawa toksik dengan fraksi heksan memiliki nilai  $LC_{50}$  paling rendah yaitu 162,5395 mg/L. Pada uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan masing-masing fraksi menunjukkan aktifitas antibakteri sedang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

**Keywords:** *Ficus carica* Linn, fraksinasi, sitotoksik, antibakteri

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman tumbuhan yang dapat dibudidayakan karena bermanfaat besar bagi manusia dalam hal pengobatan. Dalam suatu tanaman terdapat banyak komponen kimia yang dapat di aplikasikan sebagai obat-obatan. Pada saat sekarang ini, banyak orang yang kembali menggunakan bahan alam sebagai pelaksanaannya membiasakan hidup dengan menghindari obat-obatan dari bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan mamfaat dari bahan alami. Ada banyak cara pengobatan dengan bahan alam yang dapat dipilih dalam penyembuhan berbagai macam penyakit seperti penggunaan ramuan obat berbahan herbal [1]. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat herbal walupun budidaya tumbuhan ini masih tergolong langka di Indonesia adalah *Ficus carica* Linn.

Tumbuhan tin (*Ficus carica* Linn) merupakan family *Moraceae* yang banyak tumbuhan di daerah tropis dan sub tropis sudah banyak dibudidayakan karena dipercaya dapat mengobati berbagai macam penyakit. Tumbuhan tin memiliki

berbagai macam khasiat seperti: antibodi, penyakit jantung, pernapasan, pencernaan, peradangan antiinflamasi, antioksidan, antikanker dan antibakteria [2,3]. Semua bagian tumbuhan tin memiliki manfaat terutama bagian daun diketahui memiliki banyak senyawa bioaktif seperti: arabinose,  $\beta$ -amirin,  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -sitosterol flavonoid, steroid, triterpenoid dan tannin [4]. Daun tin yang mengandung senyawa metabolit sekunder yang cukup banyak ini berpotensi sebagai obat dan penentuan uji bioaktivitasnya [5].

Daerah Turkey dan Timur Tengah, tumbuhan tin telah digunakan sebagai penyembuhan penyakit pencernaan dan peradangan [6]. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan beberapa uji bioaktivitas terhadap tumbuhan tin, diketahui daun tumbuhan tin ini memiliki senyawa yang berperan dalam dunia farmakologi. Ekstrak metanol daun tin menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri oral. Ekstrak metanol yang digunakan bersifat aktif terhadap bakteri mulut yang menunjukkan ekstrak metanol daun tin bersifat antibakteri [7]. Pada ekstrak heksana, etil asetat dan kloroform juga menunjukkan

sifat antimikroba secara *in vitro* pada metode difusi cakram [8].

Berdasarkan uraian tersebut, maka peneliti melakukan penelitian terhadap daun tumbuhan tin, yaitu ekstraksi daun tin menggunakan pelarut metanol dan fraksinasi ekstrak daun tin berdasarkan tingkat kepolaran serta uji bioaktivitas sitotoksik dan antibakteri dari fraksi heksana, etil asetat dan butanol belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, peneliti melakukan penelitian terhadap kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol daun tin dan masing-masing fraksi untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT serta aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

## 2 Metode Penelitian

### 2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat distilasi, corong pisah, alat grinder, botol reagen untuk maserasi, seperangkat *rotary evaporator*, neraca analitik dan teknis, oven, *chamber*, pipa kapiler, cawan petri, *autoclave*, mikropipet, jarum ose, spritus, tabung reaksi, inkubator, botol vial, laminar air flow, dan spektrofotometer UV-Vis.

### 2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel daun tin yang telah dikering anginkan. Pelarut teknis yang sudah didistilasi (heksana, etil asetat, butanol, akuades, dan metanol). Bahan untuk uji fitokimia yaitu Pereaksi Mayer untuk identifikasi alkaloid, pereaksi Liebermann Burchard untuk identifikasi triterpenoid dan steroid, Sianidin test untuk identifikasi flavonoid, besi (III) klorida untuk identifikasi fenolik, natrium hidoksida untuk identifikasi kumarin. Bahan untuk uji sitotoksik yaitu dimetilsulfoksida dan air laut. Bahan untuk uji antibakteri yaitu bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*). Kontrol positif berupa amoksisillin, media NA (*Nutrient Agar*), alkohol 70% dan NaCl 0,9%. Bahan Pendukung lainnya yaitu kertas saring media cakram dan filter, aluminium foil dan tisu.

### 2.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel daun tin. Selanjutnya dilakukan identifikasi, persiapan sampel, uji fitokimia, ekstraksi sampel, fraksinasi sampel, uji aktivitas sitotoksik dengan metoda BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan uji

aktivitas antibakteri dengan metoda difusi cakram.

#### 2.3.1 Identifikasi dan Persiapan Sampel

Tumbuhan tin diperoleh dari Kelurahan Tanah Pak Lambiak, Kota Padang Panjang, Sumatera Barat. Kemudian diidentifikasi di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) Jurusan Biologi Universitas Andalas Padang. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk penelitian yaitu daun. Sampel dipotong kecil dan dikering anginkan sampai rapuh, kemudian dihaluskan dengan alat *grinder* dan ditimbang.

#### 2.3.2 Ekstraksi Daun Tin

Sebanyak 1500 gram bubuk daun tin diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Sampel dimasukkan kedalam botol reagen, kemudian dimasukkan pelarut kedalam botol hingga ketinggian permukaan pelarut lebih kurang 2 cm di atas permukaan sampel. Penggantian pelarut dilakukan setiap 3 hari sekali agar senyawa pada sampel larut dengan sempurna. Maserasi dilakukan hingga sampel tidak berwarna atau larut sempurna. Filtrat hasil maserasi dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C sehingga didapatkan ekstrak metanol pekat dan ditimbang. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji fitokimia, uji aktivitas sitotoksik dan antibakteri.

#### 2.3.3 Fraksinasi Ekstrak Metanol

Sebanyak 38,71 g ekstrak pekat metanol di fraksinasi menggunakan pelarut heksana, etil asetat, dan butanol. Ekstrak pekat metanol dimasukkan ke dalam gelas piala 250 mL dan disuspensi dengan air kemudian ditambahkan heksana. Kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan dilakukan pengocokan selama ± 5 menit. Campuran didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan fraksi heksana dan lapisan air. Pisahkan lapisan atas yang merupakan lapisan fraksi heksana dari lapisan air. Fraksinasi menggunakan pelarut heksana dilakukan sampai warnanya tidak pekat lagi.

Setelah fraksinasi menggunakan heksana selesai, dilanjutkan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dan butanol dengan pengerjaan sama seperti fraksinasi menggunakan heksana. Dari proses fraksinasi ini diperoleh tiga fraksi yaitu fraksi heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol. Masing-masing fraksi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Setelah kering, ditimbang

massa masing-masing fraksi dan uji fitokimia, aktivitas sitotoksik dan antibakteri.

#### 2.3.4 Uji Kandungan Metabolit Sekunder

Ekstrak metanol dan masing-masing fraksi sebanyak 10 mg dilarutkan dengan pelarut masing-masing, kemudian di tambahkan kloroform dan akuades. Lapisan kloroform dan air dipisahkan, dimana lapisan kloroform berada dibawah untuk menguji kandungan triterpenoid dan steroid. Sedangkan lapisan air pada bagian atas digunakan untuk menguji kandungan senyawa flavonoid, fenolik, dan saponin.

##### a. Pemeriksaan Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan asam klorida pekat dan sedikit bubuk Mg ke dalam tabung reaksi yang berisi lapisan air. Jika terbentuk warna merah sampai jingga maka positif mengandung flavonoid [9].

##### b. Pemeriksaan Fenolik

Uji fenolik dilakukan dengan cara menambahkan 1-2 tetes pereaksibesi (III) klorida ke dalam tabung reaksi yang berisi lapisan air. Jika terbentuk warna biru kehitaman maka positif mengandung fenolik.

##### c. Pemeriksaan Saponin

Uji saponin dilakukan dengan mengocok lapisan air pada dalam tabung reaksi, jika terbentuk busa yang tidak hilang saat penambahan dua tetes asam klorida pekat maka positif mengandung saponin.

##### d. Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform diteteskan pada 3 lubang pelat tetes. Pelat pertama ditambahkan dua tetes asam sulfat pekat. Pada pelat kedua ditambahkan setetes anhidrida asetat dan asam sulfat pekat, sedangkan lubang pelat tetes ketiga sebagai pembandingnya. Apabila terbentuk warna merah keunguan maka positif mengandung triterpenoid, sedangkan cicin warnahijau atau biru hijau positif steroid [9].

##### e. Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak metanol dan masing-masing fraksi sebanyak 0,1 gram ditambahkan 10 mL kloroform dan 10 mL kloroform-amoniak 0,05 M kemudian diaduk. Campuran dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL asam sulfat 2 N, lalu diaduk dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan asam dan kloroform. Lapisan asam dipisahkan dan

ditambahkan beberapa pereaksi Mayer, apabila terbentuk endapan putih maka positif mengandung alkaloid [10].

##### f. Pemeriksaan Kumarin

Sebanyak 2 mg ekstrak metanol dan masing-masing fraksi dilarutkan dengan masing-masing pelarut. Kemudian ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler dan dielusi dengan heksana: etil asetat (8:2) di dalam *chamber*. Plat KLT yang telah dielusi diamati dibawah sinar UV 365 nm dan terlihat adanya fluoresensi biru dan setelah disemprot dengan basa (NaOH), warna biru tersebut bertambah terang maka positif menandakan adanya senyawa kumarin [10].

#### 2.3.5 Uji Aktivitas sitotoksitas dengan Uji Larva Udang *Artemia Salina* Leach

Uji bioaktivitas sitotoksik dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Tahapan uji sitotoksik sebagai berikut [11,12].

##### a. Penetasan Larva Udang *Artemiasalina* Leach

Air laut diaktivasi menggunakan oven pada suhu 55 °C untuk menghilangkan kontaminan pada air laut untuk menghilangkan pengotornya dimasukkan kedalam kontainer terbuat dari kaca berbentuk kubus yang dimodifikasi dan terdiri dari dua bagian, yaitu gelap dan terang serta dilengkapi dengan aerator, lampu pijar dan penutup. Telur Udang *Artemia salina* Leach dimasukkan pada sisi gelap kontainer, kemudian dihidupkan lampu pijar dan aerator pada sisi terang. Telur dibiarkan menetas selama 48 jam menjadi larva, kemudian larva akan bergerak ke sisi terang kontainer.

##### b. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 25 mg ekstrak metanol ditimbang dan dilarutkan dalam labu 25 mL sampai tanda batas dengan pelarut metanol sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 1000 mg/L. Larutan uji dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi melalui pengenceran bertingkat yaitu konsentrasi 1000; 500; 250; dan 125 mg/mL. Selanjutnya pembuatan larutan uji dilakukan terhadap fraksi heksana, etil asetat, dan butanol dengan perlakuan yang sama.

##### c. Uji Toksisitas

Sifat toksisitas dari masing-masing larutan uji ditentukan melalui nilai *Lethal Concentration-50* (LC<sub>50</sub>). Diambil 5 mL dari masing-masing variasi konsentrasi larutan

uji dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan pelarutnya. Setelah menguap ditambahkan 50 µL DMSO, 3 mL air laut dan 10 ekor larva udang ke dalam masing-masing botol vial, selanjutnya volume dicukupkan 5 mL dengan air laut. Dibiarkan selama 24 jam kemudian larutan sapel diamati dengan menghitung jumlah larva udang yang mati. Pengerjaan yang sama juga dilakukan dalam larutan kontrol tanpa penambahan larutan uji. Jumlah larva udang yang mati pada masing-masing konsentrasi larutan uji digunakan untuk menghitung nilai  $LC_{50}$  melalui analisa probit dan persamaan regresi.

### 2.3.6 Uji aktivitas antibakteri

#### a. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 10 mg ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol dilarutkan dengan 10 mL pelarut metanol, heksana, etil asetat dan butanol secara berurutan. Didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 mg/L. Kemudian dibuat variasi konsentrasi 125; 250; 500 mg/L yang selanjutnya akan diuji untuk aktivitas antibakteri.

#### b. Pembuatan media agar

Sebanyak 10 g NA, dimasukkan ke dalam gelas piala, lalu ditambahkan dengan akuades 500 mL. Campuran diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah homogen, kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C yang merupakan suhu optimum proses sterilisasi media agar. Setelah itu dimasukkan kedalam cawan petri dan dibiarkan mengeras.

#### c. Peremajaan kultur murni

Bakteri uji berupa *Staphylococcus aureus* dan *Echerichia coli* masing-masing diambil menggunakan jarum ose, kemudian dimasukan dengan cara digoreskan pada medium nutrient agar (NA) selajutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam [13].

#### d. Pembuatan suspensi mikroba uji

Bakteri uji masing-masing diambil dari biakan menggunakan jarum ose, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9% sebanyak 5 mL, didapatkan suspensi bakteri [14].

#### e. Pembuatan larutan amoxicillin (kontrol positif)

Amoksisilin tablet ditimbang sebanyak 0,01 g, kemudian dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL, didapatkan

larutan kontrol positif amoksisilin, selanjutnya dibuat variasi konsentrasi.

#### f. Pengujian aktivitas antimikroba

Penentuan aktifitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilakukan dengan menggunakan metode difusi dengan cara sumuran. Prosedurnya yaitu:

1. Siapkan 2 buah cawan petri yaitu untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*
2. Sebanyak 0,25 mL suspensi untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli* yang telah dibuat sebelumnya masing-masing dimasukan kedalam media NA, kemudian digoyangkan supaya homogen.
3. Tuangkan media NA yang telah berisi bakteri ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga mengeras
4. Cakram yang telah ditetesi larutan uji, kontrol positif dan kontrol negatif dipasang pada permukaan media agar.
5. Dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, diamati zona bening yang terbentuk dan ukur dengan jangka sorong

## 3. Hasil dan Diskusi

### 3.1 Identifikasi Tumbuhan Tin

Berdasarkan hasil identifikasi tumbuhan yang telah dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (ANDA) melalui surat Nomor 313/K-ID/ANDA/VII/2019 diketahui bahwa sampel yang digunakan termasuk kedalam family Moraceae, spesies *Ficus carica* L.

### 3.2 Ekstraksi Daun Tin

Seberat 1500 g serbuk daun tin yang didapatkan dari 5000 g daun tin basah yang telah dikering anginkan. Kemudian diestraksi menggunakan metoda maserasi dengan pelarut metanol. Pemilihan metoda ini dikarenakan penggunaannya yang sederhana serta tanpa alat khusus dan juga tidak membutuhkan pemanasan, sehingga senyawa yang terdapat didalam sampel tidak rusak. Pelarut metanol digunakan dalam proses ekstraksi dikarenakan pelarut metanol dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar, semipolar, dan non polar sehingga terekstrak secara sempurna. Massa ekstrak metanol yang diperoleh sebanyak 38,71 gram.

### 3.3 Fraksinasi Ekstrak Metanol

Hasil Fraksinasi dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3. Hasil fraksinasi dari ekstrak metanol.

Pelarut (fraksi)	Berat Fraksi(g)
Heksana	11,378
Etil Asetat	7,288
Butanol	3,624
Metanol/Sisa	1,721

Berdasarkan Tabel 3.3 dapat dijelaskan bahwa fraksi heksana memiliki berat fraksi yang lebih besar dibandingkan fraksi yang

lainnya yaitu 11,378 g. Hal ini disebabkan karena banyaknya senyawa-senyawa yang bersifat non polar pada sampel. Untuk fraksi sisa memiliki berat yang paling kecil, hal ini disebabkan karena semua senyawa pada sampel telah larut sempurna pada pelarut heksana, etil asetat dan butanol.

### 3.4 Uji Kandungan Metabolit Sekunder ekstrak metanol, fraksi heksana, fraksi etil asetat, butanol dan fraksi metanol daun tin

Hasil uji Kandungan Metabolit Sekunder dari ekstrak metanol dan fraksi dari ekstrak daun tin dapat dilihat pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Hasil uji kandungan metabolit sekunder dari daun tin

Kandungan kimia	Pereaksi	Ekstrak Metanol	Fraksi			
			Heksana	Etil Asetat	Butanol	Sisa
Flavonoid	Bubuk HCl	Mg/ -	-	-	-	-
Fenolik	Besi klorida	(III) -	-	-	-	-
Saponin	Air/ HCl pekat	-	-	-	-	+
Triterpe-noid	LB	+	+	+	+	-
Steroid	LB	+	+	+	+	-
Alkaloid	Mayer	+	-	-	-	+
Kumarin	NaOH 1 %	-	-	-	-	-

Keterangan: + (mengandung metabolit sekunder) (-) (tidak mengandung metabolit sekunder)

Berdasarkan Tabel 3.4 dapat ekstrak metanol, fraksi heksana, etil asetat, butanol dan fraksi sisa (air) daun tin mengandung senyawa steroid, triterpenoid, alkaloid dan saponin. Dapat dilihat pada tabel, senyawa metabolit sekunder terbanyak pada ekstrak daun tin yaitu senyawa triterpenoid dan steroid. Diketahui senyawa triterpenoid dan steroid dapat larut dalam pelarut non polar atau semi polar [15]. Pada uji fitokimia dan isolasi yang dilakukan oleh Sabir dan Seed diketahui pada daun tin mengandung senyawa metabolit sekunder triterpenoid, fenolik, bauerenol, lupeol metil maslinat dan asam aleonolik [16]. Perbedaan kandungan metabolit sekunder pada daun tin dalam satu spesies dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pengaruh lingkungan, iklim, genetik dan sebagainya [14]. Pada ekstrak metanol daun tin dan fraksi metanol didapatkan senyawa alkaloid. Menurut Cordell (1981)

menerangkan alkaloid bebas biasanya tidak larut dalam pelaut air, tetapi mudah larut dalam pelarut agak polar. Dalam bentuk garamnya, alkaloid mudah larut dalam pelarut organik polar [17]. Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol dan masing-masing fraksi merupakan senyawa yang aktif sebagai antibakteri dan sitotoksik.

### 3.5 Uji Aktivitas Sitotoksik dengan Metoda Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Uji sitotoksik dari ekstrak metanol dan masing-masing fraksi dari ekstrak metanol daun tin dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Pada metoda ini sifat toksisitas ditentukan melalui nilai LC<sub>50</sub>. Hasil uji sitotoksik dicantumkan pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5 Hasil pengamatan uji sitotoksik

No.	Sampel Uji	LC <sub>50</sub> (mg/L)
1.	Ekstrak Metanol	288,1008
2.	Fraksi Butanol	494,4084
2.	Fraksi Etil Asetat	191,5730
3.	Fraksi Heksana	162,5395

Pada Tabel 3.5 diketahui bahwa fraksi heksana memiliki nilai LC<sub>50</sub> yang paling rendah dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 162,5395 mg/L, sedangkan fraksi butanol memiliki nilai LC<sub>50</sub> tertinggi dengan nilai sebesar 494,4084 mg/L. Hasil ini diperoleh berdasarkan persentase kematian larva dari berbagai variasi konsentrasi yang dikonversikan menjadi nilai probit sesuai dengan tabel probit berdasarkan persentase kematian. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi larutan sampel berbanding lurus dengan jumlah larva udang yang mati. Nilai LC<sub>50</sub> dihitung berdasarkan nilai persamaan regresi antara log konsentrasi dengan nilai probit. Setelah didapatkan nilai regresi ekstrak dan masing-masing fraksi dapat dihitung nilai LC<sub>50</sub>. Berdasarkan nilai toksisitas, suatu senyawa atau zat dapat dikatakan sangat toksik jika memiliki nilai LC<sub>50</sub> ≤ 30 mg/L, bersifat toksik jika 31 mg/L ≤ LC<sub>50</sub> ≤ 10000 mg/L dan dikatakan bersifat tidak toksik jika LC<sub>50</sub> > 10000 mg/L [18]. Sehingga dapat diketahui bahwa aktivitas sitotoksik terhadap larva udang (*Artemia Salina* Leach) tertinggi ditunjukkan oleh fraksi heksana dengan LC<sub>50</sub> sebesar 162,5395 mg/L yang didapatkan dari persamaan regresi  $y = 1,6742x + 1,2983$ . Hal ini disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang ada pada fraksi heksana memiliki sifat toksik yang baik dibandingkan fraksi yang lain. Sehingga dapat dikatakan fraksi heksana daun tin memiliki senyawa yang bersifat toksik terhadap makhluk hidup. Selanjutnya diikuti oleh fraksi etil asetat sebesar 191,5730, ekstrak metanol sebesar 288,1008 mg/L dan aktivitas terendah yaitu pada fraksi butanol sebesar 494,4084 mg/L. Hasil uji menunjukkan senyawa yang terkandung pada ekstrak daun tin memiliki aktivitas sitotoksik yang baik. Pada hasil toksisitas ekstrak metanol dan masing-masing fraksi bersifat toksik terhadap larva udang *artemia salina* dengan nilai LC<sub>50</sub> ≤ 1000 mg/L [18].

### 3.6 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Masing-masing Fraksi dengan Metode Difusi Cakram

Uji aktivitas anti bakteri dilakukan terhadap ekstrak metanol dan masing-masing fraksi daun tin dengan menggunakan metoda difusi cakram dengan cara penentuan zona bening karena metode difusi cakram merupakan metode sederhana, tidak memerlukan peralatan khusus, dan relative murah untuk melihat sensitivitas mikroba uji terhadap senyawa antimikroba pada konsentrasi tertentu [19]. Pada penentuan aktivitas antimikroba bakteri yang digunakan yaitu bakteri *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif. Pemilihan bakteri ini dikarenakan daun tin memiliki khasiat sebagai obat saluran pencernaan dan peradangan serta bakteri mudah didapatkan dan umum digunakan dalam pengujian aktifitas antibakteri [6].

Penentuan aktivitas antibakteri pada daun tin bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak metanol dan masing-masing fraksi aktif sebagai antibakteri. Ekstrak metanol dan masing-masing fraksi dibuat dalam berbagai konsentrasi dengan perbandingan yang digunakan yaitu amoksisilin sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 62,5 mg/L. Pemilihan amoksisilin sebagai kontrol positif dikarenakan amoksisilin merupakan antibiotik yang sering digunakan orang pada umumnya. Amoksisilin mampu merusak dinding sel pada bakteri yaitu peptidoglikan sebagai penyusun dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif karena amoksisilin merupakan antibiotik yang kuat [20]. Kontrol negatif yang digunakan pada uji antibakteri yaitu pelarut-pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Hasil zona bening dari larutan uji dapat dilihat pada Tabel 4.4

Dari data pada Tabel 4.4 diketahui bahwa zona bening yang didapatkan berbanding lurus dengan konsentrasi, dimana semakin besar konsentrasi larutan uji maka diameter zona bening yang dihasilkan juga besar. Hasil menunjukkan zona bening yang dihasilkan pada perlakuan terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) lebih besar dibandingkan dengan bakteri gram negatif (*Escheria coli*). Janie dan Kuswanto (1994) menyatakan bahwa keefektifan suatu zat antibakteri dalam menghambat

pertumbuhan tergantung pada sifat bakteri uji, konsentrasi dan lamanya waktu kontak. Bakteri patogen *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana karena sekitar 90 persen dari dinding sel bakteri gram positif

tersusun atas peptidoglikan sedangkan sisanya berupa molekul lain bernama asamteikhoat. Pada *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki dinding sel ganda yang diselimuti plasmanya dan membran permiabel.

Tabel 4.4 Hasil pengukuran diameter zona bening terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

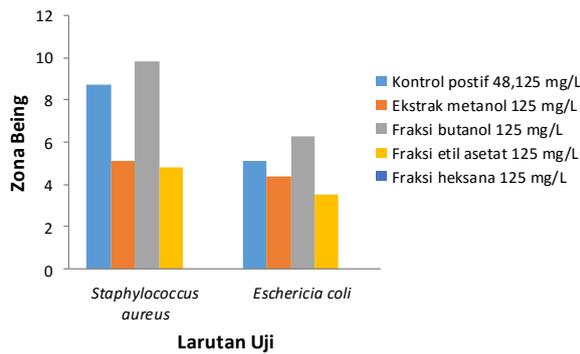
Bakteri	Konsentrasi (mg/L)	Diameter Zona Bening (mm)			
		Ekstrak Metanol	Fraksi Butanol	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Heksana
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	5,1	9,8	4,8	0
	250	5,6	11	5,5	0
	500	6,2	12,4	6,1	0
	1000	6,7	15,7	6,7	0
	Kontrol positif amoksisilin (48,125)	8,7	9,2	9	6,7
	Kontrol negatif (Pelarut)	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	125	4,4	6.3	3.5	0
	250	4.1	7.1	4,1	0
	500	5	10.8	4,8	0
	1000	5.7	12.2	5.3	0
	Kontrol positif amoksisilin (48,125)	5.1	5	5.4	6.1
	Kontrol negatif (Pelarut)	0	0	0	0

Konsentrasi yang berbeda pada larutan uji memberikan nilai zona hambat yang berbeda juga untuk masing- masing bakteri [21].

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri yang bersifat patogen dikarenakan dapat merugikan manusia dalam kehidupan sehari-hari. Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang sering ditemui pada usus manusia yang dapat menyebabkan diare, Sedangkan bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat merusak produk daging

dan ikan. Sehingga jika dikonsumsi oleh manusia menyebabkan penyakit radang mukosa pada usus.

Hasil perbandingan antara kontrol positif dan larutan uji dengan konsentrasi 48,125 mg/L untuk kontrol positif amoksisilin yang merupakan senyawa aktif antibakteri dan 125 mg/L untuk larutan uji yang menunjukkan adanya perbedaan zona bening yang dihasilkan. Data hasil zona bening dapat dilihat pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Grafik perbandingan zona bening larutan uji dan kontrol positif

Dari data diatas dapat dilihat bahwa fraksi butanol memiliki zona hambat yang paling besar untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Berdasarkan literatur, menurut Davis dan Stout (1971), kriteria kekuatan daya antimikroba dikatakan lemah jika diameter zona hambat  $\leq 5$  mm, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, dan zona hambat 200 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat [22].

Berdasarkan hasil yang didapat dijelaskan bahwa pada penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 125 mg/L dapat dilihat dari ukuran zona bening, ekstrak metanol zona bening (5,1 mm), pada fraksi butanol ( 9,8 mm ), pada fraksi etil asetat (4,8 mm) ,dan fraksi heksana tidak menunjukkan adanya zona bening. Pada bakteri *Escherichia coli* ekstrak metanol (4,4 mm), fraksi butanol (6,4 mm), fraksi etil asetat (3,5 mm) dan fraksi heksana tidak menunjukkan zona bening. Dapat disimpulkan bahwa fraksi butanol pada konsentrasi 125 mg/L memiliki aktifitas antibakteri paling baik dan sudah mendekati kontrol positif amoksisilin yang merupakan senyawa aktif antibakteri. Hal ini disebabkan pada fraksi butanol memungkinkan terdapatnya senyawa-senyawa yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan pada fraksi lainnya senyawa yang terkandung pada ekstrak merupakan senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan yang rendah. Pada hasil dapat dilihat fraksi butanol memiliki diameter zona bening paling besar dan dapat dikategorikan bersifat antibakteri [22].

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap daun tin dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, steroid, dan triterpenoid, fraksi heksana mengandung steroid dan triterpenoid, fraksi etil asetat mengandung steroid dan triterpenoid, fraksi etil asetat mengandung steroid dan triterpenoid dan fraksi sisa (air) hanya mengandung saponin. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol dan masing-masing fraksi aktif sebagai senyawa toksik dan fraksi heksana memiliki nilai  $LC_{50}$  paling rendah yaitu 162,5395 mg/L. Pada uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan masing-masing fraksi menunjukkan aktifitas antibakteri sedang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dapat dilihat pada diameter zona bening.

#### Referensi

1. Kardinan, A.; Kusuma F.R.: Menerin Penambah Daya Tahan Tubuh Alami. Agromedia Pustaka. Jakarta 2014.
2. Duke, J.A.; Bugenschutzgodwin, M.J.; Ducollire, J.; Duke, P.K.: *Hand book of medicinal herbs, 2nd ed*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA 2005.
3. Mawa, S.; Husain, K.; Jantan, I. *Ficus carica L.* (Moraceae): Phytochemistry, traditional uses and biological activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013, Article ID 974256.
4. Joseph, B.; & Raj, S.J.: Pharmacognostic and Phytochemical Properties of *Ficus carica Linn*-An overview. *International Journal of Pharmtech Research* 2011, 3, 8-12.
5. Vaya, J.; & Mahmood, S.: Kandungan Flavonoid Dalam Ekstrak Daun Ara (*Ficus carica L.*), Carob (*Ceratonia siliqua L.*) dan Pistachio (*Pistacia lentiscus L.*). *Biofactors* 2006, 28, 169-175.
6. Lee Y. S.; and Cha, J. D.: Synergistic Antibacterial Activity of Fig (*Ficus carica*) Leaves Extract Against Clinical Isolates of Methicillin- Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Korean Journal of Microbial Biothechnol* 2010, 38, 405-413.
7. M. R, Jeong.; H. Y. Kim.; & Cha, J. D.: Antimicrobial Activity of Methanol Extract from *Ficus carica* Leaves Against Oral Bacteria. *Journal of Bacteriology and Virology*. 2009, 39, 97-

- 102.
8. H. L, Aref.; K. B. H, Salah; J.P, Choumont.; A. Fekih .; M. Aouni.; & K. Said.: In Vitro Antimicrobial Activity of Four *Ficus carica* Latex Fractions Against Resistant Human Pathogens (Antimicrobial Activity of *Ficus carica* Latex). *Pakistan Journal of Phamceutical Sciences* 2010, 23 53-58.
  9. Dwisari, F.; Harlia; Hairil A.A.: Isolasi dan karakterisasi senyawa triterpenoid ekstrak metanol akar pohon kayu buta-buta (*Excoecaria agallocha* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 2016, 5(3), 25-30.
  10. Rasyid, A.: Identifikasi senyawa metabolit sekunder serta uji aktivitas antibakteri dan antioksidan ekstrak metanol teripang (*Stichopus hermannii*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 2012, 4 (2), 360-368.
  11. Ningdyah A.W; Alimuddin, A.H; Jayuska, A. Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). *JKK* 2015, 4,75-83.
  12. Tianandari.; Febri.; dan Rasidah.: Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Buah Ketumbar (*Coriandrum sativum* Linn) Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Aceh Nutrition Journal*. 2017.
  13. Nurfadilah.: *Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Lamun Dari Kepulauan Spermonde*, Kota Makassar. Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar, 2013.
  14. Bajalana, I.; Mohammadia, M.; Alaeia, M.; Ghasemi P.A.: Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from different populations of lavender. *Journal Industrial Crops and Products* 2016, 87, 255-260.
  15. Harborne, J. B.: *Metoda Fitokimia*. Terjemahan: Padmawita, K dan Soediro I. Institut Terknologi Bandung, 2013.
  16. Oliveira, A. P.; Valentao, P.; Pereira, J. A.; Silva, B. M.; Tavares, F.; and Andrade, P. B.: *Ficus carica* L. Metabolic and Biological Screening. *Food and Chemical Toxicology* 2009, 47, 2841-2846.
  17. Cordell, A.; Introduction to alkaloid, A Biogenetik Approach, A Wiley. *Interscience Publication*. New York. 1981.
  18. Frengki, Roslizawaty, Pertiwi, D. Toxicity Test Of Ethanol Extract Ant Plant Local Aceh (*Mymercodia Sp*) Method Of Bslt Larvae Shrimp *Artemia Salina* Leach. *Jurnal Medika Veterinaria* 2014, 8, 60-62.
  19. Oktavia, Dewi, H.: Uji Aktivitas Bakteri Menggunakan Metode Cakram Disk (*Kirby-Bauer*). Banjarbaru : Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Banjarmasin.
  20. Wahyuni.; Lara, S.: Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kubis (*Brassica Oleraceae* L. var. *Capitata* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah ; Jakarta, 2014.
  21. Jenie, B. S. L.; dan Kuswanto.: Aktivitas Antimikroba Dari Pigmen Angkak yang Diproduksi Oleh *Monasrns Purpuracs* Terhadap Beberapa Mikroba Patogen dan Perusak Makanan. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Tahunan Permi* 1994, 53-62.
  22. Davis, W. W.; dan Stout T. R.: Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error. *Applied Microbiology* 1971, 22, 64-6 Davis, W. W.; dan Stout T. R.: Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error. *Applied Microbiology* 1971, 22, 64-67.

# IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER, UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN UJI FENOLIK TOTAL DARI EKSTRAK DAUN BENALU JENGKOL (*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser)

Norman Ferdinal\*, Adlis Santoni, Alldila Ramadhani Rusita

<sup>a</sup>Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

<sup>a</sup>email: ferdinalnorman@yahoo.co.id

**Abstrak :** Identifikasi senyawa metabolit sekunder, uji aktivitas antioksidan, dan uji fenolik total dari ekstrak daun *Scurrula ferruginea* (*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser) telah dilakukan. Ekstraksi daun benalu dilakukan dengan cara maserasi. Metabolit sekunder yang terkandung pada daun benalu jengkol yaitu alkaloid, fenolik dan steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun benalu pohon jengkol. Pelarut metanol, etil asetat, dan heksana digunakan untuk mengekstrak senyawa kimia dengan metoda maserasi. Penentuan kandungan fenolik total dengan metoda Folin-Ciocalteu dan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metoda DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan fenolik total paling tinggi terdapat pada ekstrak metanol (1,05 mg GAE/10 mg ekstrak kering). Aktivitas antioksidan ketiga ekstrak dengan nilai IC<sub>50</sub> (141,7723 mg/L) tergolong sedang antioksidan, sedangkan ekstrak etil asetat (295,3028 mg/L) dan ekstrak heksana (358,0365 mg/L) tergolong lemah antioksidan.

**Kata kunci:** *Scurrula ferruginea* (Jack.) Danser., antioksidan, fenolik total

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman tumbuhan dan sumber daya hayati dari hutan tropis dan memiliki keanekaragaman ekosistem dan dikenal sebagai negara megabiodiversitas kedua setelah Negara Brazil. Keanekaragaman hayati tersebut merupakan aset bangsa sebagai sumber devisa negara<sup>1</sup>. Oleh karena itu, setiap spesies tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme yang terdapat didarat maupun dilaut mempunyai nilai-nilai kimiawi dalam arti menghasilkan bahan-bahan kimia yang banyak baik jenis maupun jumlahnya, maka keanekaragaman hayati yang tersedia di Indonesia dapat dijadikan sebagai sumber bagi keanekaragaman bahan kimia<sup>2</sup>. Bahan alam yang digunakan sebagai obat-obatan cenderung memiliki efek samping lebih kecil dibandingkan dengan pengobatan secara modern yang mempunyai efek samping lebih berbahaya bagi tubuh manusia<sup>3</sup>.

Benalu adalah tumbuhan semi-parasit, yang awalnya dianggap tumbuhan yang merugikan karena merusak tanaman. Namun benalu berpotensi sebagai ramuan obat-obatan. Secara tradisional beberapa spesies benalu sejak jaman dahulu telah digunakan untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit antara lain sebagai obat batuk, kanker, diuretik, antiradang,

antibakteri, luka atau infeksi kapang<sup>4</sup>. Kandungan kimia yang terdapat dalam benalu adalah fenolik, tanin, asam amino, karbohidrat, alkaloid dan saponin<sup>2,3</sup>. Senyawa-senyawa fenolik sangat berperan aktif sebagai antioksidan. Senyawa fenolik memiliki struktur yang dapat menyumbangkan hidrogen atau elektron terhadap asektor seperti spesi oksigen reaktif atau gugus peroksil dari lemak, sehingga dapat meredam keaktifan oksigen dan radikal peroksil<sup>3,4</sup>.

*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser dikenal dengan nama lokal benalu, dapat dimanfaatkan sebagai obat penyubur kaum wanita. Cabang benalu bisa dimanfaatkan sebagai obat gabag, herbanya sebagai obat campak (benalu yang terdapat di pohon kelor), kencing manis, cacangan (benalu yang terdapat di pohon delima), cacar air, cacing tambang, dan kanker. Berbeda tempat tumbuhnya maka berbeda pula kandungan zat yang terdapat di dalamnya dan berbeda pula manfaat dari benalu tersebut<sup>4,5</sup>. Hal ini disebabkan karena benalu tersebut mengambil nutrisi dan senyawa pertahanan diri dari tumbuhan inang tempat tumbuhnya untuk menjaga kelangsungan hidup dan mencegah pendeteksian hewan herbivore<sup>5</sup>. Pada benalu jengkol belum ditemukan artikel yang telah meneliti manfaat dari benalu ini. Jadi tidak ditemukan data yang kongkrit

tentang manfaat benalu jengkol, itulah fungsi dari mengidentifikasi sampel serta skrining awal untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan fenolik totalnya.

Aktivitas antioksidan diukur dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). DPPH adalah senyawa radikal bebas yang stabil. Menurut Nishizawa *et al.* (2005) DPPH telah diketahui manfaatnya sebagai penentuan aktivitas antioksidan untuk menguji aktivitas antioksidan radikal dari vitamin yang bersifat antioksidatif dan komponen aromatik *polyhydroxy*.

Aktivitas antioksidan juga dinyatakan dalam IC<sub>50</sub>, yaitu konsentrasi sampel yang dapat menurunkan atau menangkap sebanyak 50% radikal bebas. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka semakin tinggi aktivitas antioksidan sampel. Aktivitas antioksidan digolongkan kuat jika nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 50 mg/L, aktif jika nilai IC<sub>50</sub> 50-100 mg/L, sedang jika nilai IC<sub>50</sub> 101-250 mg/L, lemah jika nilai IC<sub>50</sub> 250-500 mg/L, dan tidak aktif jika nilai IC<sub>50</sub> lebih besar dari 500 mg/L<sup>6</sup>.

Penetapan kandungan fenolik total dilakukan dengan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu. Prinsip dari metode Folin-Ciocalteu adalah mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi Folin-Ciocalteu menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten menghasilkan senyawa kompleks berwarna biru sehingga dapat diukur absorbannya pada panjang gelombang 765 nm. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu hanya dalam suasana basa dapat digunakan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka semakin banyak ion fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menjadi kompleks molibdenum-tungsten sehingga warna biru yang dihasilkan semakin pekat<sup>7</sup>.

Berdasarkan hal diatas dilakukan penelitian dengan judul "Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder, Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Fenolik Total dari Ekstrak Daun Benalu Jengkol (*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser)".

## 2. Metodologi Penelitian

### 2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu gerinda, neraca analitik, seperangkat

alat distilasi, botol reagen, rotary evaporator BUCHI R-124, chamber, pipa kapiler, lampu UV (254 nm dan 356 nm), spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific, mikroplat-96, mikropipet Dialine Eco dan alat-alat gelas lainnya yang lazim digunakan di Laboratorium.

### 2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu heksana, etil asetat, dan metanol yang telah didistilasi. Bahan yang digunakan untuk uji fitokimia yaitu kloroform, pereaksi Mayer, asam sulfat 2 N, kloroform-ammoniak 0,05 M untuk identifikasi alkaloid, pereaksi Lieberman Burchad (anhidrida asetat dan asam sulfat pekat) untuk identifikasi triterpenoid dan steroid, sianidin test (bubuk magnesium dan asam klorida pekat) untuk identifikasi flavonoid, besi (III) klorida untuk identifikasi fenolik, natrium hidroksida untuk identifikasi kumarin. Bahan untuk uji antioksidan yaitu DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan asam askorbat. Bahan untuk uji kandungan fenolik total yaitu natrium karbonat 20%, reagen Folin-Ciocalteu, asam galat dan akuades. Bahan pendukung lainnya yaitu plat KLT, kertas saring, alumunium voil, kapas, dan tisu.

### 2.3 Persiapan Reagen

#### 1. Pembuatan reagen uji fitokimia

##### a. Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 gram raksa(II)klorida ditimbang pada neraca analitik dan dimasukkan kedalam gelas piala kemudian dilarutkan dengan 60 mL akuades (larutan I). Pada gelas piala lainnya sebanyak 1 gram kalium iodida dilarutkan dengan 10 mL akuades (larutan II). Kedua larutan tersebut (larutan I dan larutan II) dicampurkan lalu disaring. Campuran tersebut diencerkan dalam labu ukur 100 mL dengan akuades.

##### b. Pereaksi Liebermann-Burchad

Sebanyak 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat dicampurkan secara perlahan didalam gelas piala lalu diencerkan hingga 100 mL dengan pelarut metanol.

##### c. Larutan besi (III) klorida 5%

Sebanyak 5 gram kristal besi (III) klorida dimasukkan kedalam gelas piala dan dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL.

##### d. Larutan asam sulfat 2 N

Sebanyak 13,9 mL asam sulfat pekat dimasukkan kedalam gelas piala yang sudah berisi 100 mL akuades secara perlahan melalui dinding gelas, kemudian diencerkan hingga volume 250 mL.

e. Larutan natrium hidroksida

Sebanyak 1 gram natrium hidroksida dilarutkan dengan akuades sampai volume 100 mL dalam gelas piala.

2.4 Uji fitokimia

2.4.1 Pemeriksaan flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan dengan mengambil beberapa bagian lapisan fraksi air hasil pemisahan filtrat ke tabung reaksi kemudian ditambahkan asam klorida pekat dan beberapa butir serbuk magnesium. Terbentuknya warna jingga sampai merah menunjukkan adanya flavonoid.

2.4.2 Pemeriksaan fenolik

Pemeriksaan fenolik dilakukan dengan mengambil beberapa bagian lapisan air ke tabung reaksi kemudian ditambahkan 1-2 tetes peraksi besi(III) klorida 5%. Terbentuknya warna hijau sampai biru menunjukkan adanya fenolik.

2.4.3 Pemeriksaan saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan mengambil beberapa bagian lapisan air ke tabung reaksi kemudian dikocok beberapa saat, bila terbentuk busa dan tidak hilang dengan penambahan asam klorida pekat menunjukkan adanya saponin.

2.4.4 Pemeriksaan steroid dan triterpenoid

Pemeriksaan triterpenoid dan steroid dilakukan dengan meletakkan 3 tetes lapisan kloroform ke 3 buah lubang plat tetes. Lubang 1 digunakan sebagai kontrol, lubang 2 ditambahkan 1 tetes anhidrida asetat dan asam sulfat p.a, dan lubang 3 ditambahkan asam sulfat p.a. Munculnya cincin warna merah atau ungu pada lubang 3 menunjukkan adanya triterpenoid dan cincin hijau atau biru pada lubang 2 menunjukkan adanya steroid.

2.4.5 Pemeriksaan alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan cara sampel daun benalu jengkol sebanyak 2-5 g dirajang dan dihaluskan dalam lumpang dengan penambahan sedikit pasir, kloroform dan amoniak 0,05 N sambil digerus perlahan. Kemudian disaring dan diletakkan ke tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N, dikocok perlahan, dan dibiarkan sampai terbentuk bidang batas antara 2 lapisan yaitu lapisan asam sulfat dan kloroform. Lapisan asam sulfat dipindahkan ke tabung reaksi lain dan ditambahkan pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya alkaloid.

2.4.6 Pemeriksaan kumarin

Pemeriksaan kumarin dilakukan dengan cara sampel daun benalu jengkol sebanyak

2-5 gram dirajang halus dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada batas bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler dan pelarut pada toloan dibiarkan menguap. Kemudian dielusi dalam bejana yang berisi 10 mL eluen etil asetat. Noda yang dihasilkan dimonitor di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. Hasil KLT kemudian disemprot dengan larutan natrium hidroksida 1% dalam etanol:air (1:1), dan selanjutnya dimonitor kembali dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 365 nm. Adanya fluoresensi yang bertambah terang setelah disemprot dengan natrium hidroksida 1% menunjukkan adanya kumarin.

2.5 Uji aktivitas antioksidan

2.5.1 Pembuatan larutan DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil)

Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan 10 mg masing-masing ekstrak dengan metanol dalam labu ukur 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi dari larutan sebesar 1000 mg/L. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi dari larutan uji dengan konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 mg/L. Asam askorbat dibuat variasi konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 mg/L yang digunakan sebagai kontrol positif.

2.5.2 Pengujian aktivitas antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan mengacu pada prosedur kerja yang dilakukan oleh Itam dengan beberapa modifikasi<sup>8</sup>. Larutan uji diambil masing-masing sebanyak 2 mL kemudian ditambahkan 3 mL larutan DPPH dan di diamkan selama 30 menit serta campuran dihindarkan dari cahaya. Kontrol negatif pada pengujian ini yaitu 2 mL metanol ditambahkan 3 mL larutan DPPH. Campuran tersebut dipipet sebanyak 200 µL dan dimasukkan kedalam mikroplat-96. Absorban dari masing-masing konsentrasi larutan uji dan kontrol diukur pada panjang gelombang 517 nm. Berdasarkan absorban yang didapatkan, dihitung % inhibisi dengan rumus berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan nilai % inhibisi dari perhitungan, dapat ditentukan nilai IC<sub>50</sub> dari setiap variasi konsentrasi larutan uji dengan menggunakan persamaan regresi yang didapatkan.

2.6 Uji fenolik total

2.6.1 Pembuatan larutan standar asam galat

Larutan standar dibuat dengan cara melarutkan 10 mg asam galat dalam 10 mL metanol di dalam labu ukur 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1000 mg/L. Variasi konsentrasi larutan standar dibuat dengan konsentrasi 6,25; 12,5; 25; 50 dan 100 mg/L. Sebanyak 0,5 mL diambil dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*. Campuran tersebut didiamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1 mL larutan natrium karbonat 20% dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut didiamkan selama 2 jam dan absorban diukur pada panjang gelombang 765 nm. Berdasarkan nilai absorban yang didapatkan, dibuat kurva kalibrasi dan didapatkan persamaan regresi dari larutan standar.

### 2.6.2 Pembuatan larutan ekstrak daun benalu jengkol

Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga didapatkan konsentrasi sebesar 1000 mg/L. Larutan induk 1000 mg/L diambil lagi sebanyak 5 mL dan dilarutkan dalam labu ukur 10 mL sehingga didapatkan konsentrasi sebesar 500 mg/L. Larutan induk 500 mg/L diambil sebanyak 0,5 mL dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*. Campuran tersebut di diamkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1 mL larutan natrium karbonat 20% dan diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut di diamkan selama 2 jam dan absorban diukur pada panjang gelombang 765 nm. Kandungan fenolik total masing-masing larutan uji ditentukan dari persamaan regresi kurva larutan standar. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE).

## 3. Hasil dan diskusi

### 3.1 Uji kandungan metabolit sekunder sampel daun benalu jengkol

Uji profil fitokimia dilakukan pada bagian daun benalu segar dan ekstrak daun benalu. Hasil pengujian tertera pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 hasil uji fitokimia daun benalu jengkol

Senyawa Metabolit Sekunder	Pereaksi	Daun segar	Hasil Ekstrak			
			M	EA	H	
Flavonoid	Sianidin test		-	+	-	-
Fenolik	Besi klorida (III)		+	+	+	-
Saponin	Air/ HCl p		-	-	-	-
Triterpenoid	Lieberman-Burchard		-	-	-	-
Steroid			+	+	+	+
Alkaloid	Mayer		+	+	-	-
Kumarin	NaOH 1 %		-	-	-	-

Flavonoid	Sianidin test	-	+	-	-
Fenolik	Besi klorida (III)	+	+	+	-
Saponin	Air/ HCl p	-	-	-	-
Triterpenoid	Lieberman-Burchard	-	-	-	-
Steroid			+	+	+
Alkaloid	Mayer	+	+	-	-
Kumarin	NaOH 1 %	-	-	-	-

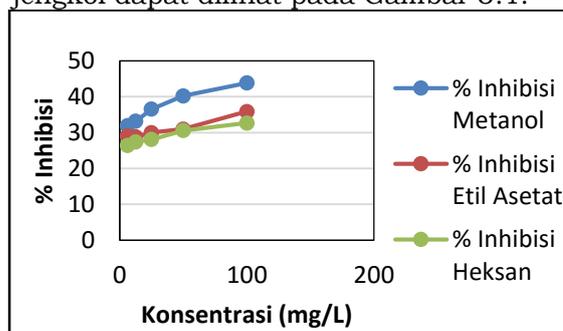
Keterangan : + (ada metabolit sekunder)

- (tidak ada metabolit sekunder)

Berdasarkan data tabel di atas, didapatkan informasi bahwa sampel segar daun benalu jengkol mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu fenolik, alkaloid dan steroid. Sedangkan hasil ekstrak dari daun benalu jengkol, memiliki hasil yang berbeda-beda dimana ekstrak metanol (M) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, fenolik, steroid dan alkaloid. Ekstrak etil asetat (EA) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu fenolik dan steroid. Ekstrak heksana (H) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu steroid.

### 3.2 Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui kapasitas senyawa aktif dalam ekstrak untuk menangkal radikal bebas. Masing-masing ekstrak dari sampel daun benalu jengkol diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode DPPH dan juga pengukuran terhadap kontrol positif yaitu asam askorbat. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil. Ekstrak daun benalu jengkol diuji dengan menggunakan variasi konsentrasi untuk melihat penghambatan (inhibisi) terhadap radikal bebas pada DPPH. Grafik aktivitas antioksidan dari ekstrak daun benalu jengkol dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Aktivitas antioksidan dari ekstrak daun benalu jengkol

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan persen inhibisi. Semakin besar konsentrasi ekstrak daun benalu jengkol maka persen inhibisi juga semakin besar. Hal ini disebabkan karena semakin banyak terdapat senyawa aktif dalam larutan sampel untuk menangkap radikal bebas pada DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan tereduksi menjadi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) sehingga sisa radikal bebas semakin sedikit dalam larutan tersebut. Nilai konsentrasi inhibisi ( $IC_{50}$ ) masing-masing ekstrak daun benalu jengkol dapat dilihat pada Tabel 3.2.

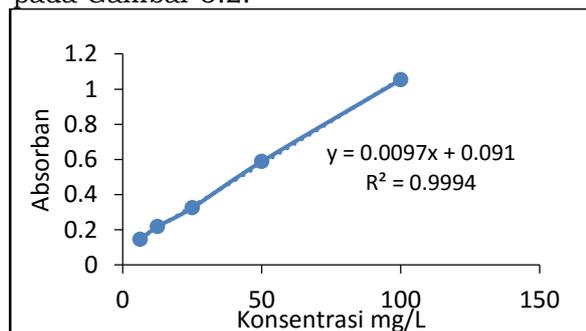
Tabel 3.2. Nilai konsentrasi inhibisi ( $IC_{50}$ ) dari ekstrak daun benalu jengkol

No.	Ekstrak	$IC_{50}$ (mg/L)
1.	Metanol	141,7723
2.	Etil Asetat	295,3028
3.	Heksana	358,0365
4.	Asam askorbat	19,4623

Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol (141,7723mg/L) tergolong sedang antioksidan, ekstrak etil asetat (295,3028 mg/L) dan ekstrak heksana (358,0365 mg/L) tergolong lemah antioksidan.

### 3.3 Hasil penentuan kandungan fenolik total ekstrak daun benalu jengkol dengan metode folin-ciocalteu

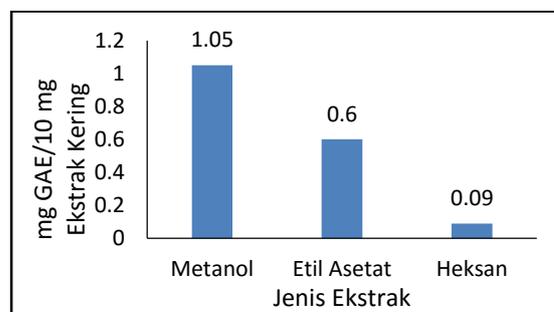
Penentuan kandungan fenolik total dari ekstrak daun benalu jengkol diperoleh dari persamaan regresi standar asam galat. Kurva standar asam galat dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Kurva regresi asam galat

Dari gambar kurva di atas dapat dilihat bahwa konsentrasi asam galat mengalami kenaikan yang sebanding dengan absorban yang didapat. Hal tersebut disebabkan oleh banyaknya senyawa fenolik yang terdapat pada sampel membentuk kompleks dengan Folin-Ciocalteu menghasilkan larutan warna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 765 nm sehingga absorban yang terukur semakin tinggi pada alat spektrofotometer UV-Vis. Dari

persamaan regresi standar asam galat  $y = 0,0097x + 0,091$  digunakan untuk menentukan kandungan fenolik total dari nilai absorban masing-masing ekstrak daun benalu jengkol yang didapat. kandungan fenolik total dari ekstrak daun benalu jengkol dapat dilihat pada gambar 3.3.

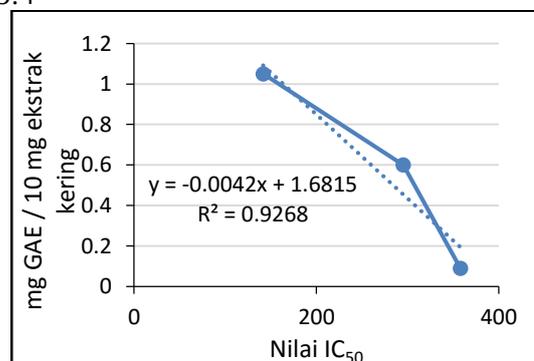


Gambar 3.3. Kandungan fenolik total dalam ekstrak daun benalu jengkol

Berdasarkan gambar di atas ekstrak metanol (1,05 mg GAE/10 mg ekstrak kering) memiliki kandungan fenolik total paling besar dari ekstrak etil asetat (0,60 mg GAE/10 mg ekstrak kering) dan heksana (0,09 mg GAE/10 mg ekstrak kering). Dikarenakan pelarut metanol dapat menarik senyawa-senyawa kimia dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Banyaknya senyawa fenolik yang terdapat pada masing-masing ekstrak memiliki pengaruh terhadap aktivitas antioksidan.

### 3.4 Hubungan antara aktivitas antioksidan dan fenolik total

Hubungan antara kandungan fenolik total dengan aktivitas antioksidan ekstrak daun benalu jengkol dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Hubungan nilai  $IC_{50}$  metode DPPH dengan nilai fenolik total

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat bahwa semakin tinggi kandungan fenolik total suatu ekstrak maka nilai  $IC_{50}$  semakin kecil karena semakin banyak senyawa fenolik yang bersifat aktif menangkal

radikal bebas terdapat dalam suatu ekstrak sehingga konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat atau menangkap 50% radikal bebas pada DPPH semakin kecil. Kandungan fenolik total tertinggi terdapat pada ekstrak metanol dengan sifat antioksidan yang sedang. Hal ini membuktikan bahwa kandungan fenolik dalam suatu ekstrak dapat menunjukkan tingkat aktivitas antioksidannya.

#### 4. Kesimpulan

Metabolit sekunder yang terdapat pada daun benalu jengkol segar yaitu fenolik, alkaloid dan steroid. Pada ekstrak daun benalu jengkol metanol mengandung flavonoid, fenolik, steroid dan alkaloid. Pada ekstrak daun benalu jengkol etil asetat mengandung fenolik dan steroid. Pada ekstrak daun benalu jengkol heksana mengandung steroid

Kandungan fenolik total terbanyak terdapat pada ekstrak metanol (1,05 mg GAE/10 mg ekstrak kering). Aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak metanol (141,7723 mg/L) tergolong sedang antioksidan, sedangkan ekstrak etil asetat (295,3028 mg/L) dan ekstrak heksana (358,0365 mg/L) tergolong lemah antioksidan.

Hubungan antara aktivitas antioksidan dengan fenolik total pada ekstrak daun benalu jengkol berbanding lurus, dimana semakin tinggi kandungan fenolik total suatu ekstrak maka nilai IC<sub>50</sub> semakin kecil karena semakin banyak senyawa fenolik yang bersifat aktif menangkal radikal bebas.

#### 5. Ucapan terima kasih

Terima kasih kepada dosen penasihat akademik yang telah memberikan saran pada penelitian ini. Terima kasih juga kepada analis Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam yang juga membantu melancarkan pemakaian alat pada penelitian ini.

#### Referensi

1. Ersam, T.: Pemberdayaan alam sumber keanekaragaman hayati hutan tropika; fenolat terprenilasi dari artocarpus dan garcinia (nangka dan manggis), Prosiding Seminal Nasional Kimia, Universitas Negeri Surabaya.; Surabaya, 2005, 22-23.

2. Bogorlani, N.W.: Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong. *Jurnal Kimia*; Universitas Udayana, 2008, 2(1): 40-44.
3. Sastroamidjojo, S.: *Obat Asli Indonesia*, Dian Rakyat: Jakarta, 1967.
4. Hossain M. Amzad.: International Journal of Biological and Pharmaceutical Research. 2012, 11, 3(2): 223-226.
5. Zuhra, C. F.; Taringan, J. B.; Sihotang, H.: Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr.), *Jurnal Biologi Sumatera*, 2008, 1, 3, 7-10.
6. Kesuma, S.; Yenrina, R.: *Antioksidan Alami dan Sintetik*: Padang, Andalas bUniversity Press, 2015.
7. Alfian, R.; Susanti, H.: Penetapan Kadar Fenolik Total Eksrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibicus sabdariffa* Linn) dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2012, 1, 2, 73-80.
8. Itam, A.; Majid, A. M. S. A.; Ismail, Z.: Antioxidant and Antiangiogenic Properties, and Gas Chromatography-Time of Flight Analysis of *Sonchus arvenis* Leaves Extracts. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 2015, 6, 37, 1239-1248.