

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Tumbuhan Sidukung Anak (*Phyllanthus niruri* L)

Tanaman sidukung anak (*Phyllanthus niruri* L) disebut juga dengan nama meniran, atau daun-gendong-anak. Di negeri Cina lebih dikenal dengan sebutan Ye Xia Zhu atau Zhen Chu Cao. Sidukung anak merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah tropis yang tumbuh liar di hutan, ladang, kebun maupun pekarangan halaman rumah. Maulina, *et.al.*(2006) mengklasifikasi tumbuhan *Phyllanthus niruri* L sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Geraniales
Suku	: Euphorbiaceae
Marga	: <i>Phyllanthus</i>
Jenis	: <i>Phyllanthus niruri</i> L



Gambar 1. Tumbuhan *Phyllanthus niruri* L

Pada umumnya sidukung anak tidak dipelihara, karena dianggap tumbuhan rumput biasa. Sidukung anak tumbuh subur di tempat yang lembab pada dataran rendah sampai ketinggian 1000 meter di atas permukaan laut. Seperti juga di sepanjang saluran air, semak-semak, dan tanah terlantar di permukaan. Ada juga yang membudidayakannya untuk pengobatan alami.

2.2. Morfologi Tumbuhan *Phyllanthus niruri* L

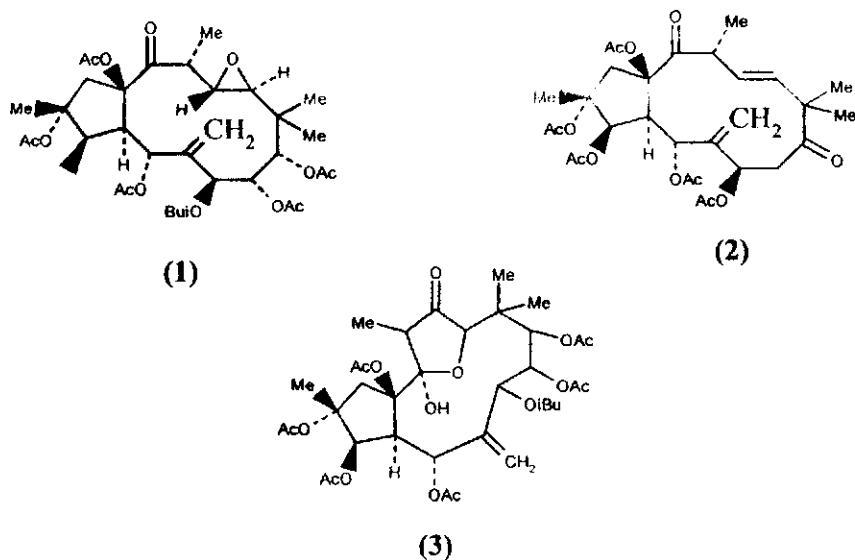
Batang sidukung anak berbentuk bulat, berbatang basah dengan tinggi lebih kurang 50 cm, tidak berbulu, berwarna hijau, diameternya 3 mm. Daun berbentuk majemuk, berseling, anak daun 15-24 mm, bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, panjang 1,5 cm, lebar 7 mm, tepi rata, berwarna hijau. Bunga tunggal, terdapat pada ketiak daun menghadap ke arah bawah, menggantung, berwarna putih, daun kelopak bentuk bintang, benang sari dan putik tidak nampak jelas, mahkota bunga kecil, berwarna putih. Buahnya kotak, bulat pipih, licin, diameter 2 mm, berwarna hijau keunguan. Bijinya kecil, keras, berbentuk ginjal dan berwarna coklat dan akarnya berbentuk tunggang, berwarna putih.

2.3. Tinjauan Umum dari Famili Euphorbiaceae

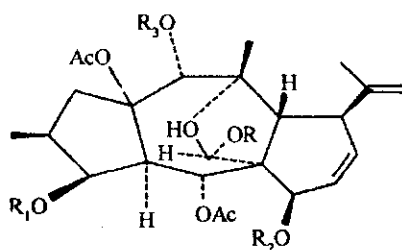
Tumbuhan dari famili Euphorbiaceae berupa pohon perdu atau terna, kadang-kadang berupa sukulenta. Suatu suku terbesar yang mencakup tidak kurang dari 7200 jenis yang terbagi dalam lebih kurang 300 marga terutama terbesar di daerah tropik. Kebanyakan tumbuhan ini menghasilkan getah yang terdiri dari satu sel saja (suatu senolit) yang panjang dan bercabang-cabang dan bersambungan satu sama lainnya (seperti bulu-bulu pengangkut). Daun tersebar, kadang-kadang berhadapan, tunggal atau majemuk menjari, biasanya mempunyai daun penumpu. Ujung daun atau pangkal helai daun seringkali mempunyai kelenjar.

2.4. Senyawa Kimia dari Famili Euphorbiaceae

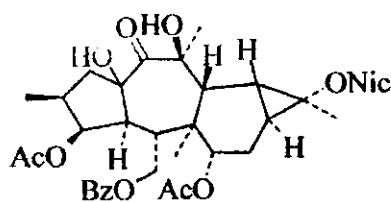
Hohmann *et.al* (1996). menemukan senyawa diterpen makrosiklik polyester tipe jatropen dari *Euphorbia esula*, asulatin A-C(1-3).



Oksuz. *et.al.* (1998) menemukan tujuh senyawa diterpen polyester baru dari tumbuhan *Euphorbia seguieriana* yaitu: 17-hidroksi mirsinol (4) , 5,15-O-diasetat-7-benzoat-3,14-O-dinikotinoat (5) ,14-O-dinikotinoil-5,15,17-O-triasetil-7-O-isobutiril-17-hidrosilmirsinol (6) ,3-O-propionat-5,15-O-diasetat-7-O-benzoat-14-O-nikotionat (7) ,5,15,-O-diasetat-3,7,14-O-trinikotoinat (8) , 5,14-O-dinikotinoil-8-O-isobutiril-3,10,15-O-triasetil-siklomirsinol (9) , 7-O-asetil-5-O-benzoil-13-15-dihidroksi-3,18-O-dinikotinoil-14-oksolatiran (10) .

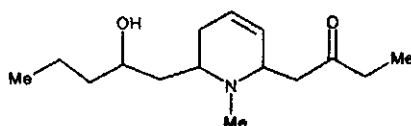


	R	R ₁	R ₂	R ₃
4	H	Nic	iBut	Nic
5	H	Nic	Bz	Nic
6	Ac	Nic	iBut	Nic
7	H	Prop	Bz	Nic
8	H	Nic	Nic	Nic



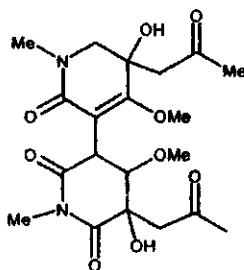
(10)

Andrakhisinin (11) yaitu senyawa jenis alkaloid piperidin telah berhasil diisolasi oleh Mill dan Hootale (2000). Senyawa ini diisolasi dari *Andrachne aspera spreng*.



(11)

Jian-Gong *et al* (2000) telah berhasil mengisolasi sperankulatin (12) dari *Speranskia tuberculata*. Senyawa ini berkhasiat untuk mengobati rematik, mengurangi rasa perih, dan mengobati luka memar.



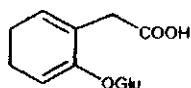
(12)

Angga, *et.al* (2005) telah berhasil mengisolasi terpenoid dari ekstrak N-heksan dan metanol kulit batang *Phyllanthus emblica* L. Uji fitokimia pada tanaman ini menunjukkan adanya senyawa terpenoid, fenolik dan flavonoid. Hasil fraksinasi ekstrak metanol diperoleh senyawa terpenoid berupa kristal berwarna putih dengan titik leleh 204-206 °C, memiliki gugus ausokrom yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap dan memiliki gugus OH, C=C, Fraksi ekstrak n-heksan diperoleh senyawa berupa Kristal jarum berwarna putih dengan titik leleh 217-218

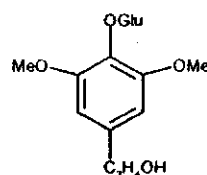
°C, tidak memiliki gugus ausokrom yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap serta memiliki gugus OH dan C=C.

Sedangkan hasil isolasi ekstrak total n-heksan pada buah *Phyllanthus emblica* L diperoleh senyawa Terpenoid berupa padatan berwarna kuning dan Kristal jarum berwarna putih yang terdekomposisi pada 134-135°C. Senyawa kedua tidak memiliki gugus auksokrom yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap tetapi memiliki gugus OH, C=C dan C-O.

Zhang, *et al* (2001) berhasil mengisolasi akar *Phyllanthus emblica* L menghasilkan dua glikosida fenolik yaitu 2-Karboksimetil fenol 1-O-β-D-glukofiranosida (13) dan 2,6- dimetoksi-4-(2-hidroksietil) fenol 1-O-β-D-glukofiranosida (14). Senyawa ini berkhasiat untuk mengobati penyakit kulit dan sebagai penyegar.

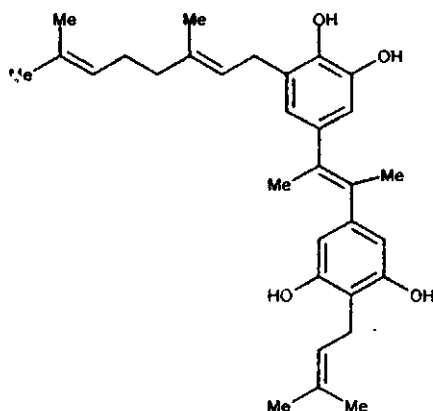


(13)



(14)

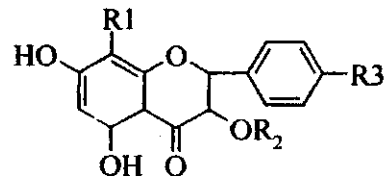
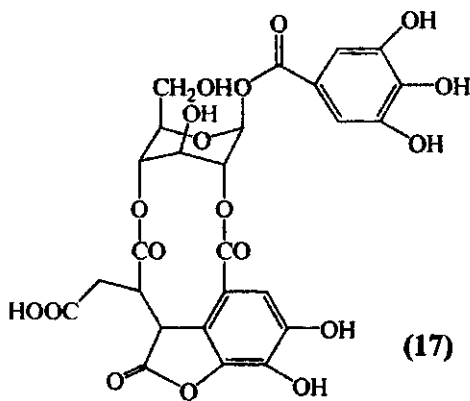
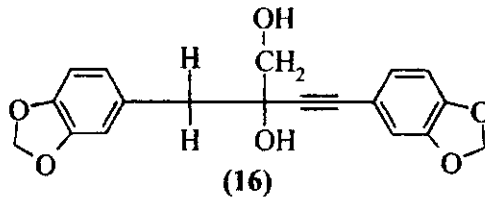
Kaaden *et al*, (2001) telah berhasil mengisolasi mapping (15) dari daun *Maccaranga mapp*. Senyawa ini bersifat sitotoksik terhadap sel kanker rahim.



(15)

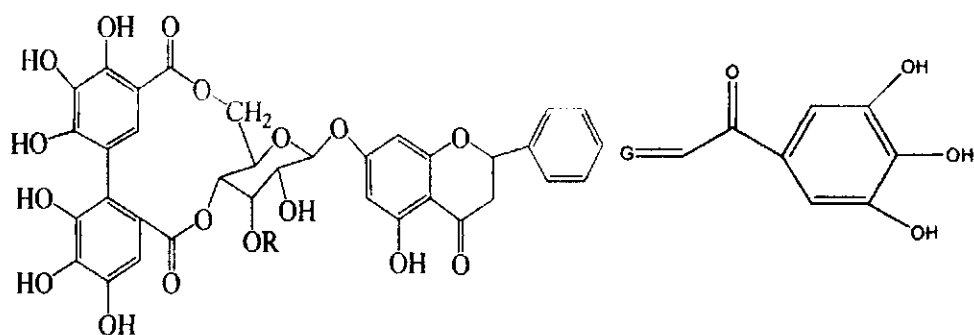
2.5. Senyawa Kimia dari Genus *Phyllanthus* L.

Huang, *et.al.* (1998) menemukan senyawa baru dari tumbuhan *Phyllanthus virgatus* yaitu: norlignan, 2-(3,4-metillendioksibenzil)-4-(4-metillendioksifenil)-3-butin-1,2-diol atau dengan nama lain virgatin (16), hidrolisabel tannin, virganin (17), tiga flavonoid sulfonat, galangin-8-sulfonat (18), galangin-3-O- β -D-glukosid-8-sulfonat (19), kaemferol-8-sulfonat (20).



	R ₁	R ₂	R ₃
18	SO ₃ Na	H	H
19	SO ₃ Na	glukosil	H
20	SO ₃ Na	H	OH

Huang, *et.al.* mengisolasi dua senyawa tannin dari tumbuhan *Phyllanthus tenellus*. Tumbuhan ini mirip dengan *Phyllanthus niruri* dan *Phyllanthus virgatus*. Dari penelitian yang telah dilakukan *Phyllanthus tenellus* tidak memiliki lignan, sedangkan kedua senyawa yang mirip sangat melimpah. Dua senyawa tannin yang telah diisolasi yaitu: pinosembrin-7-O-(4'',6''-(S)-heksahidroksidifenoil)- β -D-glukosa (21) dan pinosembrin-7-O-(3'',6''-galloil-4'',6''-(S)-heksahidroksidifenoil)- β -D-glukosa (22).

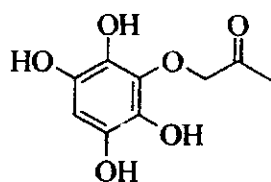


(21) R = H

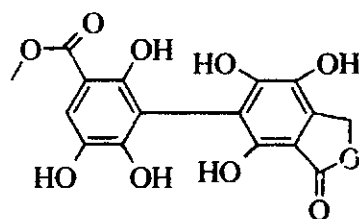
(22) R = G

2.6. Senyawa Kimia dari Spesies *Phyllanthus niruri* L.

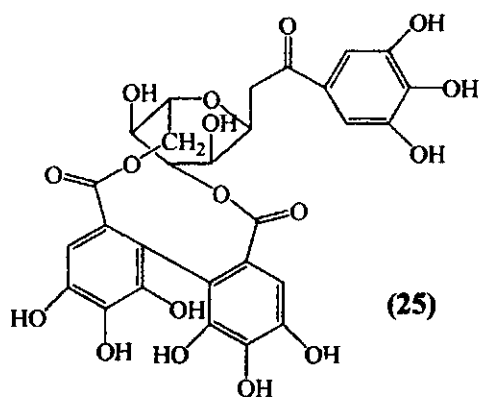
Wan-Xing Wei *et.al* (2004) telah berhasil menemukan 3 senyawa dari isolasi tanaman *Phyllanthus niruri* Linn dan 2 senyawanya merupakan senyawa baru yaitu: 2,3,5,6-tetrahydroxybenzyl acetate (23), 2, 2,4,5-trihidroksi-3-(4,6,7-trihidroksi-3-okso-1,3-dihidroisobenzofuran-5-yl)-etil asam benzoat (24), dan corilagin (25)



(23)



(24)



(25)

2.7. Tinjauan Umum Steroid

Steroid merupakan senyawa hidrokarbon tetrasiklik jenuh terdiri atas 17 atom karbon yang disebut 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid terdapat dalam hampir semua makhluk hidup. Dalam binatang steroid bertindak sebagai hormon, sedangkan steroid sintetik bertindak sebagai bahan obat (Fessenden, 1982).

Percobaan biogenetik menunjukkan steroid yang terdapat di alam berasal dari triterpen lanosterol, sedangkan pada jaringan tumbuhan berasal dari triterpen sikloartenol. Steroid dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelompok senyawa berdasarkan pada sifat fisiologis. Kelompok-kelompok itu adalah sterol, asam-asam empedu, hormon sex, hormon artekokortikoloid, aglikon kardiak, dan sapogenin.

Ditinjau dari segi struktur molekul, perbedaan tersebut ditentukan dari jenis substituen yaitu R₁, R₂ dan R₃ yang terikat pada C₁₀, C₁₃, dan C₁₇ pada kerangka dasar karbon. Perbedaan senyawa pada satu kelompok tertentu ditentukan oleh panjang rantai karbon R₁, gugus fungsi yang terdapat substituen R₁, R₂, R₃, jumlah serta posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap, dan konfigurasi dari pusat-pusat asimetris pada kerangka dasar karbon itu (Ahmad, 1986)

2.8. Tinjauan Umum Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang tersebar dan ditemukan di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzene (C₆) terikat pada suatu propan (C₃) sehingga membentuk suatu susunan C₆-C₃-C₆. Flavonoid mempunyai tiga kerangka dasar yaitu flavonoid, iso flavonoid dan neo flavonoid (Ahmad, 1986).

Flavonol tersebar luas dalam tumbuhan, baik sebagai ko-pigmen antosianin dalam daun, bunga maupun daun tumbuhan tinggi, umumnya terdapat sebagai glikosida. Dalam tumbuhan senyawa flavanol banyak dijumpai berupa flavonoid glikosida (Harborne, 1987)

Senyawa fenol meliputi aneka ragam yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus

hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harbone, 1987).

2.9. Tinjauan Umum Senyawa Fenolik

Senyawa fenolik meliputi senyawa yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yang mempunyai ciri yang sama yaitu cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenolik mudah larut dalam air karena umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida dan terdapat pada vakuola sel.

Cara klasik untuk mengidentifikasi adanya senyawa fenolik yaitu dengan menambahkan larutan besi(III) klorida 1% dalam air atau etanol terhadap larutan cuplikan sehingga timbul warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1987)

Pada prinsipnya sifat-sifat kimia dari senyawa fenolik adalah sama, akan tetapi dari segi biogenetik senyawa ini dibedakan atas dua jenis yaitu senyawa fenolik yang berasal dari asam sikhimat dan jalur asetat-malonat. Namun, ditemukannya senyawa fenolik yang berasal dari kombinasi kedua jalur diantarnya adalah senyawa flavonoid (Ahmad, 1986)

2.10. Metoda Isolasi Senyawa Bahan Alam

2.10.1. Metoda Ekstraksi

Metoda ekstraksi yang dipilih untuk mendapatkan senyawa bahan alam sangat tergantung kepada jenis sampel tumbuhan dan jenis senyawa yang ada. Terutama tergantung pada keadaan fisik senyawa tersebut, misalnya senyawa berupa cairan yang mudah menguap berbeda cara ekstraksi dengan cairan yang tidak menguap.

Ada beberapa teknik ekstraksi senyawa bahan alam yang umum digunakan antara lain maserasi, perkolasi, sokletasi. Maserasi biasanya dilakukan untuk bagian tumbuhan yang teksturnya lunak, seperti bunga dan daun. Senyawa organik metabolit sekunder yang ada dalam bahan alam tersebut umumnya dalam persentase yang cukup banyak. Cara lain yang digunakan adalah perkolasi, cara ini digunakan untuk bagian tumbuhan yang teksturnya keras seperti akar, batang,

biji dan apabila senyawa kimia yang akan diekstrak dalam persentase yang cukup sedikit. Sedangkan teknik sokletasi digunakan untuk sampel yang senyawa kimianya tahan panas. Prinsipnya yaitu menggunakan suatu pelarut yang mudah menguap dan dapat melarutkan senyawa organik yang terdapat dalam bahan alam tersebut. Semua teknik di atas penguapan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* (Sharp *et al.*, 1989).

2.10.2. Metoda Pemisahan

Dalam mengisolasi senyawa bahan alam tahap pemisahan merupakan tahap yang penting. Ada berbagai metoda untuk memisahkan senyawa bahan alam, seperti kromatografi. Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling baik untuk pemurnian senyawa. Hampir setiap campuran kimia dapat dipisahkan dengan metoda ini, mulai dari bobot yang paling besar sampai bobot yang paling kecil.

Dalam kromatografi terdapat dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak kromatografi dapat berupa zat cair atau gas dan fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair. Berdasarkan sifat fase gerak dan fase diamnya, maka kromatografi dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok kromatografi. Keempat kelompok kromatografi tersebut adalah cair-padat, gas-padat, cair-cair, dan gas-cair (Gritter *et al.*, 1991).

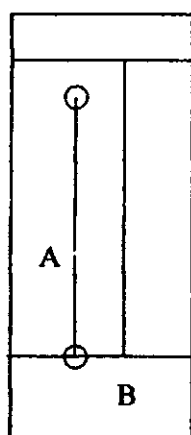
2.10.2.1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu metoda kromatografi yang paling sederhana. Fase diamnya berupa lapisan tipis dan fase geraknya berupa cairan. Lapisan tipis tersebut berfungsi sebagai penyerap dan pemisahan. Pemisahan terjadi pada kromatografi jenis ini berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam dan fase gerak yang mengakibatkan perbedaan kecepatan migrasi komponen yang dipisahkan. Mengalirnya fase gerak dalam fase diam diakibatkan adanya gaya kapiler (Gritter *et al.*, 1991).

Cara kerja dari kromatografi lapis tipis adalah sebagai berikut: Campuran yang akan dipisahkan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai, setelah itu totolkan pada plat yang telah diberi batas atas dan batas bawah. Penotolan dilakukan

dengan pipa kapiler. Hasil totolan berupa bercak pada plat dibiarkan agar pelarutnya menguap. Plat tersebut dimasukkan ke dalam bejana yang berisi eluen sebagai fase geraknya kemudian bejana tersebut ditutup dengan rapat. Beberapa menit kemudian pelarut akan naik bersama bercak (noda) hasil totolan (Gritter *et. al.*, 1991).

Jarak tempuh noda dapat dihitung dengan mengetahui lokasi noda pada plat. Jika senyawa-senyawa yang dipisahkan berwarna akan terlihat sebagai pita-pita atau noda-noda yang terpisah. Tetapi untuk senyawa tertentu yang tidak berwarna dapat diamati dengan lampu ultraviolet, uap yodium atau dengan pereaksi penampak noda. Beberapa pereaksi penampak noda yang biasa digunakan misalnya; Carr-Price yaitu larutan antimon klorida 20% dalam kloroform, pereaksi serum sulfat dan pereaksi Liebermann-Burchard (Harbone, 1987).



$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh sampel (A)}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen (B)}}$$

Gambar 2. Plat KLT

2.10.2.2. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metoda kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Penggunaan fase gerak (eluen) disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dipisahkan.

Fase diam, baik bahan alam yang menyerap atau film zat cair pada penyangga, ditempatkan dalam tabung kaca berbentuk silinder, pada bagian

bawah tertutup dengan katup atau kran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, eluen yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan dan dengan demikian dipisahkan. Eluen biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar dari kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, seringkali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis (Gritter *et al.*, 1991).

Untuk mengoptimalkan hasil pemisahan dapat pula menggunakan kolom yang dilengkapi dengan aliran tekanan udara yang berasal dari aerator. Dalam hal ini kolom sedikit diberi modifikasi yakni, ujung kolom dibagian atas diberi penutup dan lubang saluran udara melalui pipa atau selang aerator. Tekanan udara akan mempercepat proses elusi dalam kolom. Tekanan ini lebih menguntungkan karena memisahkan dengan baik, tidak memakan waktu yang cukup lama, elusi berjalan dengan baik jika dibandingkan dengan tanpa menggunakan tekanan udara (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.10.2.3. Kromatografi Cepat

Konsep kromatografi cepat (*flash chromatography*) sangat sederhana dan pemisahan preparatif memakai kromatografi kolom biasa yang dimodifikasi ini sangat mudah dilakukan, menggunakan alat gelas yang mudah didapat dan murah (Hostettmann *et al.*, 1995). Teknik ini berfungsi dalam kimia sintesis dan kimia bahan alam. Pemisahan dilakukan dengan memberikan tekanan pada kolom berupa udara atau gas nitrogen yang berfungsi untuk mempercepat proses pemisahan tersebut. Fasa diam yang digunakan pada kromatografi cepat adalah silika gel yang memiliki ukuran partikel 40 – 60 μm (230 – 400 mesh) (Cannel, 1998). Ukuran partikel yang kecil memberikan luas permukaan yang besar dan keseragaman meningkatkan resolusi. Ukuran kolomnya berdiameter antara 3-10 cm dan panjangnya 7-15 cm (Colegate dan Molyneux, 1993).

Kromatografi kilat ini pertama kali dipublikasikan pada tahun 1978 oleh Still *et al.*, sebagai usaha untuk memperpendek waktu kerja dari kromatografi kolom terbuka. Cara ini sangat murah dilakukan karena hanya menggunakan alat-alat gelas. Oleh karena itu metoda ini banyak sekali digunakan oleh para peneliti yang bekerja dalam masalah pemisahan. Kinerja kromatografi kilat lebih rendah

dari pada kromatografi cair tekanan menengah, tapi dengan pertimbangan kesederhanaan dan ekonomi orang lebih sering menggunakan metoda ini (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.10.2.4. Kromatografi Vacum Cair (VLC)

Kromatografi jenis ini pertama kali diperkenalkan oleh Coll *et al.*, pada tahun 1977. Metoda ini digunakan oleh Coll *et al.*, untuk mengisolasi diterpena sembreoid dari terumbu karang lunak Australia. Kromatografi vakum cair menggunakan silika gel 60 (63-200 μ m, Merck). Kolom kromatografi dikemas kering (biasanya dengan penyerap mutu 10-40 μ m) dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemas maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai. Cuplikan dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada bagian atas kolom dan dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dari pelarut dengan kepolaran rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.10.2.5. Kromatografi radial (*Chromatotron*)

Kromatografi radial merupakan suatu teknik pemisahan untuk hasil fraksinasi. Dalam hal ini, fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom belum memuaskan maka teknik ini dapat dipakai untuk memisahkan satu persatu komponen senyawa hasil pemisahan KLT maupun kromatografi kolom.

Pada prinsipnya kromatografi radial adalah kromatografi klasik dengan aliran fase gerak yang dipercepat oleh gaya sentrifugal. Bentuknya sederhana, dengan desain yang baru berupa plat yang berbentuk piringan dari bahan kaca dengan garis tengah 24 cm, serta penyerapannya menggunakan silika gel PF₂₅₄ yang umumnya digunakan untuk pemisahan yang lebih baik.

Rotor terdapat dalam ruang yang tertutup dengan pelat kaca kuarsa, Penutup ini memungkinkan kita mengamati bercak yang tidak berwarna tetapi dapat menyerap sinar UV dengan memakai lampu UV. Teknik ini menggunakan

aliran gas nitrogen untuk mencegah penggembungan pelarut pengelusi dan unik mencegah oksidasi cuplikan (Hostettmann *et al.*, 1995).

2.10.2.6. Kromatografi cair kecepatan tinggi

Kromatografi cair kecepatan tinggi merupakan salah satu jenis metoda kromatografi yang sering disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). HPLC dilakukan pada temperatur rendah. Pada prinsipnya alat ini bekerja dengan adanya kompetisi dari 2 fase yaitu fase mobil (gerak) dan fase stasioner (diam). HPLC dapat digunakan untuk senyawa yang mudah menguap (Khopkar, 2003). Pada HPLC fase diam yang digunakan ada dua sistem yaitu :

1. Fase normal : jika fase gerak nonpolar dan fase diam polar
2. fase terbalik : jika fase gerak polar dan fase diam non polar

Keunggulan HPLC dari kromatografi cair lainnya adalah kolom HPLC dapat digunakan berulang-ulang tanpa degenerasi, tercapainya hasil yang memuaskan, peralatan dapat dioperasikan secara otomatis dan kuantitatif, pelarut yang menetes melalui kolom dibawah grafitasi, didukung melalui tekanan tinggi sampai dengan 400 atm. Ini membuatnya lebih cepat dan dapat dipergunakan untuk keperluan preparatif (Jhonson dan Robert, 1991).

HPLC dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Untuk analisis kualitatif yang digunakan adalah waktu retensi dari suatu senyawa. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan oleh suatu senyawa tertahan dalam kolom atau terpisah dari kolom, sedangkan untuk analisis kuantitatif digunakan luas puncak berbanding lurus dengan konsentrasi (Kennedy, 1990).

2.10.3 Uji Kemurnian dengan titik leleh

Titik leleh adalah temperatur keadaan suatu kristal mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya. Titik leleh ini merupakan tetapan fisika untuk menentukan uji kemurnian dan identifikasi senyawa tidak dikenal. Harga yang didapat dibandingkan dengan literatur berdasarkan dugaan semula. Jika titik leleh yang didapat memberikan jarak yang tidak begitu besar (kecil dari atau sama dengan 2^o C) maka kemungkinan senyawa sudah murni. Penggunaan tetapan fisika hanya sebagai langkah pendahuluan saja, dengan perkataan lain data pengujian tetapan

fisika bukan satu-satunya cara yang menentukan kemurnian suatu senyawa (Sharp *et al.*, 1989).

2.10.4. Metoda karakterisasi

2.10.4.1. Spektroskopi inframerah

Spektroskopi inframerah sangat penting dalam kimia modern, terutama pada kimia organik. Spektrofotometri inframerah lebih banyak digunakan untuk identifikasi suatu senyawa melalui gugus fungsinya. Hal ini mungkin disebabkan spektrum inframerah senyawa organik bersifat khas, artinya senyawa yang berbeda akan mempunyai spektrum yang berbeda pula. Daerah inframerah terletak antara spektrum elektromagnetik cahaya tampak dan spektrum radio yaitu antara 400 dan 4000 cm^{-1} (Noerdin, 1985).

Adanya vibrasi molekul dapat memberikan sifat-sifat yang khas dari suatu senyawa dalam spektrofotometri inframerah. Pita absorpsi inframerah akan tampak untuk tiap derajat kebebasan vibrasi asalkan terjadi perubahan momen dwi lainnya. Absorpsi terjadi di daerah inframerah dan intensitas absorpsi cukup kuat untuk dideteksi (Silverstein, 1986).

Frekuensi vibrasi suatu ikatan dapat dihitung dengan menggunakan hukum Hooke :

$$\nabla = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}}}$$

Dengan : ∇ = frekuensi vibrasi (cm^{-1})

k = konstanta gaya untuk ikatan kimia (N cm^{-1})

m_1, m_2 = massa atom yang terlibat (gram)

c = kecepatan cahaya ($3 \times 10^{10} \text{ cm s}^{-1}$)

2.10.4.2. Spektroskopi ultraviolet

Spektrum ultraviolet dan sinar tampak dari suatu senyawa organik berhubungan dengan transisi elektron dari satu tingkat energi ke tingkat energi yang lebih tinggi. Kegunaan lainnya adalah untuk mengetahui jumlah ikatan rangkap yang terdapat di dalam suatu molekul (Sudjadi, 1983).

Apabila suatu molekul menyerap radiasi ultraviolet, di dalam molekul tersebut terjadi perpindahan tingkat energi elektron-elektron ikatan di orbital molekul paling luar dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi (Noerdin, 1985). Untuk mempelajari serapan ultraviolet secara kualitatif berkas radiasi dikenakan pada cuplikan dan intensitas radiasi yang ditransmisikan harus diukur. Penggunaan spektroskopi ultraviolet secara kualitatif berhubungan dengan hukum Lambert-Beer, maka dapat dinyatakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi dan tebal cuplikan (Silverstein, 1986).

Hubungan ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\text{Log } T = A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$-\log T = A = \text{Absorbansi}$$

Dengan : ϵ = Absorptivitas molar ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
 b = Panjang sel (cm)
 c = Konsentrasi (M)

Serapan ultraviolet secara kualitatif pada senyawa aromatik dan heterosiklik dengan pengaruh substitusi terhadap inti aromatik menurut Noerdin (1985) telah dipelajari secara luas. Substitusi lingkaran dengan gugus yang mempunyai elektron bebas atau elektron phi (π) yang berdekatan dengan lingkaran benzen akan menyebabkan pergeseran pita serapan ke panjang gelombang lebih besar (efek batokrom). Untuk lingkaran benzen yang mempunyai dua substitusi, tidak selalu dapat diramalkan harga panjang gelombang maksimumnya, tetapi tiga kaedah umum dibawah ini sangat berguna,

1. Bila gugus penarik elektron ($-\text{NO}_2$) dan gugus pendorong elektron ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{X}$) satu terhadap yang lain berada pada posisi para, terjadi pergeseran ke panjang gelombang lebih besar (efek batokrom).
2. Bila gugus penarik elektron dan gugus pendorong elektron berada pada posisi orto dan meta, spektrumnya hanya berbeda sedikit saja dari spektrum masing-masing senyawa monosubstitusi dengan gugus bersangkutan.
3. Bila dua gugus penarik elektron atau dua gugus pendorong elektron berada pada posisi para, spektrumnya hanya berbeda sedikit dari spektrum masing-masing senyawa monosubstitusi dengan gugus yang bersangkutan.

2.10.4.3. Spektroskopi massa

Spektrofotometer massa adalah suatu metode identifikasi struktur molekul senyawa berdasarkan massa. Spektrum massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2003).

Suatu titik permulaan yang ideal dalam analisis struktur organik, penggunaan data spektroskopi massa adalah untuk memperoleh rumus molekul. Hal ini sangat mungkin karena spektrofotometer massa memberikan seluruh isotop yang hadir pada suatu senyawa untuk dapat diteliti secara bersamaan. Spektrofotometer massa memulai analisis dengan cara mengionisasi suatu sampel dan ion yang dihasilkan dipisahkan, kemudian diplot sebagai perbandingan massa terhadap muatan (m/z) versus kelimpahan relatif (relative abundance, %). Muatan ion-ion tunggal atau ganda yang bermuatan positif maupun negatif dapat diamati (Crews, 1998).



Ion molekul M^+ cenderung tidak stabil dan biasanya terurai menjadi sepasang pecahan atau fragmen yang dapat berupa radikal dan ion atau molekul kecil dan radikal kation (Sastrohamidjojo, 2001).

Intensitas dari puncak ion molekul tergantung pada kestabilan ion yang terbentuk yang dipengaruhi oleh struktur molekul. Puncak yang paling tinggi dari spektrum massa disebut *base peak*. Setiap komponen memberikan rangkaian fragmentasi yang spesifik yang biasa disebut pola fragmentasi dan berbentuk deretan garis (Khopkar, 2003).

2.10.4.4. Spektroskopi *Nuclear magnetic resonance* (NMR)

Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (NMR) adalah salah satu metoda spektrometri yang penting untuk menguraikan atau menentukan struktur dari senyawa yang tidak diketahui, termasuk stereokimia dari suatu senyawa. Metoda ini tidak hanya berguna dalam bidang senyawa organik, tetapi juga dapat digunakan dalam bidang yang lain seperti: farmasi, analisis dan sintesis obat, organometalik, ilmu polimer dan yang lainnya. Struktur yang kompleks dan senyawa baru sangat sulit ditentukan dengan menggunakan analisa spektrum UV,

IR, dan MS, sehingga untuk itu dibutuhkan metoda NMR (Sastrohamidjojo, 1994).

Spektroskopi NMR didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik apabila molekul ini berada dalam medan magnet yang kuat. Proton berputar dengan momen magnetik nuklirnya, mirip dengan suatu batang magnet kecil. Apabila molekul-molekul yang mempunyai atom-atom hidrogen diletak di dalam medan magnetik luar, maka momen magnetik dari setiap inti hidrogen atau proton akan mengambil salah satu orientasi dilihat dari medan magnet luar itu yaitu paralel (energi rendah) dengan momen magnetiknya sama dengan arah medan luar atau antiparalel (energi tinggi) dengan momen magnetiknya berlawanan dengan arah medan luar (Williams, 1986).

Eksperimen NMR meliputi NMR 1 D dan 2 D. NMR 1D yang didapat menggunakan meliputi (Pavia dkk., 1996):

- ^1H -NMR, memberikan informasi mengenai jumlah serta jenis hidrogen serta sifat lingkungan dari hidrogen tersebut.
- ^{13}C -NMR, memberikan informasi mengenai jumlah serta jenis karbon, jenis ^{13}C -NMR yang dapat digunakan meliputi :
- DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) untuk menentukan keberadaan atom karbon (C primer, C sekunder, C tersier, dan C kuartener).
- JMOD (J Modulation) ^{13}C -NMR, berguna dalam menentukan jumlah karbon serta jenis karbon tersebut (C primer, C sekunder, C tersier, dan C kuartener) (Teruna, 2006)

Adapun NMR 2 D yang dapat digunakan meliputi (Teruna, 2006):

1. HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) memperlihatkan korelasi ^1H -NMR dengan ^{13}C NMR sehingga dapat ditentukan keberadaan dan jenis atom karbon.
2. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) menentukan korelasi proton dengan karbon dengan jarak dua, tiga, hingga empat ikatan.
3. ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy) menunjukkan korelasi proton-proton visinal.

4. INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Eksperiment) menunjukkan hubungan antara karbon yang satu dengan yang lainnya.
5. HOHAHA (Homonuklear Hartman Hahn) atau TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) menunjukkan konektivitas seluruh proton dalam sistem spin.
6. NOESY (Nuklear Overhauser Effect Spectroscopy) menunjukkan antraksi proton dengan proton atau proton dengan karbon secara stereokimia.

Spektrofotometer modern beroperasi pada bermacam-macam kekuatan medan magnet tergantung inti spesifik yang diamati pada bermacam-macam frekuensi. Plot NMR memiliki nilai Hz (unit frekuensi) dan delta (δ). Nilai δ dihitung dengan mengukur perbedaan pergeseran (*shift*) dalam Hz, antara suatu proton dan internal standar. Nilai ini dibagi oleh frekuensi spektrofotometer yang selalu perkalian 1.000.000 Hz (MHz), jadi nilai δ adalah dalam satuan unit *part per million* (ppm) seperti yang ditunjukkan dalam persamaan di bawah ini :

$$\delta = \frac{\text{pergeseran sampel (Hz)} - \text{pergeseran TMS (Hz)}}{\text{frekuensi spektrofotometer (MHz)}} = \text{ppm}$$

Titik nol diset berdasarkan frekuensi dari standar *tetramethylsilane* (TMS, BP= 26°C) merupakan senyawa inert dan terkadang ditambahkan kepada sampel serta memberikan referensi internal untuk menghitung pergeseran kimia. Standar TMS digunakan untuk pergeseran kimia NMR ^1H , ^{13}C dan ^2H . Kebanyakan pergeseran kimia yang relatif tidak terlindungi oleh TMS, ditunjukkan sebagai nilai positif, sedangkan bagian terlindungi terhadap TMS ditunjukkan sebagai nilai negatif (Crews, 1998).

2.10.5. Uji toksisitas menggunakan metoda *Brine shrimp lethality test* (BSLT)

Toksisitas adalah urutan peristiwa biokimia yng menyebabkan perubahan fungsi fisiologis yang merugikan dengan pengaruh yang ditunjukan pada tingkat berbeda dari kelompok makhluk hidup seperti pada target molekul itu sendiri (Hill,1996). Toksisitas suatu unsur atau senyawa akan memperlihatkan pengaruhnya bila unsur atau senyawa tersebut telah masuk kedalam tubuh

organisme dalam jumlah yang melebihi nilai toleransi organisme terkait (Palar,1994).

Toksisitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu zat yang memiliki sifat destruktif pada sel terutama yang menyangkut proses suatu sel dalam sistem kekebalan tubuh atau obat-obatan yang bersifat antineoplastik yang secara selektif dapat membunuh sel. Toksisitas merupakan sifat suatu senyawa yang mengganggu pertumbuhan sel, baik sel normal maupun sel kanker (Agustin, 2007).

Sitotoksik dapat diartikan sebagai suatu zat yang mempunyai pengaruh pengrusakan yang spesifik pada sel-sel tertentu, atau mempunyai pengaruh seperti penggunaan pada proses lisis sel-sel dan untuk obat anti neoplastik yang selektif membunuh sel (Agustin, 2007). Dari pengertian ini sitotoksik memberikan hubungan dengan obat antikanker. Obat antikanker merupakan senyawa kemotropik yang digunakan untuk pengobatan tumor yang membahayakan kehidupan (kanker), yang sering pula disebut sebagai obat sitotoksik atau senyawa antineoplasma (Siswandono dan Soekardjo, 1995). Untuk mengukur tingkat toksisitas dapat digunakan istilah :

- o LD₅₀ (*Lethal Dose*): Dosis yang dibutuhkan untuk membunuh 50 % organisme uji
- o ED₅₀ (*Effective Dose*): Dosis dimana 50% organisme uji memperlihatkan efek aktifitas nyata
- o LC₅₀ (*Lethal Concentrat*): Konsentrasi yang digunakan, dimana 50% organisme uji mati, selama waktu tertentu

Metoda pengujian BST dengan menggunakan *Artemia salina* dianggap memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga sering dilakukan untuk skrining awal pencarian senyawa antikanker. Metoda ini dikenal sebagai metoda yang cepat, mudah, murah, dan hasilnya dapat dipertanggungjawabkan. Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu.

Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC₅₀ (Konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva udang) kurang dari 1000 g/ml setelah waktu kontak 24 jam (Ayo,2007 ; Meyer, 1982 *et.al*). Dimana besar kecilnya LC₅₀ dapat

ditentukan dengan menggunakan metoda Farmakope Indonesia atau metoda Finney(Program komputer)

2.10.5.1. Hewan percobaan

Brine shrimp merupakan nama lain dari *Artemia*, yaitu suatu kelompok udang-udangan dari *Phylum Arthropoda*. *Artemia* ini hidup di danau-danau garam (berair asin) yang ada diseluruh dunia. Kista *Artemia* akan tengelam dan tidak akan menetas jika kadar garam tempat hidupnya kurang dari 6% dan akan menetas jika kadar garam lebih dari 25%. Kista *Artemia* akan menetas menjadi embrio setelah 15-20 jam pada suhu 25°C, kemudian dalam waktu beberapa jam embrio ini akan berubah menjadi naupli yang sudah dapat berenang bebas.

Variabel yang perlu diperhatikan dalam membiakan udang *Artemia* adalah temperatur(25-30oC), salinitas(30-35 ppt), pH(8-9 hidup dibawah 5 atau diatas 10 udang akan mati), cahaya dan oksigen. Keuntungan menggunakan udang *Artemia* ini pada uji BSLT antara lain kista mudah didapat, murah, mudah disimpan beberapa tahun ditempat yang kering, tidak memerlukan kondisi aseptis yang khusus, serta udang ini memiliki sensitivitas yang lebih tinggi terhadap senyawa toksik(Fox, 2004; Harefa, 1997)

2.10.5.2. Media perkembangbiakan *Artemia salina* L

Diperlukan media yang khusus dalam pembiakan udang *Artemia* untuk uji BSLT, media yang digunakan apat dibuat dalam bentuk sederhana dan murah. Media dibuat dari bahan kaca yang terdiri dari dua bagian yaitu bagian terang dan gelap. Kista udang diletakkan pada bagian yang gelap dan akan bergerak kedaerah yang terang setelah menetas menjadi larva. Variabel yang perlu diperhatikan dalam membiakan udang *Artemia* adalah :

1. Salinitas antara 20-30 ppt(parts per thousand) atau 1-2 sendok the garam perliter air tawar. Untuk buffer dapat ditambahkan magnesium sulfat.
2. Suhu air 26-28°C(suhu kamar)
3. Berikan sinar selama penetasan(dapat digunakan lampu standar grow-line atau lampu 60 watt).
4. Aerasi yang cukup, untuk menjaga oksigen terlarut sekitar 3 ppm.

5. pH 8 atau lebih, jika pH turun dibawah 7 dapat ditambahkan soda kue untuk menaikkan pH.
6. Kepadatan sekitar 2 gram per liter.

2.10.5.3. Pengujian toksisitas dengan metoda *Brine Shrimp Lethality* (BSLT)

Untuk pengujian toksisitas dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* ini diperlukan larutan sampel dengan 3 konsentrasi, dimana biasanya dipakai konsentrasi 1000, 100, dan 10 ppm. Vial dapat digunakan sebagai wadah untuk sampel yang sudah dibuat dalam berbagai konsentrasi, dimana masing-masing konsentrasi dibuat 3 vial (3 X pengulangan). Jumlah larva yang diperlukan untuk uji adalah 10 ekor untuk masing-masing vial. Kematian larva udang dapat diamati setelah 24 jam, jumlah artemia yang mati dapat digunakan untuk menghitung LC50 (Meyer *et al*,1982)