

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Uji fitokimia kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052)

Pada uji fitokimia terhadap kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052) memberikan hasil positif terhadap alkaloid, terpenoid dan saponin. Uji alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat kemerahan dengan penambahan pereaksi Dragendorff, terpenoid ditandai dengan adanya warna merah kecoklatan setelah penambahan asam asetat anhidrat dan H₂SO₄ pekat (Liebermann-Burchard), sedangkan saponin ditandai dengan timbulnya busa yang stabil selama ± 5 menit.

4.1.2. Ekstraksi kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052)

Hasil maserasi dari 1 kg serbuk kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052) dengan pelarut metanol diperoleh ekstrak metanol sebanyak 22,4 g. Sebanyak 15 g ekstrak metanol dipartisi menghasilkan ekstrak n-heksan sebanyak 0,2 g, ekstrak diklorometan sebanyak 3,3 g dan ekstrak metanol 1,8 g.

4.1.3. Pengujian ekstrak total n-heksan, diklorometan dan metanol dengan KLT

Pemeriksaan komponen yang dikandung ekstrak n-heksan, diklorometan dan metanol dari kulit batang *Polyalthia sp* (DA-TN 052) dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Hal ini dilakukan untuk mendapatkan eluen yang memberikan pola pemisahan yang baik dan mengetahui jumlah komponen yang terdapat dalam ekstrak tersebut. Kromatogramnya dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.1.4. Pemisahan dengan kromatografi vakum cair

Pemisahan dengan kromatografi vakum cair menggunakan 2,5 g ekstrak diklorometan. Pengelusian dilakukan dengan berbagai eluen dengan kepolaran yang meningkat dari n-heksan : etilasetat (5:5) sampai etilasetat : metanol (5:5) sehingga diperoleh 11 fraksi. Pelarutnya kemudian diuapkan hingga kering dan

selanjutnya dilakukan uji KLT. Hasil kromatografi vakum cair dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Kromatografi Vakum Cair pada Ekstrak Total Diklorometan

No	Perbandingan eluen (100 ml)	Jumlah ekstrak yang didapat (g)
1	n-heksan : etilasetat (5:5)	0,076
2	n-heksan : etilasetat (4:6)	0,093
3	n-heksan : etilasetat (3:7)	0,077
4	n-heksan : etilasetat (2:8)	0,080
5	n-heksan : etilasetat (1:9)	0,076
6	etilasetat	0,085
7	etilasetat : metanol (9:1)	0,111
8	etilasetat : metanol (8:2)	0,167
9	etilasetat : metanol (7:3)	0,274
10	etilasetat : metanol (6:4)	0,278
11	etilasetat : metanol (5:5)	0,281

4.1.5. Pengujian hasil kromatografi vakum cair dengan KLT

Pengujian KLT dari hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair menggunakan eluen n-heksana : etilasetat (2:8) menunjukkan bahwa beberapa fraksi mempunyai harga Rf yang sama sehingga dapat digabungkan menjadi 4 fraksi yaitu, Fg-1, Fg-2 (F2-F4), Fg-3 (F5-F7) dan Fg-4 (F8-F11). Hasil KLT dari kromatografi vakum cair dapat dilihat pada **Tabel 4** dan kromatogramnya pada **Lampiran 4**.

Tabel 4. KLT Hasil Kromatografi Vakum Cair

No	Fraksi	Eluen	Rf	Keterangan
1	F-1	n-heksan : etilasetat 2 : 8	0,46; 0,64	2 noda
2	F-2		0,46	1 noda
3	F-3		0,44	1 noda
4	F-4		0,42	1 noda
5	F-5		-	noda memanjang
6	F-6		-	noda memanjang
7	F-7		-	noda memanjang
8	F-8		0,42	1 noda
9	F-9		0,42	1 noda
10	F-10		0,42	1 noda
11	F11		0,44	1 noda

4.1.6. Uji aktivitas antioksidan terhadap hasil VLC (kromatografi vakum cair)

Hasil kromatografi vakum cair diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Uji dilakukan pada berbagai seri konsentrasi dengan menggunakan larutan DPPH 0,004 % sebagai radikal bebas. Sampel yang diuji merupakan fraksi gabungan dari hasil KLT sebelumnya. Adapun data aktivitas antioksidan yang diperoleh adalah sebagai berikut :

Tabel 5. Total aktivitas antioksidan fraksi melalui metode DPPH

Fraksi / standar	Konsentrasi	% Penghambatan	IC ₅₀ µg/mL
BHT	15	19,35	IC ₅₀ = 70,87
	30	30,75	
	50	35,52	
	75	56,55	
	100	64,01	
Fg-1	50	4,68	IC ₅₀ = 1.202,87
	100	3,64	
	150	9,09	
	200	7,69	
	250	12,78	
	300	9,39	
Fg-2	50	2,97	IC ₅₀ = 798,22
	100	10,76	
	150	13,98	
	200	18,10	
	250	20,39	
	300	23,85	
Fg-3	50	12,72	IC ₅₀ = 349,42
	100	20,06	
	150	28,91	
	200	36,70	
	250	43,04	
	300	47,72	
Fg-4	50	12,83	IC ₅₀ = 366,38
	100	16,42	
	150	25,04	
	200	32,08	
	250	38,57	
	300	44,87	
	500	61,85	



4.1.7. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan untuk fraksi yang mempunyai aktivitas antioksidan cukup baik. Terhadap Fg-4 dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen dengan kepolaran bergradien dari n-heksan : etilasetat (2:8) sampai metanol 100% diperoleh 54 vial. Pelarut yang ada kemudian diuapkan dan dilakukan pengujian KLT. Fg-3 tidak dilanjutkan karena jumlahnya sangat sedikit.

4.1.8. Pengujian hasil kromatografi kolom dengan KLT

Uji KLT dari hasil pemisahan melalui kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksan : etilasetat (3:7) dan n-heksan : etilasetat (4:6). Hasil KLT tersebut dapat dilihat pada **Tabel 6** dan **Lampiran 5**.

Tabel 6. KLT Hasil Kromatografi Kolom Fg-4

No	No. Vial	Eluen	Rf	Keterangan
1	1	n-heksan : etilasetat 3 : 7	0,64; 0,8	2 noda
2	6		0,68; 0,8	2 noda
3	11		0,32; 0,46; 0,64	3 noda
4	16		0,46; 0,66	2 noda
5	21		0,24; 0,42; 0,64	3 noda
6	26		0,2; 0,42; 0,62	3 noda
7	31		0,18; 0,38; 0,58	3 noda
8	36		0,12; 0,34; 0,58	3 noda
9	41		0,12; 0,32; 0,56	3 noda
10	46		0,12; 0,34	2 noda
11	51		0,12; 0,32	2 noda
12	7	n-heksan : etilasetat 4 : 6	0,6; 0,68	2 noda
13	9		0,14; 0,4; 0,46	3 noda
14	11		0,14; 0,4; 0,46	3 noda
15	13		0,26; 0,48	2 noda
16	15		0,26; 0,48	2 noda
17	17		0,26; 0,48	2 noda
18	19		0,26; 0,48	2 noda

Kromatogram hasil KLT dengan eluen n-heksan : etilasetat (4:6) menunjukkan adanya harga Rf yang sama sehingga dapat digabungkan menjadi satu fraksi. Hasil KLT fraksi gabungan dari kromatografi kolom dapat dilihat pada **Tabel 7** dan **Lampiran 5**.

Tabel 7. Hasil KLT Fraksi Gabungan Kromatografi Kolom

Fraksi	No Vial	Eluen	Rf	Keterangan
f-1	7	n-heksan : etilasetat 4:6	0,46; 0,58; 0,84	3 noda
f-2	9-11		0,1; 0,22; 0,32; 0,42	4 noda
f-3	13-19		0,24; 0,42	2 noda

4.1.9. Pemisahan dengan KLT preparatif

Terhadap f-3 dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam sephadex LH 20 diperoleh 2 vial kemudian diuji KLT. Kromatogramnya dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Hasil KLT masih menunjukkan dua noda sehingga dilakukan pemisah dengan KLT preparatif terhadap vial 2. Senyawa yang akan diambil dikerok dan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian disaring dan dikeringkan. Setelah dikeringkan diperoleh senyawa berbentuk padatan dan uji KLT menunjukkan satu noda dengan Rf 0,68 yang dapat dilihat pada **Lampiran 7** yaitu senyawa PA1.

4.1.10. Hasil pemeriksaan spektroskopi ^1H NMR

Karakterisasi senyawa PA1 menggunakan spektroskopi ^1H NMR menggunakan pelarut CDCl_3 pada frekuensi 500 MHz menghasilkan pergeseran kimia (δ) : 1,28 (*s*, $J= 7,95$ Hz); 4,01 (*m*, $J= 7,35$ Hz) dan 7,00 (*s*). Spektrumnya dapat dilihat pada **Lampiran 8**.

4.2. Pembahasan

4.2.1. Isolasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp*

Isolasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak metanol kulit batang tumbuhan *Polyalthia sp* dimulai dengan menghaluskan kulit batang sehingga berbentuk serbuk. Ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan sampel agar kontak antara pelarut dengan sampel semakin luas sehingga mempermudah proses pelarutan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam sampel. Penyarian sampel dilakukan dengan cara maserasi karena maserasi merupakan prosedur sederhana untuk mendapatkan ekstrak hanya dengan merendam sampel dalam pelarut selama beberapa hari. Maserasi dilakukan menggunakan pelarut metanol. Senyawa yang polar akan terdistribusi ke dalam pelarut polar yaitu metanol. Ekstrak yang



diperoleh diuapkan pelarutnya secara *in vacuo*, karena dalam keadaan vakum tekanan uap pelarut akan menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi kerusakan senyawa termolabil yang ada dalam sampel. Uji fitokimia ekstrak metanol ini memberikan hasil positif terhadap alkaloid, terpenoid dan saponin.

Ekstrak metanol sebanyak 15 g dipartisi dengan metanol : n-heksan (1:1) dan metanol : diklorometan (1:1) sehingga menghasilkan ekstrak heksan (0,2 g), ekstrak diklorometan (3,3 g) dan ekstrak metanol (1,8 g). Dua setengah gram ekstrak diklorometan dipisahkan dengan menggunakan kromatografi vakum cair dengan perbandingan sampel dan silika 1 : 8. Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60 GF₂₅₄ dan fasa gerak n-heksan, etilasetat dan metanol dengan sistem Step Gradient Polarity (GSP) yaitu dengan menggunakan pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara perlahan-lahan sehingga didapatkan pemisahan yang cukup baik. Sebelum sampel dilakukan pemisahan dengan kromatografi vakum cair, terlebih dahulu sampel dipreabsorpsi agar menyerap secara merata pada silika dan akan terpisah dengan baik. Hasil pemisahan dengan kromatografi vakum cair diperoleh 11 fraksi. Terhadap 11 fraksi ini di KLT dan diperoleh 4 fraksi gabungan, yaitu Fg 1 (F1), Fg 2 (F2-F4), Fg 3 (F5-F7) dan Fg 4 (F8-F11). Hasil penggabungan Fg 4 (F8-F11) dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dan KLT preparatif sehingga didapat senyawa murni berupa padatan dengan jumlah yang sangat sedikit yaitu PA1 (0,002 g).

4.2.2. Uji aktivitas antioksidan

Metoda yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metoda serapan radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) karena merupakan metoda yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, E., 2005). DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol. Aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pada panjang gelombang 517 nm (Permana, D., 2003).



Uji antioksidan dilakukan terhadap fraksi gabungan (Fg 1, Fg 2, Fg 3 dan Fg 4) hasil kromatografi vakum cair untuk mengetahui fraksi yang aktif. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat kemampuan sebagai antioksidannya.

Hasil uji aktivitas antioksidan dari keempat fraksi tersebut pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 500 $\mu\text{g/ml}$, diperoleh IC_{50} secara berturut-turut sebesar 1.202,87; 798,22; 349,42 dan 366,38 $\mu\text{g/ml}$ (dapat dilihat pada **Tabel 5**). Hasil ini menunjukkan bahwa Fg-3 dan Fg-4 memiliki daya sebagai antioksidan yang hampir sama dan lebih tinggi dibandingkan dua fraksi lainnya. Akan tetapi kedua fraksi ini masih tergolong sebagai antioksidan lemah karena mempunyai IC_{50} di atas 200 $\mu\text{g/ml}$. Apabila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan sintetik BHT yang mempunyai nilai IC_{50} sebesar 70,87 $\mu\text{g/ml}$, aktivitas keempat fraksi ini masih jauh lebih rendah, sehingga belum mampu menggantikan fungsi BHT sebagai antioksidan komersil. Pada senyawa hasil isolasi tidak dapat dilakukan uji karena jumlah senyawa yang sangat sedikit.

4.2.3. Analisis spektroskopi senyawa PA1

Analisis spektrum ^1H NMR memberikan pergeseran kimia pada 1,28 ppm yang menunjukkan adanya proton metilen (CH_2). Pada pergeseran kimia 4,01 ppm menunjukkan adanya proton yang terikat pada gugus glukosa dan pada pergeseran 7,00 ppm menunjukkan adanya proton aromatik.

Hasil spektroskopi ^1H NMR belum dapat menyimpulkan golongan metabolit sekunder dari senyawa PA1. Untuk memperoleh struktur senyawa PA1 diperlukan pemeriksaan spektroskopi lainnya. Namun pada penelitian ini tidak dapat dilakukan karena kuantitas senyawa yang sangat sedikit.

