**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN KETAPANG (*Terminalia cattapa L*.) DENGAN BERBAGAI METODE DAN UJI SITOTOKSIKNYA**

**SKRIPSI**

**NOVEL SUCI NURANI**

**062119031**



**PROGRAM STUDI KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS PAKUAN**

**BOGOR**

**2024**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN KETAPANG (*Terminalia catappa L*.) DENGAN BERBAGAI METODE DAN UJI SITOTOKSIKNYA**

**SKRIPSI**

Skripsi Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana pada Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan

**NOVEL SUCI NURANI**

**062119031**



**PROGRAM STUDI KIMIA**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS PAKUAN**

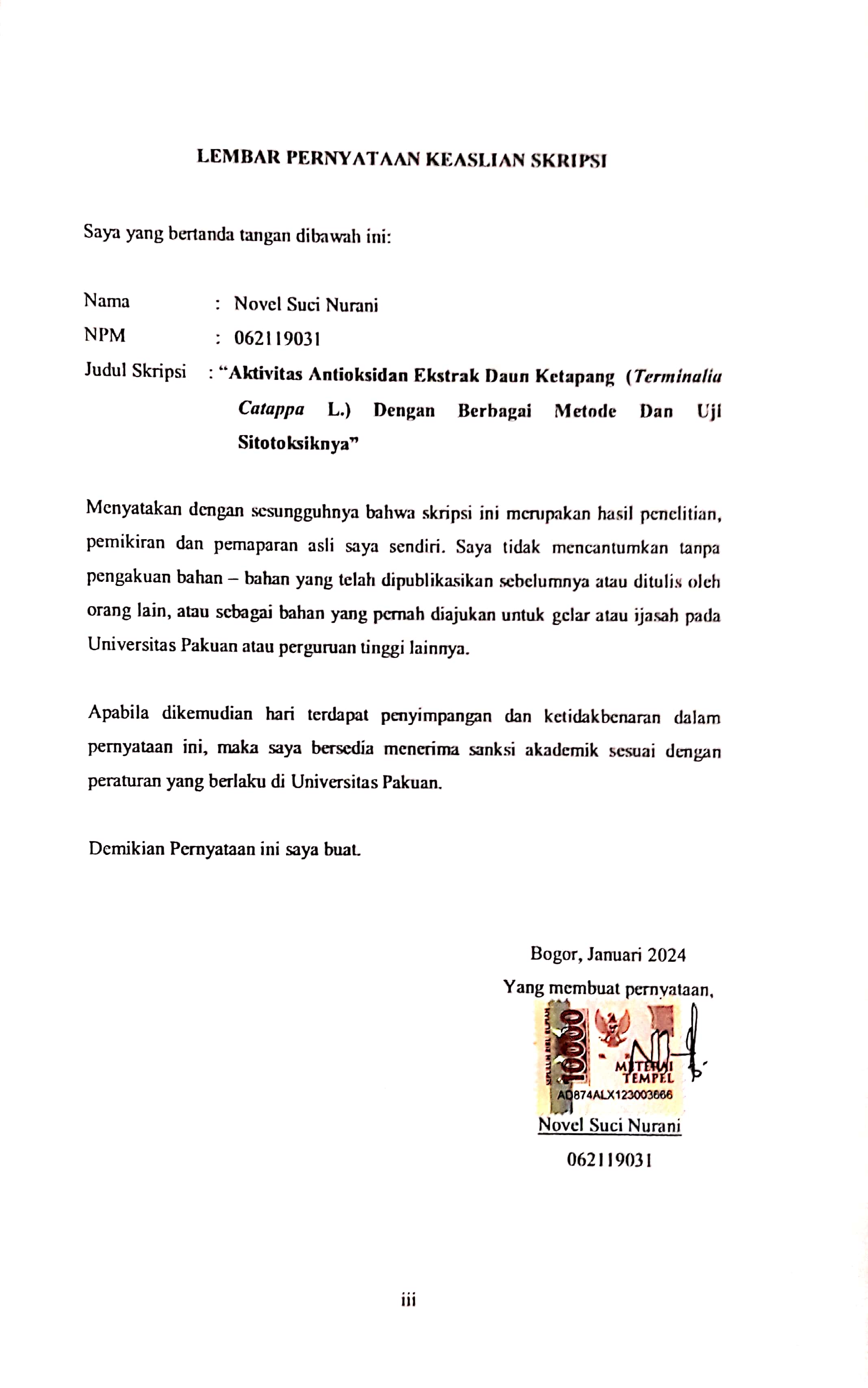
**BOGOR**

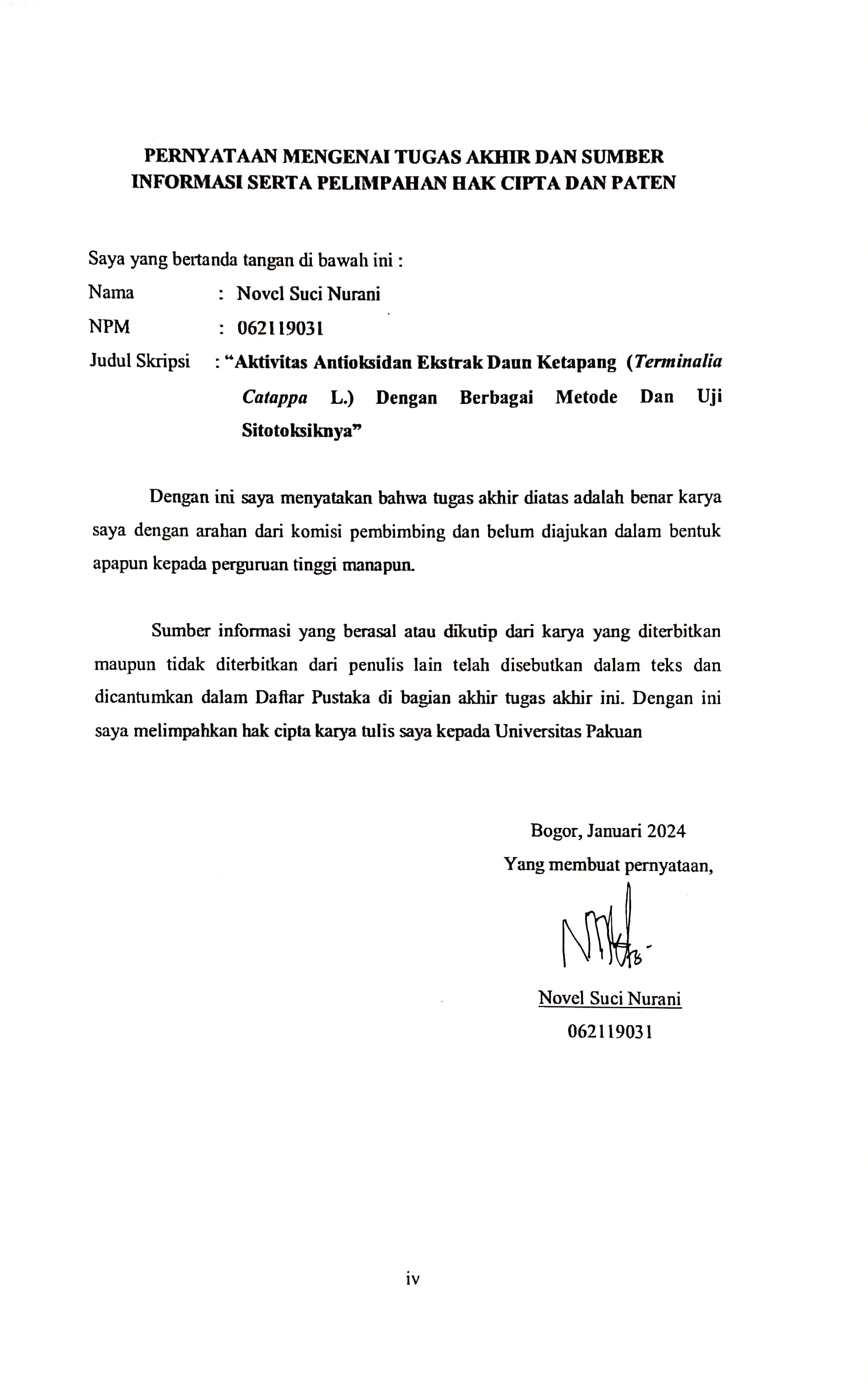
**2024**

# 

# RIWAYAT HIDUP

Novel Suci Nurani, lahir di Bogor pada tanggal 25 November 2001 anak Pertama dari tiga bersaudara pasangan Bapak Mohamad Syahbani dan Ibu Yeyen Nuraeni. Mulai memasuki pendidikan formal pada tahun 2007 di SD Negeri Cipelang 02 dan lulus pada tahun 2013, melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 1 Cijeruk, lulus tahun 2016, kemudian melanjutkan pendidikan menengah umum di SMA Negeri 1 Cijeruk. Pada tahun 2019 melanjutkan pendidikan di Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor, dan lulus pada tahun 2024. Pada masa akhir pendidikannya, penulis melakukan penelitian tentang “Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Ketapang*(Terminalia Catappa L.)* Dengan Berbagai Metode Dan Uji Sitotoksiknya” Di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Pakuan di bawah bimbingan ibu Prof. Dr. Leny Heliawati, M. Si. dan Ibu Siti Warnasih, M. Si.

****

****

# KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN KETAPANG (*Terminalia catappa L*.) DENGAN BERBAGAI METODE DAN UJI SITOTOKSIKNYA”** Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat menjadi sarjana kimia, Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan. Dalam penyusunan skripsi ini terdapat hambatan serta rintangan yang penulis hadapi, namun pada akhirnya dapat melaluinya berkat adanya bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak baik secara moral maupun spiritual. Untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Bapak Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan.
2. Ibu Dr. Ade Heri Mulyati, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia FMIPA Universitas Pakuan.
3. Ibu Prof. Dr. Leny Heliawati, M.Si dan Siti Warnasih, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan pengarahan kepada penulis.
4. Seluruh dosen FMIPA Univeristas Pakuan, atas ilmu yang telah diberikan selama perkuliahan dan seluruh staf Tata Usaha FMIPA Univeristas Pakuan atas bantuan yang telah diberikan.
5. Ibu Yulian Syahputri, M.Si., selaku Koordinasi Laboratorium Kimia Universitas Pakuan beserta staff Laboran Ibu Devi dan Ibu Angel yang telah memberikan izin fasilitas serta bantuannya untuk melakukan penelitian ini.
6. Teristimewa untuk kedua otang tua dan adik-adik yang telah memberikan segala bentuk dukungan, pengorbanan serta motivasi sehingga penulis mampu untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan tinggi.
7. Andini Trie Utami, Tiara Putri, Astrid Lazuardi, Aminah, Habibah, dan Siti Maulidina yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan berbagai nasihat kepada penulis sedari awal perkuliahan.
8. Rekan angkatan Kimia 2019, khususnya Alita Chasanah Zahra teman satu penelitian dan teman diskusi yang selalu memberikan saran dalam penyusunan makalah ini.
9. Seluruh pihak yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan dukungan, serta doa dalam setiap tahap penelitian, sehingga makalah ini dapat diselesaikan.

Akhir kata, penulis mengucapkan terimakasih dan menyadari fakta bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, maka penulis meminta kritik dan saran dari pembaca khususnya penguji agar dapat menjadi acuan bagi penulis untuk melakukan penelitian dengan baik dan dapat menghasilkan karya tulis yang berguna bagi penulis dan masyarakat secara umum.

Bogor, Januari 2024

Penulis

**Novel Suci Nurani. 062119031. “Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia Catappa L*.) dengan Berbagai Metode dan Uji Sitotoksiknya”. Di bawah bimbingan Prof. Dr. Leny Heliawati, M.Si dan Siti Warnasih, M.Si**

# RINGKASAN

Daun ketapang (*Terminalia catappa L.*) merupakan tumbuhan liar yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu Flavonoid, Triterpenoid, dan Tanin yang berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa metabolit flavonoid pada daun ketapang yang diduga memiliki aktivitas antikanker dan menurunkan viabilitas sel, Ekstrak yang diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker tersebut harus di uji sitotoksik terlebih dahulu menggunakan metode BSLT. Maka dengan adanya senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik, diperlukan skrining awal. Penelitian ini dirancang untuk menentukan nilai antioksidan terbaik dengan menggunakan metode DPPH (*1,1difenil-2-pikrilhidrazil*), CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity),*dan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Capacity)* pada ekstrak metanol dan fraksi, yang selanjutnya nilai terbaik akan di uji Sitotoksik menggunakan motode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan instrument GC-MS.

Penelitian ini meliputi tahap ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 96%, kemudian di fraksinasi menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya *n*-Heksan, dan Etil Asetat. Ekstrak dan fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, CUPRAC dan FRAP dengan vitamin C sebagai kontrol positif. Kemudian nilai aktivitas antioksidan terbaik dari ketiga metode selanjutnya uji sitotoksik menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk skrining awal untuk mengetahui aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan toksisitas suatu senyawa dan diidentifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan GC-MS.

Ekstrak methanol, fraksi *n*-Heksan dan fraksi Etil asetat daun ketapang memberikan aktivitas antioksidan paling tinggi dengan menggunakan metode DPPH, CUPRAC dan FRAP diperoleh hasil terbaik dengan kadar 18,2855; 302,7199; dan 180,4672 µg AAE/mg ekstrak pada ekstrak methanol. Hasil analisis probit pada uji sitotoksik menunjukkan ekstrak methanol memiliki nilai LC50 yaitu 410,96 ppm sehingga ekstrak methanol bersifat toksik. Terdapat 23 senyawa berdasarkan uji GC-MS pada ekstrak metanol, terdapat 5 senyawa metabolit sekunder yaitu *epicatechin, 2’acetaminoflavanone, Epigallocationchin gallate, 3’choloflavonol, 7-hydroxyflavone*.

**Kata kunci :** Daun Ketapang (*Terminalia Catappa L*), Antioksidan, Sitotoksik, dan GC-MS.

**Novel Suci Nurani. 062119031. “Antioxidant Activity Test of Ketapang Leaf Extract (*Terminalia Catappa L*.) by Various Methods and its Cytotoxic Tests”. Under the guidance of Prof. Dr. Leny Heliawati, M.Si dan Siti Warnasih, M.Si**

# SUMMARY

Ketapang leaves (Terminalia catappa L.) are wild plants that contain secondary metabolite compounds, namely flavonoids, triterpenoids, and tannins that have potential as antioxidants. Flavonoid metabolite compounds in ketapang leaves are thought to have anticancer activity and reduce cell viability, extracts that are thought to have anticancer activity must first be tested cytotoxic using the BSLT method. So with the presence of secondary metabolite compounds that are toxic, initial screening is needed. This study was designed to determine the best antioxidant value using the DPPH (1,1diphenyl-2-picrylhydrazyl), CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Capacity) methods on methanol extracts and fractions, which then the best value will be tested Cytotoxic using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method and identifying secondary metabolite compounds using GC-MS instruments.

This study includes the extraction stage by maceration using 96% methanol solvent, then fractionated using solvents based on the level of solubility n-Hexan, and Ethyl Acetate. The extracts and fractions were tested for antioxidant activity using DPPH, CUPRAC and FRAP methods with vitamin C as a positive control. Then the best antioxidant activity value from the three methods was then tested for cytotoxicity using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method for initial screening to determine simple biological activity to determine the toxicity of a compound and identified secondary metabolite compounds using GC-MS.

Methanol extract, n-Hexan fraction and Ethyl acetate fraction of ketapang leaves provide the highest antioxidant activity using DPPH, CUPRAC and FRAP methods obtained the best results with levels of 18.2855; 302.7199; and 180.4672 µg AAE/mg extract on methanol extract. The results of probit analysis in the cytotoxic test showed that the methanol extract had an LC50 value of 410.96 ppm so that the methanol extract was toxic. There are 23 compounds based on GC-MS tests on methanol extracts, there are 5 secondary metabolite compounds, namely *epicatechin, 2’acetaminoflavanone, Epigallocationchin gallate, 3’choloflavonol, 7-hydroxyflavone*.

***Keyword:*** *Ketapang Leaf (Terminalia Catappa L), Antioxidant, cytotoxic, and GC-MS*

# DAFTAR ISI

[LEMBAR PENGESAHAN i](#_Toc161097038)

[RIWAYAT HIDUP ii](#_Toc161097039)

[LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI iii](#_Toc161097040)

[PERNYATAAN MENGENAI TUGAS AKHIR DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA DAN PATEN iv](#_Toc161097041)

[KATA PENGANTAR v](#_Toc161097042)

[RINGKASAN vii](#_Toc161097043)

[SUMMARY viii](#_Toc161097044)

[DAFTAR ISI ix](#_Toc161097045)

[DAFTAR GAMBAR xii](#_Toc161097046)

[DAFTAR TABEL xiii](#_Toc161097047)

[DAFTAR LAMPIRAN xiv](#_Toc161097048)

[BAB I PENDAHULUAN 1](#_Toc161097049)

[2.2.1 Latar Belakang 1](#_Toc161097051)

[2.2.2 Tujuan Penelitian 2](#_Toc161097052)

[2.2.3 Hipotesis 2](#_Toc161097053)

[2.2.4 Manfaat Penelitian 3](#_Toc161097054)

[BAB II TINJAUAN PUSTAKA 4](#_Toc161097055)

[2.1 Ketapang (Terminalia catappa L.) 4](#_Toc161097057)

[2.1.1 Morfologi Ketapang 4](#_Toc161097058)

[2.1.2 Manfaat Ketapang 5](#_Toc161097059)

[2.2 Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Ketapang 6](#_Toc161097060)

[2.2.1 Flavonoid 7](#_Toc161097061)

[2.2.2 Triterpenoid 8](#_Toc161097062)

[2.2.3 Tanin 9](#_Toc161097063)

[2.3 Aktivitas Antioksidan Tanaman *Termanilia* 10](#_Toc161097064)

[2.4 Radikal bebas 13](#_Toc161097065)

[2.5 Antioksidan 13](#_Toc161097066)

[2.5.1 Sumber Antioksidan 14](#_Toc161097067)

[2.5.2 Mekanisme Kerja antioksidan 15](#_Toc161097068)

[2.5.3 Metode Uji antioksidan DPPH 15](#_Toc161097069)

[2.5.4 Metode Uji antioksidan CUPRAC 15](#_Toc161097070)

[2.5.5 Metode Uji antioksidan FRAP 16](#_Toc161097071)

[2.6 Sitotoksik 16](#_Toc161097072)

[2.7 Spektrofotometri GC-MS 17](#_Toc161097073)

[BAB III BAHAN DAN METODE 19](#_Toc161097074)

[3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 19](#_Toc161097076)

[3.2 Bahan 19](#_Toc161097077)

[3.3 Alat 19](#_Toc161097078)

[3.4 Metode Penelitian 19](#_Toc161097079)

[3.4.1 Preparasi Sampel 19](#_Toc161097080)

[3.4.2 Penentuan Kadar Air 20](#_Toc161097081)

[3.4.3 Ekstraksi Sampel 20](#_Toc161097082)

[3.4.4 Penentuan Rendemen 20](#_Toc161097083)

[3.4.5 Fraksinasi *n*-Heksan dan Etil-Asetat 20](#_Toc161097084)

[3.4.6 Uji Aktivitas Antioksidan 21](#_Toc161097085)

[3.4.7 Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT 21](#_Toc161097086)

[3.4.8 Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Menggunakan GC-MS 22](#_Toc161097087)

[BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 23](#_Toc161097088)

[4.1 Kadar Air 23](#_Toc161097089)

[4.2 Ekstrak Daun Ketapang 24](#_Toc161097090)

[4.3 Fraksinasi 24](#_Toc161097091)

[4.5 Toksisitas Metode BLST 28](#_Toc161097092)

[4.6 Identifikasi Senyawa Aktif dengan GC-MS 30](#_Toc161097093)

[BAB V KESIMPULAN DAN SARAN 35](#_Toc161097094)

[DAFTAR PUSTAKA 36](#_Toc161097096)

[LAMPIRAN 42](#_Toc161097097)

# DAFTAR GAMBAR

[Gambar 1 (1) Daun ketapang (2) Pohon Ketapang 4](#_Toc161688869)

[Gambar 2 Struktur Senyawa Flavonoid 8](#_Toc161688870)

[Gambar 3 Struktur Senyawa Triterpenoid 9](#_Toc161688871)

[Gambar 4 Struktur Senyawa Tanin 10](#_Toc161688872)

[Gambar 5 Senyawa antioksidan asam galat 11](#_Toc161688873)

[Gambar 6 Senyawa antioksidan Ellagitannin Chebulic 11](#_Toc161688874)

[Gambar 7 Senyawa antioksidan Ellagitanin non-chebulic 12](#_Toc161688875)

[Gambar 8 Senyawa antioksidan Ellagic acid 12](#_Toc161688876)

[Gambar 9 Senyawa antioksidan Ellagic glycoside 13](#_Toc161688877)

[Gambar 10 Reaksi DPPH dengan Senyawa antioksidan 15](#_Toc161688878)

# DAFTAR TABEL

[Tabel 1 Profil Fitokimia Tanaman Terminalia 6](#_Toc161849025)

[Tabel 2 Skrining Fitokimia Ketapang 7](#_Toc161849026)

[Tabel 3 Kategori Toksisitas 17](#_Toc161849027)

[Tabel 4 Kadar Antioksidan 27](#_Toc161849028)

[Tabel 5 Hasil Identifikasi Senyawa GC-MS 30](#_Toc161849029)

# DAFTAR LAMPIRAN

[Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian 41](#_Toc154076347)

[Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian 53](#_Toc154076348)

[Lampiran 3 Data Hasil Ektraksi 55](#_Toc154076349)

[Lampiran 4 Uji Aktivitas Antioksidan 56](#_Toc154076350)

[Lampiran 5 Uji Toksisitas (BSLT) 64](#_Toc154076352)

[Lampiran 6 Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS 65](#_Toc154076353)

# BAB I

# PENDAHULUAN

## Latar Belakang

Perubahan gaya hidup yang diakibatkan oleh akivitas masyarakat yang terlalu padat. Makanan yang dikonsumsi masih jauh dari kebutuhan nutrisi. Sehingga meningkatnya penderita penyakit degeneratif seperti penyakit jantung coroner, hipertensi, kanker, diabetes, dan aterosklerosis (Rilantono, 1992). Penyakit-penyakit tersebut disebabkan oleh proses biokimiawi dalam tubuh yang melibatkan peranan radikal bebas. Radikal bebas ditemui di lingkungan, beberapa logam seperti besi dan tembaga, obat-obatan, makanan olahan, bahan aditif, asap rokok, dan zat lainnya (Droge W, 2002). Radikal bebas dapat dicegah dengan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh, namun kadarnya hanya sedikit.

Banyaknya penyakit pada saat ini, maka antioksidan yang diproduksi oleh tubuh belum terbukti efektif melawan radikal-radikal bebas. Karena fungsi pada antioksidan adalah mencegah atau menghentikan radikal bebas. Untuk mencegah terjadinya akumulasi radikal bebas didalam tubuh, maka diperlukan senyawa antioksidan. Antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh tidak cukup untuk melawan radikal bebas, maka dari itu tubuh memerlukan asupan antioksidan dari luar (Dalimartha dan Soedibyo, 1999). Senyawa antioksidan dapat diperoleh dari bahan sintetik alami. Antioksidan sintetik mempunyai efektivitas yang tinggi, namun dikhawatirkan dapat membahayakan dalam tubuh manusia (Amarowcz et *al.,* 2014)

Salah satu tumbuhan obat yang memiliki senyawa sebagai antioksidan salah satunya adalah daun ketapang (*Terminalia Catappa L*.). menurut Rahayu *et al.,* (2009) daun ketapang mengandung banyak senyawa yang bersifat antioksidan. Pada penilitian sebelumnya Tasneem & Narsegowda (2019) ekstrak methanol daun ketapang menunjukkan hasil aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC50 sebesar 3,54-5,52 µg/mL, selain kaya akan flavonoid uji fitokimia pada daun ketapang terbukti bahwa esktrak methanol mengandung senyawa flavonoid,steroid, tanin, saponin dan isolate (Salimi *et al,* 2022). Senyawa metabolit flavonoid pada daun ketapang yang diduga memiliki aktivitas antikanker dan menurunkan viabilitas sel (Barinta *et al.,* 2016).

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas sebagai antikanker, harus di uji terlebih dahulu pada hewan. Pada penelitian ini menerapkan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yaitu metode yang sering digunakan untuk pengujian toksisitas disuatu senyawa dengan memakai larva udang Artemia Salina. Uji toksisitas berpotensi untuk mengklaim suatu keamanan serta keefektifan disuatu tumbuhan herbal yang akan diuji menggunakan metode ini sudah terbukti mempunyai daya sitotoksik senyawa antikanker. Pada penelitian Alfin dan Wira (2018) melaporkan bahwa ekstrak methanol daun ketapang bersifat sangat toksik dengan nilai LC50 sebesar 56 pm. Metode BSLT merupakan metode yang mudah dilakukan, cepat, murah dan hasilnya bisa dipertanggung jawabkan.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas antioksidan serta sitotoksik ekstrak methanol daun ketapang (*Terminalia catappa L*.) dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan GC-MS, sehingga nantinya bisa digunakan sebagai sumber bahan baku antikanker.

## Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas antioksidan pada ekstrak methanol daun ketapang (*Terminalia catappa L.*) menggunakan metode DPPH, CUPRAC dan FRAP
2. Menentukan aktivitas sitotoksik ekstrak methanol daun ketapang (*Terminalia catappa L*.) menggunakan metode BSLT
3. Mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa L.*) menggunakan GC-MS

## Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini :

1. Tanaman daun ketapang (*Terminalia cattapa L*) memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi berdasarkan pada metode DPPH, CUPRAC, DAN FRAP
2. Daun ketapang memiliki aktivitas sitotoksik dengan kategori kuat berdasarkan metode BSLT
3. Terdapat senyawa metabolit sekunder pada ekstrak daun ketapang

## Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan pada ekstrak methanol dengan berbagai jenis metode yang digunakan, dan dapat menunjukkan senyawa bahwa golongan senyawa aktif yang terdapat pada daun ketapang (*Terminalia cattapa L.)* berpotensi memiliki toksisitas yang kuat untuk dijadikan obat.

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## Ketapang (Terminalia catappa L.)

Tumbuhan ketapang (*Terminalia catappa L*.) termasuk kedalam familia combretaceace. Ketapang adalah tumbuhan asli Asia Tenggara, tetapi pohon ketapang jarang ditemukan di wilayah Kalimantan dan Sumatra. Pohon ini juga banyak ditanam di Pakistan, Australia utara, Polinesia, India, Madagaskar, Afrika Timur, Afrika barat, Amerika Tengah, serta Amerika Selatan (Thomson *et al.,* 2006). Salah satu tumbuhan obat yang dimanfaatkan secara tradisional adalah Ketapang (Pauly, 2001).



Gambar 1 (1) Daun ketapang (2) Pohon Ketapang

(Ramdhani, 2020)

Klasifikasi ilmiah tumbuhan ketapang menurut Yuniarsih (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Ordo : Myrtales

Family : Combretaceae

Genus : *Terminalia*

Spesies : *Terminalia catappa L.*

## Morfologi Ketapang

Tumbuhan ketapang (*Terminalia catappa L*.) adalah tumbuhan multiguna, dengan tingkat pertumbuhan yang cepat berkisar 2 m/tahun. Tanaman ketapang memiliki batang yang besar dengan tinggi diatas 20 meter, terdapat 4-5 cabang semu. Daun ketapang terdiri dari helaian daun (lamina) dengan ukuran selebar tangan serta tangkai daun (petioles) dua kali setahun gugur, tepi daunnya rata dan permukaannya licin (laevis) serta berwarna hijau.

Akan tetapi pada musim kemarau akan berubah warna menjadi kuning kecoklatan atau merah kecoklatan. Pada bunga terdapat 2 kelamin atau Bungan betina dan bunga jantan, tepi kelopak bertaju 5, berbentuk piring atau lonceng. Bunga betina, dengan panjang 4-8 mm berwarna putih, sedangkan pada bunga jantan, benang sarinya muncul keluar akan tetapi pada bunga betina benang sarinya lebih pendek. Tangkai putiknya sangat pendek bahkan tidak ada. (Thomson. B. Evans 2006).

## Manfaat Ketapang

Menurut Tasneem (2018), ekstrak daun ketapang sendiri sudah lama dikenal sebagai obat rakyat yang digunakan untuk mengobati kudis , kusta , dan gangguan kulit lainnya dan juga berkhasiat dapat menurunkan darah tinggi, sulit tidur (insomnia), dan masalah pernapasan dan pencernaan (Murni *et, al.,* 2018). Selain itu eskstrak daun ketapang digunakan pada bidang kosmetik karena memiliki antioksidan dan memiliki aktivitas UV (Harborne, 1987).

Pada penelitian sebelumnya Anand *et al,* (2015) pada tanaman terminalia catappa menunjukan bahwa daun ketapang memiliki banyak manfaat kesahatan, antara lain memiliki aktivitas antioksidan, antidiabetes, antikanker, antimikroba, antibakteri, antiinflamasi, antipenuaan, hepatoprotektor, penyembuhan luka, dan analgesik, serta rebusan daun kering ketapang secara *in vivo* dilaporkan memiliki efek hipokolesterolemia pada tikus.

Aktivitas farmakologi yang telah laporkan bahwa ekstrak etanol daun ketapang (terminalia catappa L.) mempunyai kemampuan menurunkan LDL dan kolesterol tetap. Kadar kolesterol totak tertinggi dilaporkan mengalami penurunan pada KU III (Dosis 120 mg/Kg BB), dengan persentase penurunan masing-masing sebesar 59,02% dan 58,94%. Namun persentase penurunan tersebut tidak sebanding dengan control positif yaitu atorvastatin yang mampu menurunkan kadar kolesterol total dan LDL dengan persentase penurunan masing-masing sebesar 68,74% dan 70,34% (Maharadingga, 2021). Pengaruh ekstrak daun ketapang (Terminalia catappa L.) terhadap bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* menunjukkan respon bakteri yang berbeda-beda pada konsentrasi ekstrak 30%, 60% dan 90%. Tiga konsentrasi ekstrak daun ketapang yang berbeda menunjukkan adanya zona disekitar kertas cakram yaitu 8,8267 (30%), 11,2533 (60%), dan 12,4967 (90%), menunjukkan adanya daya hambat *terhadap B. amyloliquefaciens* yang berperan sebagai agen bikontrol (Putricia, 2016). Penelitian yang di lakukan oleh (Alfin, 2018) bahwa pada ekstrak daun ketapang diperoleh nilai LC50 sebesar 50 ppm, yang menunjukkan bahwa daun ketapang sangat toksik.

## Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Ketapang

Ketapang (Terminalia catappa) sebagai kena tropis dan dikenal karena senyawa obat yang meliputi flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid atau steroid, resin, dan saponin (Tjipsoepomo,2002).

Tabel 1 Profil Fitokimia Tanaman Terminalia

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Spesies** | **Golongan senyawa** | **Bagian Tanaman** | **Asal** | **Pustaka** |
| 1. | *Terminalia catappa L*. | Alkaloid dan flavonoid | Buah | Pontianak | (Dominika *et al*., 2015) |
| 2. | *Terminal catappa L.* | Flavonoid, triterpenoid,tanin | Daun | Gorontalo | (Yuszda.  K. S *et al.,* 2022) |
| 3. | *Terminalia catappa L.* | Flavonoid | Kulit Kayu dan kayu | Mannargudi,  Tamil Nadu | (Venkatalak *et al*., 2016) |
| 5. | *Terminalia catappa* | Fenolik | Daun | Taiwan | (Chyau CC *et al.,* 2006) |
| 6. | *Terminalia catappa* | Flavonoid | Daun | Taiwan | (Lin YL *et al.*, 2000) |
| 7. | *Terminalia catappa* | Tanin | Daun | Japan | (Kinoshita S *et al.,* 2007) |
| 8. | *Terminalia catappa* | Triterpenoid | Daun | China | (Fan YM *et al.,* 2004) |

Senyawa metabolit sekunder dari tanaman Ketapang memiliki potensi sebagai antioksidan, antibakteri, antifungi dan antikanker. Pengujian ini telah banyak dilakukan terhadap ekstrak. Beberapa penelitan melaporkan hasil ekstrak methanol daun ketapang menghasilkan senyawa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, steroid, saponin, tanin dan isolate

Menurut (Ahmed *et al.,* 2005) pada skirining fitokimia tanaman ketapang (Terminalia catappa L.) terutama terdiri dari flavonoid (isovitexin, vitexin, isoorintin, rintin), triterpenoid dan tannin (punnicalgin, punicalin, terflavin A dan B, tergallin, tercatin, asam chebulagic, geranin, granatin B, corilagin).

Tabel 2 Skrining Fitokimia Ketapang

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Metabolit Sekunder** | **Daun (Yuszda *et* *al.,* 2022)** | **Buah (Dominika *et al.,* 2015)** |
| Flavonoid | + | + |
| Alkaloid | - | - |
| Steroid | - | + |
| Saponin | - | - |
| Tanin | + | + |
| Triterpenoid | + | - |

Hasil skrining diketahui bahwa tanaman ketapang mengandung senyawa seperti alkaloid, flavonoid, tannin, steroid, dan saponin, yang mempunyai khasiat obat.

## Flavonoid

Flavonoid ialah bentuk turunan dari senyawa fenol. Secara umum, flavonoid merupakan senyawa dengan 15 atom karbon dalam konfigurasi C6-C3-C6, yang merupakan dua cincin aromatik yang terhubung dengan tiga karbon yang mungkin dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid merupakan salah satu fenolik alam yang berpotensi sebagai antioksidan dan memiliki nilai bioaktivitas. Fungsi terbesar flavonoid didalam tubuh manusia karena berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Berdasarkan pada penelitian yang sudah dilakukan oleh Lin *et al.,* (2000) Pada Daun Ketapang terdapat senyawa Flavonoid dengan jenis isovitexin, vitexin, isoorientin, 2”-O-galloylvitexin, and 2”-O-galloylisovitexin.

Isovitexin Vitexin

Isoorientin 2”-O-galloyvitexin



2”-O-galloylisovitexin

Gambar 2 Struktur Senyawa Flavonoid

## Triterpenoid

Triterpenoid adalah bahan kimia biosintetik yang terbentuk dari skualen, hidrokarbon C30 asiklik. Kerangka karbon berasal dari enam satuan isoprene. Triterpenoid ialah berbentuk kristal, tidak berwarna dan memiliki titik leleh yang tinggi (Harborne, 1987). Menurut Cowan (1999) mekanisme antibakteri triterpenoid adalah bereaksi dengan porin (protein trans membran) pada membran luar dinding sel bakteri kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Menurut Fan YM *et al.,* (2004) senyawa triterpen yang terdapat pada ketapang adalah Ursolic acid dan *2α,3β,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid.*

*Ursolic acid (3β-hydroxy-urs-12-ene-28-oic acid)* adalah terpenoid pentasiklik yang memiliki berbagai potensi farmakologis (Wozniak *et al.,* 2015).

Senyawa ini ditemukan di kulit batang, daun atau kulit. Salah satu potensi farmakologis yang dimiliki oleh asam ursolic adalah anti kanker dan antimikroba. Salah satu mekanisme anti kanker asam ursolic adalah menghambat poliferasi sel dan menginduksi apoptosis sel melalui jalur intrinsik mitokondria dan penekanan jalur ERK1/2 MAPK pada kanker serviks ( Li *et al,* 2014).

*Ursolic Acid*  *22α,3β,23-trihydroxyurs-12-en-28-oic acid*

Gambar 3 Struktur Senyawa Triterpenoid

## Tanin

Senyawa tanin termasuk dalam golongan flavonoid yang terdapat pada tumbuhan. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu cathechic tannin (terkondensasi) dan gallic tannin (terhidrolisis). Tanin adalah senyawa polifenol dari kelompok flavonoid yang ditemukan pada famili tingkat tinggi yang terdapat pada tanaman ketapang (*Terminalia catappa L*.) (Fogler, 1992). Menurut Ahmed *et al.,* (2005) senyawa tannin yang terdapat dalam daun ketapang yaitu punicalagin, punicalin, terflavin A dan B, tergallin, asam chebulagic, reganin, granatin B, corilagin

Hasil dari penelitian yang dilakukan oleh Kinoshita S *et al.,* (2007) pada Daun ketapang terdapat senyawa tanin dengan jenis *Corilagin (1-O-galloyl-3,6-O-HHDP-β-ᴅ-Glc)* dan *Chebulagic acid (1-O-galloyl-2,4-O-chebuloyl-3,6-OHHDP-β-ᴅ-Glc*. Corilagin adalah senyawa golongan tannin yang banyak ditemukan pada tanaman obat dan digunakan sebagai agen anti inflamasi (Jia *et al.,* 2013). Corilagin juga memiliki sifat anti kanker. Hasil penelitian Jia *et al.* (2013) menunjukkan jika corelagin mampu menghambat pertumbuhan kanker ovarium dan memiliki toksisitas yang rendah terhadap sel normal. Corilagin menghambat pertumbuhan sel kanker dengan cara menghambat sekresi TGF- β pada sel ka

Corilagin  Chebulagic acid

Gambar 4 Struktur Senyawa Tanin

## Aktivitas Antioksidan Tanaman *Termanilia*

Tanaman ketapang (Terminalia catappa L.) adalah tumbuhan dari familia combretaceous yang memiliki kandungan antioksidan yang tinggi (Kinoshita *et* *al.,* 2007). Daun ketapang memiliki senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa alami yang dapat berfungsi sebagai antioksidan adalah fenolik. Daun ketapang memiliki penangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikrihidrazin (DPPH) yang lebih tinggi dibandingkan dengan benihnya.

Pfundstein *et al.,* (2010) melaporkan terdapat Tiga pohon Terminalia (Terminalia chebula Retz, Terminalia bellerica dan Terminalia horrida) milik keluarga Combretaceae, dan tersebar luas di Mesir dan daerah subtropis dan tropis lainnya. Buahnya disebut chebulic dan digunakan pada kulit dan rakyat tradisional setempat kedokteran di Mesir, India dan Pakistan. Nama mereka di Mesir adalah Kebuli (T. chebula), Hind (T. horrida) dan Bellileg (T. bellerica). Ekstrak buah Terminalia telah sering digunakan sebagai obat rakyat karena pencahar, astringen, dan sifat diuretic. sebagian besar senyawa polifenol yang terdapat paada tiga pohon tersebut beragam diisolasi dan dimurnikan untuk ditetapkan kapasitas antioksidan. Hasil dari isolasi terdapat 22 zat yang dimurnikan dan 5 senyawa (Asam galat, Ellagitannin Chebulic, Ellagitanin non-chebulic, Asam ellagic, dan Glikosida ellagic) dari beberapa senyawa tersebut menunjukkan aktivtas antioksidan yang baik yang terdapat pada senyawa Ellagitannin Chebulic (Metil neochebulinate) dengan mendapatkan nilai IC50 sebesar 2,66 g/mL.

Aktivitas tertinggi yang ditunjukkan untuk asam galat dengan tiga hidroksil dan satu gugus karboksil. Ada 3 senyawa yang di dapat pada asam galat (Asam galat, Metil galat dan pentaO-galloil glukosa) dengan nilai antioksidan tinggi. Metil galat menunjukkan aktivitas yang sedikit lebih rendah, dengan nilai dpph sebesar 4,28 g/mL mungkin karena hilangnya kapasitas donasi karboksil –OH.



(a)



(b)

Gambar 5 Senyawa antioksidan asam galat

Elligatannin Chebulic ini termasuk senyawa dengan nilai antioksidan yang terbaik, asam chebulinic memiliki nilai antioksidan yang tinggi yaitu 2,66 g/mL bahkan lebih dari pada metil neochebulinate sebesar 2,75 g/mL.

(c) dan (d)

Gambar 6 senyawa antioksidan Ellagitannin Chebulic

Secara umum, senyawa-senyawa dalam golongan ini menunjukkan kinerja yang cukup buruk dari senyawa lainnya dan bersifat mirip dengan ester gallate tetapi kurang efisien. Senyawa corilagin mendapatkan nilai antioksidan cukup dengan nilai 11,42 g/mL dibandingkan dengan punicalagin sebesar 25,72 g/mL

(e) dan (f)

Gambar 7 senyawa antioksidan Ellagitanin non-chebulic

Ellagic acid memilki radikal bebas yang sangat kuat dan mendapatkan senyawa terbaik yang di uji oleh DPPH. Senyawa flavogallonic acid tetapi mengakibatkan penurunan kapasitas antioksidan.

(g) dan (h)

Gambar 8 senyawa antioksidan Ellagic acid

Ellagic glycoside mendapatkan 2 senyawa terbaik dengan nilai aktivitas antioksidan yang cukup tinggi yaitu 4-O-(4”-O-galloil-ÿ-L-rhamnopyranosyl) asam ellagic dan 4-O-(3”,4”-di-O-galloil-ÿ-L rhamnopyranosyl) asam ellagic dengan nilai 5,29 g/mL.



(i)

Gambar 9 senyawa antioksidan Ellagic glycoside

## Radikal bebas

Radikal bebas yang berlebihan dapat merusak zat apapun khususnya pada lipid dan protein. Hal ini menyebabkan banyak penyakit degenetif (Amic *et al.,* 2003). Penyakit tersebut terjadi ketika tubuh tidak memiliki cukup antioksidan untuk menangkal terjadinya produk oksidasi pada setiap saat.

Menurut Labola & Puspita, 2018. Mekanisme radikal bebas terbagi menjadi 3 tahap yaitu :

* + - 1. Inisiasi, pada tahap ini adalah langkah awal terciptanya spesies radikal. Tahap ini adalah peristiwa dimana pembelahan homolitik yang jarang terjadi karena adanya hambatan energy. Biasanya, tahap ini dibentuk oleh pengaruh suhu tinggi, ultraviolet ataupun katalis yang mengandung logam yang digunakan sebagai penghalang energy.
      2. Propagasi, bagian rantai dari reaksi berantai. Ketika radikal bebas reaktif yang dihasilkan, makan akan memicu untuk bereaksi dengan molekul yang stabil sehingga akan membentuk radikal bebas baru. Hal ini akan terus menerus terjadi dan melibatkan abstraksi hydrogen atau menambahkan radikal menjadi ikatan rangkap sehingga akan menghasilkan lebih banyak radikal bebas.
      3. Terminasi, reaksi radikal akan berhenti apabila kedua radikal tersebut saling bereaksi dan akan menghasilkan spesies yang tidak radikal.

## Antioksidan

Zat pemberi electron dikenal sebagai antioksidan. Untuk mengurangi aktivitas antioksidan dengan memberikan electron pada senyawa tersebut. Aktivitas antioksidan. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan menambahkan electron yang hilang yang dimiliki radikal bebas, dan mencegah terjadinya reaksi berantai yang mengarah pada pembentukan radikal bebas (Winarsi, 2007). Senyawa antioksidan yang berperan aktif dalam penangkapan radikal bebas adalah senyawa fenolik, flavonoid dan vitamin C. Menurut penelitian yang dilakukan Pandya *et al,* (2013). Antioksidan adalah zat yang dapat menetralisasi radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang awalnya tidak memiliki pasangan dapat pasangan elektron dan menjadi tidak liar lagi atau stabil. Antioksidan dapat membantu proses penuaaan, dan melawan radikal bebas, melindungi tubuh dari kanker dan penyakit degenerative lainnya (Tapan, 2005)

Antikanker atau agen kemoterapeutik merupakan senyawa kimiawi yang memiliki efek penghambatan pada kanker. Agen kemoterapeutik digunakan dalam kemoterapi dalam pengobatan kanker (Georgakilas, 2012). Oksidasi ialah reaksi kimia yang menghasilkan radikal bebas, yang dapat menyebabkan reaksi berantai jika dialami oleh sel organisme akan mengalami kerusakan. Antioksidan merupakan senyawa dengan kemampuan menghambat terjadinya oksidasi. Beberapa senyawa berkontribusi terhadap pertahanan oksidasi melalui pengkelatan logam maupun mencegah terjadinya reaksi radikal bebas pada sel (Rao *et al.,* 2011).

## 2.5.1 Sumber Antioksidan

Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga yaitu : (Anonim 2012)

Antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia mengacu pada enzim antioksidan (enzim Superoksida Dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx), dan Katalase (CAT).

Antioksidan sintetis seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat dan Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) yang banyak dimanfaatkan dalam bahan pangan.

Antioksidan alami seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E dan senyawa fenolik (flavonoid), yang berasal dari tumbuhan seperti kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari.

## 2.5.2 Mekanisme Kerja antioksidan

Berdasarkan mekanisme kerja antioksidan dapat dibedakan menjadi 3 yaitu : (Silalahi, 2006)

1. antioksidan primer seperti glutation peroksidase, dapat berfungsi dengan menghentikan pembentukan radikal bebas dan mengubah radikal bebas menjadi molekul.
2. antioksidan sekunder seperti vitamin C dan E, yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghalangi reaksi berantai.
3. antioksidan tersier seperti DNA repair enzyme bermanfaat untuk memperbaiki kerusakan biomolekular yang disebabkan oleh radikal bebas

## 2.5.3 Metode Uji antioksidan DPPH

Salah satu metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah metode *1,1difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH). Interaksi antioksidan dengan DPPH baik melalui transfer elektron maupun secara radikal hidrogen pada DPPH, dapat menetralkan sifat radikal bebas dari DPPH dan membentuk DPPH tereduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan pada panjang gelombang 517 nm absorbansi akan hilang(Rohman, *et, al.,* 2010).



Gambar 10 Reaksi DPPH dengan Senyawa antioksidan

(Molyneux, 2004)

## 2.5.4 Metode Uji antioksidan CUPRAC

Metode CUPRAC bekerja berdasarkan prinsip reduksi Cu2+-neokuproin berwarna biru menjadi Cu+-neokuproin berwarna kuning dengan adanya donor hidrogen dari agen antioksidan pada pH 7. Cu+-neokuproin adalah senyawa kromofor yang memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 490 nm (). Metode CUPRAC memiliki kelebihan, antara lain pengujiannya cepat, stabilitas dan selektivitas dengan potensial reduksi yang rendah (0,159 V) dibandingkan dengan reagen FRAP sehingga gula sederhana dan asam sitrat tidak dapat dideteksi sebagai zat pengganggu. Berikut ini reaksi yang terjadi:

n Cu(Nc)2 2+ + AR(OH)n → n Cu(Nc)2 + + AR(=O)n + n H+

## 2.5.5 Metode Uji antioksidan FRAP

Metode FRAP menggunakan reagen berupa Fe(TPTZ)23+ kompleks besi ligan 2,4,6tripiridil-triazin. Prinsip dari metode ini adalah proses reduksi kompleks Fe(TPTZ)23+ menjadi Fe(TPTZ)22+ yang berwarna biru. Metode ini memiliki pengukuran yang cepat dan reproducible, tetapi sangat spesifik. Karena dimungkinkan mendeteksi senyawa dengan potensial reduksi lebih rendah dari potensial reduksi Fe3+/Fe2+ (0,77 V) (Choirunnisa, *et al.,* 2016). Berikut ini reaksi yang terjadi:

Fe(TPTZ)23+ + AROH → Fe(TPTZ)22+ + H+ + AR=O

## Sitotoksik

Kematian sel yang disebabkan oleh senyawa kimia atau mediator sel adalah sitotoksik. Sitotoksitas sering digunakan sebagai pedoman di dalam laboratorium untuk mengidentifikasi kematian sel melalui metode apapun. Salah satu mekanisme penting untuk menghilangkan sel kanker adalah aktivitas sitotoksik (Wyllie, 2010). Uji sitotoksik telah digunakan untuk menguji perbedaan bioaktivitas sejak tahun 1956 untuk berbagai pengamatan bioaktivitas bahan alam menggunakan larva udang Artemia Salina. Menurut Susanti dkk, (2011) dengan menggunakan metode BSLT, uji aktivitas sitotoksik dilakukan pada larva Artemia Salina Leach, mengingat biaya yang cukup murah dan mudah, serta skrining awal untuk pencarian senyawa antikanker.

Senyawa bioaktif hampir selalu toksik dalam dosis tinggi. Daya bunuh senyawa secara in vivo dapat digunakan terhadap hewan untuk menguji tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas, salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji ini adalah Brine Shrimp Test (Lenny, 2006). Selain metode BSLT masih banyak metode lain yang dapat mendeteksi adanya senyawa bioaktif suatu tanaman, antara lain *inhibition of crown gall tumor in discs of potato tubers* dengan menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (bioassay untuk tumor) (Anderson, et al., 1998).

Pada uji sitotoksik menggunakan parameter LC50. Nilai LC50 menunjukkan kemungkinan toksisitas suatu senyawa terhadap sel serta menghasilkan 50% penghambatan proliferasi sel. Nilai LC50 dapat menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin tinggi nilai LC50 maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Penyelesaian dari uji sitotoksitas pada organ target memberikan informasi yang tepat tentang fungsi sel secara spesifik (Djajanegara dan Wahyudi, 2009). Pada penelitian Alfin dan Wira, 2018. Bahwa pada ekstrak daun ketapang di peroleh nilai LC50 sebesar 56 ppm, hal ini menunjukkan bahwa sampel sangat toksik.

Tabel 3 Kategori Toksisitas

Menurut Clarkson, 2004

|  |  |
| --- | --- |
| **Kategori** | **LC 50 (ppm)** |
| Sangat toksik | 0-100 |
| Toksik | 100-500 |
| Toksik rendah | 500-1000 |
| Tidak toksik | >1000 |

## Spektrofotometri GC-MS

*Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)* adalah teknik kromatografi gas yang digunakan bersama dengan spektrometri massa. Pengunaan kromatografi gas dilakukan untuk mencari senyawa yang mudah menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah jika dipanaskan. Sedangkan spektrometri massa untuk menentukan bobot molekul, rumus molekul, dan menghasilkan molekul bermuatan (Darmapatni *et al.,* 2016). Kromatografi gas mampu membaca senyawa dengan konsentrasi terendah sehingga metabolit sekunder dalam tanaman dapat teridentifikasi dengan hasil berupa kromatogram dan spectrum massa (Al-Rubaye *et al.,* 2017).

Analisis dengan menggunakan GC-MS yaitu untuk analisis kuantitatif dan menentukan jumlah persen dari komponen-komponen yang terpisah dari suatu komponen, dan dapat dihitung dari luas puncak (peak) kromatogram (Gandjar & Rohman, 2007). Hasil analisis GC-MS diekspresikan dalam bentuk puncak (peak), mewakili senyawa yang terbeda. Masing-masing puncak dianalisis menggunakan spectrometer massa dan dibandingkan dengan *internal Willey Library MS*. Menurut Alia *et al.,* (2017) berdasarkan hasil yang di dapat melalui GC-MS, diketahui bahwa ekstrak methanol daun ketapang (T. catappa) memiliki kandungan senyawa yang beragam, ditunjukkan melalui puncak (peak) pada spectrum GC dengan waktu retensi yang berbeda-beda yang dilakukan pada 9 senyawa, dan terdapat 12 puncak yang diperoleh.

Prinsip kerja GC-MS yaitu sampel yang berupa cairan diinjeksikan ke dalam injector kemudian di uapkan. Sampel yang berbentuk uap dibawa oleh gas pembawa menuju kolom untuk proses pemisahan. Setelah terpisah, masing-masing komponen akan melalui ruang pengion dan dibombardir oleh electron sehingga terjadi ionisasi. Fragmen-fragmen ion yang dihasilkan akan ditangkap oleh detector dan dihasilkan spectrum massa (Casez, 2001).

# BAB III

# BAHAN DAN METODE

## Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada Bulan Desember 2022 hingga Bulan April 2023. Bertempat di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan

## Bahan

Bahan yang digunakan meliputi daun ketapang yang diperoleh dari kecamatan Babakan Madang, akuades, metanol , troloks, CuCl2, neukuproin etanolik, NH4CH3COO, buffer asetat, HCl, FeCl3.6H2O, pereaksi FRAP, telur larva udang *A.salina Leach,* air laut, DPPH, n-heksan, n-butanol dan etil-asetat.

## Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *rotary evaporator*, *microplate*, timbangan neraca analitik, vial, gelas piala, batang pengaduk, pipet tetes, kuvet, oven, *waterbath*, desikator, aluminium foil, corong, kertas saring, cawan, botol semprot dan Erlenmeyer. Instrumen yang digunakan adalah *Gas Chromatography****-****Mass Spectrometry*  (GC-MS Agilent 5977B dengan tipe kolom Agilent 19091S-433UI HP-5MS).

## Metode Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu persiapan bahan baku, pembuatan simplisia, ekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, dilanjutkan tahap fraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan n-butanol, kemudian analisis aktivitas antioksidan dengan berbagai metode DPPH, CUPRAC, FRAP, dan uji sitotoksik dengan metode BSLT. Selanjutnya mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

## Preparasi Sampel

Sampel disortasi, dicuci menggunakan air yang mengalir, diperkecil ukurannya, dan dikeringkan menggunakan oven selama 7 jam dengan suhu 50°C, kemudian dihancurkan hingga berbentuk serbuk dengan menggunakan blender dan di saring. (Pramesti *et al.,* 2022).

## Penentuan Kadar Air

Cawan kosong dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 105 ºC selama 30 menit, kemudian didinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Sebanyak ± 3 gram simplisia daun ketapang dikeringkan dalam oven pada suhu 105ºC selama 3 jam, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Setelah dingin cawan beserta simplisia daun ketapang ditimbang hingga diperoleh bobot konstan (AOAC, 2005).

## Ekstraksi Sampel

Sebanyak 50g simplisia daun Ketapang dimasukkan ke dalam pelarut methanol 70%, didiamkan selama 3 x 24 jam dalam kondisi wadah tertutup pada suhu ruang sambil sesekali dilakukan pengadukan. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya, diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45-50°C. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk menghitung rendemen ekstraknya (Suryani *et al.,* 2016).

## Penentuan Rendemen

Pengujian daun ketapang diperoleh dari berat ekstrak ketapang yang dihasilkan dibagi dengan berat ketapang yang digunakan.

Perhitungan : Rendemen ketapang (%) :

## Fraksinasi *n*-Heksan dan Etil-Asetat

Fraksinasi ekstrak methanol daun ketapang dilakukan secara partisi dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak metanol sebanyak 10 gram dilarutkan dalam 100 mL air hingga larut sempurna. Kemudian larutan dimasukan kedalam corong pisah dan ditambahkan larutan yang memiliki kepolaran berbeda. Yang pertama ditambahkan larutan *n*-heksan sebanyak 100mL dimasukan kedalam corong pisah, dikocok hingga tercampur merata lalu di diamkan sampai terbentuk 2 fase, dimana larutan atas adalah fraksi *n*-heksan dan larutan bawah air, pisahkan keduanya dan untuk fraksi air ditambahkan kembali *n*-heksan sebanyak 100 mL diulangi sebanyak 3 kali hingga fraksi *n*-heksan jernih. Larutan hasil fraksi *n*-heksan yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator*.

Selanjutnya untuk fraksi etil asetat. Lapisan air yang sebelumnya di tambahkan pelarut etil asetat sebanyak 100 mL, campuran di kocok dan dibiarkan hingga terbentuk 2 fase, lapisan tersebut dipisahkan dan ulangi sebanyak 3 kali dengan langkah yang sama. Hasil fraksi etil asetat diuapkan menggunakan *rotary evaporator.*

Timbang masing-masing hasil fraksi *n*-heksan, etil asetat, yang diperoleh dan dihitung nilai rendemennya. (Hikmah, 2012).

## Uji Aktivitas Antioksidan

Metode DPPH

Sebanyak 50 µL sampel ekstrak ditambahkan 150 µL larutan DPPH 125 µM ke dalam *microplate* dan dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 30 menit dalam ruang gelap lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm. Kurva standard dibuat menggunakan larutan Vit C dengan konsentrasi 0; 25; 50; 75; 100; 150; µM. Sebagai blanko digunakan etanol sebagai pelarut. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam µmol Vit C /g serbuk sampel (Adekola *et al*., 2017).

* 1. Metode CUPRAC

Sebanyak 40 µL sampel ekstrak ditambahkan 50 µL CuCl2 10 mM, 50 µL neokuproin etanolik 7,5 mM, dan 60 µL NH4CH3COO 1 M (pH 7). Campuran dihomogenkan dan dipindahkan ke dalam *microplate*, lalu diinkubasi selama 1 jam. Absorbans diukur pada panjang gelombang 450 nm. Kurva standard dibuat menggunakan larutan Vit C dengan konsentrasi 10; 50; 90; 130; 170; 210; 250 µM. Sebagai blanko digunakan campuran tanpa ekstrak. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam µmol Vit C /g serbuk sampel (Apak *et al*., 2007).

* 1. Metode FRAP

Pereaksi FRAP dibuat dengan mencampuran buffer asetat 300 mM pH 3,6; TPTZ 10 mM dalam HCl 40 mM; dan FeCl3.6H2O 20 mM dengan perbandingan 10:1:1. Sebanyak 20 µL sampel ekstrak dan 180 µL pereaksi FRAP dihomogenkan dalam *microplate* dan didiamkan selama 30 menit. Absorbans diukur pada panjang gelomban 593 nm. Kurva standard dibuat menggunakan larutan Vit C konsentrasi 10; 50; 70; 110; 150 µM. Aktivitas antioksidan ekstrak dinyatakan dalam µmol Vit C /g serbuk sampel (Bolanos de la Torre *et al*., 2015).

## Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT

* + - * 1. Penyiapan Larva udang *A. salina Leach.*

Telur A. salina Leach ditimbang sebanyak 10 mg kemudian direndam dalam suatu wadah khusus yang diisi dengan 250 mL air laut untuk penetasan dan diberikan penerangan serta diaerasi selama 48 jam. Lampu dalam penerangan ini berfungsi sebagai sumber cahaya dan diberi aerator untuk menyuplai oksigen dan menjaga agar telur yang didapat tidak mengendap.

* + - * 1. Penyiapan Larutan Uji

Ekstrak sampel yang akan diuji ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan sampai 10 mL dengan air laut sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 2000 ppm sebagai larutan stok, selanjutnya dibuat pengenceran menjadi 1000 ppm, 100 ppm, dan 10 ppm.

* + - * 1. Pelaksanaan Uji

Masing-masing konsentrasi ekstrak sampel dimasukkan kedalam vial berisi 1000 µl air laut. Kemudian tiap konsentrasi larutan dimasukkan 10 ekor larva udang A. Salina Leach berumur 48 jam yang sehat atau bergerak aktif. Pengamatan dilakukan selama 1x24 jam pada suhu kamar terhadap kematian larva udang. Efek toksisitas dianalisis dari pengamatan persen kematian larva yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus : (Priyanto, 2009)

% Mortalitas :

## Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Menggunakan GC-MS

Gas pembawa berupa helium pada laju aliran konstan 1mL/menit. Volume diinjeksikan sebanyak 1µL dengan rasio *split* 20:1. Suhu oven diatur dengan suhu awal 70°C lalu ditingkatkan menjadi 290°C dengan kecepatan 10°C/menit, suhu maksimal diatur pada 325°C. total waktu yang dibutuhkan untuk menjalankan proses kromatografi gas yaitu 35 menit. Detektor spektrofotometri massa dioperasikan dengan pemindaian 35-600 m/z dan menghabiskan waktu selama 35 menit. Hasil dari GC-MS berupa kromatogram dan spectrum massa yang kemudian diidentifikasi menggunakan pustaka *software* WILLEY09TH

**BAB IV**

# HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun ketapang *(Terminalia Catappa. L)* yang digunakan pada penelitian ini diambil pada bulan Oktober 2022 diperoleh dari pinggir jalan perumahan Griya Alam Sentul kecamatan Babakan Madang Kabupaten Bogor. Daun ketapang mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, triterpenoid dan tanin sehingga berpotensi sebagai antioksidan alami dan mempunyai sifat toksik tinggi. Daun ketapang diekstrak dengan pelarut methanol dan difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksan, dan etil asetat, kemudian ditentukan uji aktivitas. Aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH, CUPRAC, dan FRAP. Hasil dari pelarut tertinggi di uji sitotoksik menggunakan metode (*Brine Shrimp Lethality Test*) BSLT metode ini yaitu skrining awal dalam upaya pencarian senyawa antikanker dan di lanjutkan dengan mengidentifikasi senyawa aktif menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS).

# Kadar Air

Daun ketapang yang sudah dihaluskan menjadi simplisia selanjutnya akan dilakukan penetapan kadar air. Kadar air merupakan parameter untuk menetapkan residu air setelah proses pengeringan. Pada pengujian ini kadar air simplisia daun ketapang menggunakan metode gravimetri karena caranya yang sederhana. Dalam pengujian ini digunakan untuk mengetahui kadar air simplisia daun ketapang dengan memanaskan simplisia hingga suhu 105°C. Penggunaan suhu 105°C dipilih karena air menguap pada suhu 100°C, dengan suhu 105°C maka kandungan air dalam sel sebagian besar sudah menguap. Sebelum ditimbang simplisia didinginkan menggunakan desikator karena suhu yang tinggi benda akan memuai, maka dapat mempengaruhi bobot benda (Sudarmadji dkk, 2007). Kadar air simplisia ditentukan sebanyak tiga kali ulangan.

Menurut literatur, kadar air yang ditetapkan untuk menjaga mutu simplisia adalah <10%, karena untuk menghindari cepatnya pertumbuhan jamur dalam esktrak (Winangsih., 2013). Hasil yang didapat pada uji kadar air simplisia daun ketapang adalah 6,77%, maka dari itu kadar air pada daun ketapang sudah memenuhi persyatan mutu.

# Ekstrak Daun Ketapang

Tahap awal ekstraksi yaitu dengan mengumpulkan sampel Daun ketapang yang sudah di cuci hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada daun, daun selanjutnya dipotong kecil-kecil dan di pisahkan pada tulang daunnya. Kemudian di lanjutkan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 50°C supaya kadar air terkandung dalam daun berkurang, pengeringan dilakukan untuk mencegah tumbuhnya jamur atau bakteri yang dapat merusak simplisia. Daun yang sudah dikeringkan kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga halus dan diayak, hal ini dilakukan agar memperluas permukaan sehingga pelarut agar lebih mudah mengekstrak dan menarik kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun ketapang lebih maksimal.

Proses ekstraksi simplisia daun ketapang dilakukan dengan menggunakan metode maserasi dengan cara mengekstraksi langsung simplisia daun menggunakan pelarut methanol 96%. Methanol merupakan pelarut yang bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar sehingga sangat baik untuk mengekstraksi kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan. Adanya gugus hidroksil pada struktur membuat methanol mampu menarik semua komponen polar, sedangkan adanya gugus metil membuat methanol mampu menarik semua komponen nonpolar yang terkandung dalam daun ketapang. Maserasi dipilih karena proses pengerjaan yang mudah dan pelaratan yang cukup sederhana. Pada maserasi ini, digunakan simplisia daun ketapang sebanyak 343,0145 gram dan direndam dengan pelarut methanol hingga terendam, dilakukan pada suhu ruang agar tidak merusak senyawa dalam ekstrak tersebut selama 3x24 jam. Selama ekstrak dilakukan beberapa kali pengadukan agar sampel dengan pelarut merata. Maserat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-55oC hingga diperoleh ekstrak kasar berwarna hijau kehitaman, lalu ditimbang untuk mendapatkan nilai rendemen. Hasil ekstrak kental yang diperoleh yaitu sebesar 58,33 gram dengan rendemen sebesar 17%.

# Fraksinasi

Ekstrak kental hasil dari maserasi, selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan metode partisi cair-cair. Partisi dilakukan secara bertingkat, tujuannya untuk menghemat pelarut dan lebih memaksimalkan pemisahan. Ekstrak kental dipartisi menggunakan 2 pelarut yaitu, *n*-heksan dan etil asetat yang dilakukan secara berurutan sesuai dengan tingkat kepolarannya. Tujuannya agar senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terikat pada sampel dapat terekstrak ke dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya tersebut. Proses partisi dilakukann sampai filtrate yang didapat berwarna bening yang menandakan bahwa ekstrak sudah habis, partisi dilakukan dengan 3 kali pengulangan.

Hasil dari proses partisi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu yang berbeda-beda sesuai dengan setiap pelarutnya, sehingga mendapatkan ekstrak kental dari setiap fraksi. Diperoleh ekstrak kental fraksi *n*-heksan sebesar 1,9518 gram dan fraksi etil asetat sebesar 3,1342 gram. Hasil rendemen fraksi diperoleh dari pembagian bobot fraksi dengan bobot ekstrak yang digunakan sebanyak 30 gram dengan 3 kali pengulangan.

* 1. **Aktivitas Antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan dalam suatu tanaman sangat penting dilakukan untuk mengetahui tanaman tersebut terbukti memiliki aktivitas pengikat terhadap radikal bebas. Tanaman yang digunakan pada penelitian ini yaitu Daun ketapang, salah satu manfaat dari daun ketapang yaitu aktivitas antioksidan yang ditentukan dengan menggunakan tiga metode, yaitu metode DPPH, CUPRAC dan FRAP dengan menggunakan alat spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang maksimum dari masing-masing metode.

Pada penelitian ini digunakan Vitamin C sebagai control positif, karena vitamin C mewakili antioksidan sintetik yang mampu menangkal berbagai penyakit, sehingga termasuk golongan vitamin yang dapat menentukan seberapa tinggi potensi antioksidan. Vitamin C digunakan pembanding karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Vitamin C juga sebagai zat pereduksi potensial karena memiliki kemampuan untuk mereduksi banyak senyawa.

Metode aktivitas antioksidan yang digunakan memiliki perbedaan mekanisme dan prinsip kerja. Metode pertama yaitu DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryhidrazyl*) merupakan radikal bebas yang bersifat stabil pada suhu kamar dengan panjang gelombang 515-517 nm. Salah satu senyawa bioaktif yang dapat diisolasi dan bersifat antioksidan adalah flavonoid, karena flavonoid akan menangkap radikal bebas DPPH dan mengoksidasi flavonoid. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat, mudah dan akurat. Prinsip metode DPPH terlihat pada perubahan warna DPPH dalam larutan dari warna ungu menjadi kuning, karena sampel yang mengandung antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas. Pengukuran antioksidan ditandai perubahan warna setelah inkubasi. Proses inkubasi selama 30 menit, tujuannya untuk mempercepat reaksi antara radikal DPPH dengan sampel. Perubahan warna dilihat secara kualitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan dinilai absorbansinya. Absorbansi terbaik untuk larutan DPPH yaitu kurang dari satu..

Metode Cuprac (*cupric reducing antioxidant capacity*) memiliki keuntungan yaitu metode yang sederhana, cukup selektif, stabil serta dapat mengukur kemampuan senyawa fenol dalam sampel. Pereaksi Cuprac merupakan pereaksi yang sangat selektif karena memiliki potensial yang rendah sebesar 0,34 V. pereaksi Cu(Nc)22+ yang berwarna biru akan mengalami reduksi menjadi Cu(Nc)2+ yang berwarna kuning. Reagen Cu(II)-neukuproin (Cu(II)-(Nc)2) digunakan sebagai agen kromogenik karena mereduksi ion Cu(II). NH4CH3COO dengan pH 7 berfungsi memberikan kondisi pH stabil pada larutan. Karena (Cu(Nc)22+) dapat bekerja pada pH tersebut (Apak, *et al.,* 2007)

Metode FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) memiliki keuntungan yaitu memberikan hasil yang cepat serta menunjukkan antioksidan dalam kompleks matriks. Metode frap didasarkan pada reduksi kompleks besi (II) triptidiltriazin (Fe3+-TPTZ) yang akan direduksi menjadi Fe2+-TPTZ yang berwarna biru. Kompleks Fe3+-TPTZ terbentuk dengan penambahan FeCl3.6H2O dan TPTZ pada pembuatan reagen. Daya reduksi akan berbanding lurus dengan terbentuknya Fe2+. Maka semakin banyak Fe2+ maka warna Fe2+-TPTZ akan semakin pekat dan antioksidannya tinggi. Kompleks akan lebih stabil dalam pH asam, maka ditambahkan buffer asetat pada pH 3,6 untuk memudahkan proses reduksi Fe3+ oleh agen antioksidan.

Tabel 4 Kadar Antioksidan Ekstrak dan Fraksi daun Ketapang Metode DPPH, CUPRAC, dan FRAP

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Pelarut** | **DPPH**  **AAE**  **(*µg* /mg ekstrak)** | **CUPRAC**  **AAE**  **(*µg*/mg ekstrak)** | **FRAP**  **AAE**  **(*µg*/mg ekstrak)** |
| Methanol | 18,2855 ± 0,34 | 302,7199 ± 2,17 | 180,4672 ± 1,68 |
| *n*-Heksan | 10,6941 ± 2,40 | 165,3414 ± 3,97 | 89,4067 ± 2,77 |
| Etil Asetat | 13,6328 ± 0,26 | 212,3671 ± 16,78 | 126,3181 ± 3,23 |

Dapat dilihat dari tabel diatas dan ketiga metode yang digunakan, didapatkan hasil aktivitas antioksidan tertinggi dengan menggunakan metode CUPRAC dibandingkan dengan metode lainnya. Pada metode DPPH menunjukkan nilai kapasitas antioksidan yang kecil dibandingkan dengan metode CUPRAC dan FRAP. Karena pada DPPH memiliki kemampuan penangkal radikal bebas umum merupakan pendonor atom hydrogen (H) tersebut ditangkap oleh radikal DPPH (Hidrazil) untuk berubah menjadi bentuk netral, maka bersifat stabil dalam bentuk radikal bebas.

Metode CUPRAC dan FRAP memiliki nilai aktivitas antioksidan yang cukup kuat, karena pada metode CUPRAC pengukurannya pada pH 7, yang merupakan pH fisiologis. Metode CUPRAC yang berdasarkan reduksi Cu2+ menjadi Cu+ juga memiliki potensial reduksi yang rendah (0,34 V). Pengukuran aktivitas antioksidan pada metode FRAP mampu berjalan dengan akurat apabila senyawa antiokisdan dapat mereduksi Fe(II)-TPTZ pada kondisi reaksi secara termodinamika dan memiliki laju reaksi yang cepat. Sehingga antioksidan yang teroksidasi dan semua produk reaksi sekundernya harus memiliki serapan maksimum pada absorbansi serapan Fe(III)-TPTZ (Apak *et al.,* 2007) dapat diasumsikan bahwa ekstrak yang diperoleh tidak memiliki senyawa antioksidan yang dapat mereduksi Fe(III)-TPTZ pada kondisi reaksi secara termodinamika dan memiliki laju reaksi yang cukup cepat, potensi reduksi Fe3+ menjadi Fe2+ (0,77 V) sehingga selektif sebab kemungkinan besar berpengaruh potensial gula dan asam nitrat tidak terdeteksi (Choirunnisa *et al.,* 2016)

Ketiga metode yang digunakan pada penelitian kali ini memiliki kelebihan dan kekurangan yang berbeda. Kelebihan metode DPPH yaitu cukup sederhana, cepat, mudah, dan sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi yang kecil, kekurangan pada metode DPPH yaitu seperti reagen yang digunakan hanya dapat larut pada pelarut organic untuk mendapatkan hasil pengukuran yang tinggi. Kemudian kelebihan pada metode CUPRAC memiliki kelebihan dengan metode pengukuran antioksidan yang lainnya yaitu reagen CUPRAC cukup cepat untuk mengoksidasi tiap jenis antioksidan. Reagen CUPRAC lebih stabil dan dapat diakses dari reagen kromogenik lainnya (Maryam., 2016). Metode CUPRAC mempunyai kemampuan secara simultan uji antioksidan hidrofilik dan lipofilik, metode yang sederhana, mudah diaplikasikan pada instrument dan keterulangan uji cukup baik (Wahyuni., 2015). Selanjutnya kelebihan pada metode FRAP metodenya murah, reagen mudah disiapkan dan cukup sederhana, dan cepat. Metode ini dapat menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe3+ menjadi Fe2+, kekurangannya yaitu tidak dapat bereaksi cepat dengan beberapa antioksidan dan kurang spesifik. Pada penilitian sebelumnya Tasneem & Narsegowda (2019) ekstrak methanol daun ketapang menunjukkan hasil aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC50 sebesar 3,54-5,52 µg/mL.

# Toksisitas Metode BLST

Menurut Wyllie (2010) Sitotoksik adalah kematian sel oleh komponen-komponen kimia atau mediator sel, untuk mengetahui senyawa antikanker. Uji sitotoksik menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp* *Lethality Test*) terhadap larva udang *Artemia salina Leach* dengan menghitung nilai LC50.

Pengujian menggunakan *Artemia Salina Leach* ini adalah uji pendahuluan antikanker dengan biaya yang cukup murah, sederhana, dan proses pengerjaan yang cepat, karena beberapa penelitian yang menghambat pertumbuhan sel kanker memerlukan biaya yang besar. Sehingga dalam pengujian menggunakan larva udang *Artemia salina Leach* ini mendapatkan hasil yang cukup baik, maka dapat dilakukan pengujian lebih lanjut.

Penggunaan larva udang sebagai hewan uji ketoksikan disebabkan karena ukurannya yang sangat kecil sehingga tidak membutuhkan sampel yang banyak dan tidak sulit dalam penanganan. Larva *Artemia salina Leach* diuji pada saat berumur 48 jam karena dapat mengalami pertumbuhan sel abnormal dan organ-organ pada Artemia salina telah terbentuk dengan sempurna dan lengkap seperti mulut dan saluran pencernaan (Rani *et al.,* 2022).

Uji toksisitas dilakukan terhadap Ekstrak Methanol yang sebelumnya sudah dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan nilai aktivitas antioksidan tertinggi. Esktrak methanol yang telah dipekatkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak dibuat larutan uji dengan beberapa konsentrasi dari larutan induk 10.000 ppm, dengan konsentrasi 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Selanjutnya botol vial yang berisi larutan uji dikeringkan pada suhu kamar sampai semua pelarut menguap selama 24 jam, pada esktrak methanol membutuhkan waktu 3 hari untuk menguapkan pelarutnya. Hal ini bertujuan agar kematian larva tidak dipengaruhi oleh pelarut. Adapun control dibuat 3 yaitu kontrol media (DMSO tanpa ekstrak), control pelarut (methanol) dan kontrol air laut, hal ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh penggunaan DMSO.

Setelah pelarut menguap dan kering ditambahkan 100 µL DMSO (dimetil sulfoksida), sedikit air laut sampai volume 10 mL. pelarut esktrak dengan air laut sering menimbulkan masalah karena adanya perbedaan tingkat kepolaran, ekstrak sukar air laut sehingga digunakan DMSO untuk membantu melarutkannya. DMSO digunakan sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik (larut dalam pelarut polar dan hidrofibik (larut dalam pelarut non polar).

Ekstrak yang sudah larut dengan air laut dalam botol vial 10 mL. kemudian ditambahkan dengan 10 ekor larva *Artemia salina*. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian *Artemia salina* (Kristanti, *et al.,* 2006). Tingkat kematian atau mortalitas (%) diperoleh dengan membandingkan jumlah larva mati dibagi dengan total larva. Nilai LC50 diperoleh dari penentuan nilai probit, yaitu mengkonversi nilai prosen kematian dengan tabel probit. Hasil tersebut kemudian dianalisis probit menggunakan SPSS dan disajikan dalam bentuk mortalitas. Hasil pengujian ekstrak methanol pada daun ketapang dengan metode BSLT ditunjukan pada **Lampiran 6.** Dengan nilai LC50 sebesar 410.961 ppm.

Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Alfin dan Wira (2018) melaporkan bahwa ekstrak methanol daun ketapang bersifat sangat toksik dengan nilai LC50 sebesar 56 ppm. Ekstrak methanol bersifat toksik terhadap terhadap *Artemia salina* karena memiliki nilai LC50 < 1000 ppm yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji (Meyer, *et al.,* 1982). menyatakan bahwa senyawa bioaktif hampir selalu toksik pada konsentrasi tinggi. Daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktifitas dan untuk memonitor fraksi bioaktif selama fraksinasi dan pemurnian. Salah satu organisme yang berguna untuk hewan uji tersebut adalah *Brine Shrimp* (Larva udang).

# Identifikasi Senyawa Aktif dengan GC-MS

Analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) bertujuan untuk mengidentifikasi rumus molekul dan struktur senyawa aktif dalam ekstrak yang berperan dalam antioksidan dan sitotoksik. GC-MS merupakan gabungan dari dua teknik mikroanalitik yang kuat. GC berfungsi untuk memisahkan komponen campuran dan MS berfungsi memberikan informasi yang membantu dalam identifikasi senyawa (Sparkman et al., 2011). Uji GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*) dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa berdasarkan berat molekulnya. Sampel ekstrak methanol diidentifikasi terlebih dahulu menggunakan GC (*Gas Chromatography*) kemudian dilanjut dengan alat MS (*Mass Spektrometry*).

Hasil GC-MS berupa kromatogram dan spektrum massa. Hasil tersebut dicocokan dengan data *library* yang ada pada computer, sehingga dapat diketahui kompenen senyawa yang teridentifikasi pada ekstrak methanol daun ketapang. Hasil analisis ekstrak methanol menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa ekstrak methanol mengandung senyawa paling banyak adalah asam amino dan ada beberapa senyawa major dari golongan flavonoid, sehingga memperoleh sebanyak 23 senyawa.

Tabel 5 Hasil Identifikasi Senyawa GC-MS

| **No** | **Retention time** | **m/z** | **Senyawa** | **Stuktur** | **Golongan** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 3.151 | 102 | *Epicatechin* (C15H14O6) |  | Flavonoid |
| 2 | 3.741 | 96 | *2-furanmetanol* (C5H6O2) |  | Heteroaromatik |
| 3 | 4.151 | 103 | *Pantothenic acid* (C9H17NO5) |  | Asam pentatonat |
| 4 | 5.471 | 114 | *2’-deoxyinosine* (C10H12N4O4) |  | Asam nukleat |
| 5 | 5.663 | 128 | *2’-acetaminaflavanone* (C17H15O3) |  | Flavonoid |
| 6 | 6.035 | 126 | *Epigallocatechin gallate* (C22H18O11) |  | Flavonoid |
| 7 | 6.612 | 144 | *2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4* (C7H10O4) |  | Senyawa aromatic |
| 8 | 7.035 | 142 | *2-isopropylmalic acid* (C7H12O5) |  | Asam lemak |
| 9 | 7.419 | 97 | *16-hydroxyhexadecanoic acid* (C16H32O3) |  | Asam lemak |
| 10 | 7.957 | 110 | *1,3-benzenediol* (C16H32O3) |  | Benzene |
| 11 | 8.163 | 124 | *3’choloflavonol* (C15H9CIO3) |  | Flavonoid |
| 12 | 8.816 | 136 | *ɑ-muurolene* (C15H24) |  | Seskuiterpene |
| 13 | 9.431 | 129 | *ɑ-ketoglutaric acid* (C5H6O5) |  | Asam glutarat |
| 14 | 9.872 | 73 | *ɑ-D-Glucopyranoside* (C12H22O11) |  | Glukosa |
| 15 | 10.367 | 116 | *l-sirine,O-(penymetyl)* (C3H7NO3) |  | Asam amino |
| 16 | 10.649 | 129 | *2,6-Diaminopirine* (C5H5N6) |  | Purin |
| 17 | 10.892 | 84 | *Piperidine* (C5H11N) |  | Heterosiklik |
| 18 | 12.969 | 82 | *Acetamide* (C5H5) |  | Asam amino |
| 19 | 13.725 | 83 | *Thiosulfuric acid* (H2S2O3) |  | Asam amino |
| 20 | 14.792 | 129 | *9,12,15-octadecatrienoic acid* (C18H30O3) |  | Asam lemak |
| 21 | 15.891 | 147 | *3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid* (C7H9NO2) |  | Asam amino |
| 22 | 16.673 | 281 | *7-hydroxyflavone* (C15H10O3) |  | Flavonoid |
| 23 | 17.544 | 207 | *Uric acid* (C5H5N4O3) |  | Purin heterosiklik |

Senyawa yang teridentifikasi pada ekstrak methanol sebanyak 23 senyawa dengan waktu retensi yang berbeda-beda. Senyawa yang berpotensi sebagai antikanker yaitu senyawa *epicatechin* termasuk pada golongan senyawa polifenol menurut penelitian Yoon *et al.,* 2012 terbukti bersifat toksik dan mampu menghambat kanker prostat proliferasi sel, berpotensi dengan menekan aktivasi reseptor androgen yang bergantung pada agonis dan transkipsi gen yang diatur oleh reseptor androgen.

Selanjutnya yaitu pada senyawa *Epigallocetachin gallate* yang paling melimpah pada tumbuhan, dan implikasinya dalam perawatan kesehatan dan pecegahan terhadap penyakit kanker salah satunya yaitu pada penelitian (chen, *et al.,* 2016) *Epigallocetachin gallate* menunjukkan potensi menghambat proliferasi sel karsinoma, mendorong apoptosis dan secara efisien menekan migrasi dan invasi karsinoma sel ginjal. Selain itu, pengobatan *Epigallocetachin gallate* menyebabkan penurunan regulasi metalloproteinase-2 dan metalloproteinase-9 pada sel karsinoma sel ginjal, dan efek antikanker yang terkait dengan *Epigallocationchin gallate* mungkin melibatkan penurunan regulasi matriks metalloproteinase-2 dan metalloproteinase-9. *Epigallocetachin* dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antikanker. Bukti praklinis dan klinis di jelaskan bahwa *epigallocetachin gallate* memainkan peran penting dalam penghambatan dan pencegahan kanker. Perkembangan kanker adalah proses multilangkah dan sel-sel normal diubah ke tahap metastasis melalui karsinogenesis, agen kemopreventif telah terbukti meningkatkan aktivitas antikanker dan memiliki aktivitas sitotoksik.

Pada senyawa *piperidine* dengan golongan heterosiklik. *Piperidine* bertindak sebagai agen klinis yang potensial melawan kanker, seperti kanker payudara, kanker prostat, kanker usus besar, dan kanker ovarium. Bila diobati sendiri atau dikombinasikan dengan beberapa obat baru. Menurut penelitian Arun *et al.,* (2018), *piperidine* memiliki efek toksisitas sebagai agen klinis dan mekanisme kerjanya melawan berbagai jenis kanker efek antikanker payudara.

Selanjutnya yaitu senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan, menurut penelitian (Xiangying, 2013) bahwa ekstrak metanol pada senyawa *2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4* merupakan senyawa antioksidan yang kuat pada tumbuhan. Kemudian pada senyawa *ɑ-ketoglutaric acid* pada metabolit penting dari setiap organisme dan memainkan peran dalam berbagai system biologis, tidak hanya sebagai metabolit sentral, tetapi *ɑ-ketoglutaric acid* penting dan melakukan banyak fungsi, termasuk metabolisme energi, pertahanan antioksidan, transduksi sinyal, dan regulasi genetic (Hel *et al.,* 2018)

# BAB V

# KESIMPULAN DAN SARAN

* 1. **Kesimpulan**

1. Ekstrak methanol, daun ketapang memberikan aktivitas antioksidan paling tinggi dengan menggunakan metode DPPH, CUPRAC dan FRAP dengan kadar masing-masing 18,2855; 302,7199; dan 180,4672 µg AAE/mg ekstrak.
2. Hasil Uji BSLT analisis probit menunjukkan ekstrak methanol memiliki nilai LC50 yaitu 410,96 ppm yang termasuk kategori toksik.
3. Terdapat 23 senyawa berdasarkan uji GC-MS pada ekstrak methanol daun ketapang, terdapat 5 senyawa termasuk golongan metabolit sekunder yaitu *epicatechin, 2’acetaminoflavanone, Epigallocatechin gallate, 3’choloflavonol, 7-hydroxyflavone*.
   1. **Saran**

Perlu penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas antikanker dan identifikasi serta isolasi kandungan senyawa, pada masing-masing ekstrak, sehingga akan diketahui senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker

# DAFTAR PUSTAKA

Adekola KA, AB. Salleh, UH. Zaidan, A. Azlan, E.Chiavaro, M. Paciulli, JMN. Marikkar. 2010. Total phenolic content, antioxidative and antidiabetic properties of coconut (Cocos nucifera L.) testa and selected bean seed coats. Ital. J. Food. Sci. 29: 741-753

Ahmed, B. 2007. *Chemistry of Natural Product.* New Delhi: Department of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard.

Ahmed, S. M., Vrushabendra S. B. M., Gopkumar P. R. D. And Chandrashekara V. M. 2005. Anti-Diabetic Activity of Terminalia Catappa Linn. Leaf Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapheutics*. 4(1)

Alfin. S., dan Wira. B. D., 2018. Toksisitas Metanol Daun Ketapang (terminalia catappa) terhadap Larva Artemia Salina Leach menggunakan Metode BLST. 6(2)

Alia A. Gani., Mukarlina., Elvi R., P. W. 2017. Profil GC-MS dan Potensi Bio herbisida Ekstrak Metanol Daun Ketapang (*Termanilia catappa L*.) terhadap Gulma Maman Ungu (*Cleome rutidosperma D.C*.). 6(2) : 22-28

Al-Rubaye, A. F., I. H. Hameed, dan Moh. J. Kadhim. 2017. A Review: Uses Of Gas Chromagraphy-Mass Spectrometry (GC-MS) Techique for Analysis of Bioactive Natural Compound of some Plant. *Intenational Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 9(1): 62-69.

Amarowicz, R., Naczk, M., & Shahidi, F. (2000). Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2755–2759. https://doi.org/10.1021/jf9911601

Amic D, Dusanka DA, Beslo D, Trinasjtic.2003. Structure-radikal scavengingactivity relationship of flavonoids.Crotia Chem Acta 76:55-61.

Anand, A. V. Divya, N. dan Kotti, P. P. 2015. An updated review of Terminalia catappa. Pharmacognosy Reviews. 9(18): 93–98.

Anderson, J. E., J. L. McLaughlin, and L.L. Rogers. 1998. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. 32: 513-524.

Anonim. 2012. Mengetahui Radikal Bebas dan Tipsnya, http://mrsupel.blogspot.com/2012/06/mengetahui-radikal-bebas-dan-tipsnya.html , diakses tanggal 3 Oktober 2012

AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists.* Benjamin Franklin Station, Washington

Apak R, K. Güçlü, B. Demirata, M. Ȍzyürek, S.E. Celik, B. Bektaşoğlu, K.I. Berker, D. Ȍzyürt. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied ti phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules. 12: 1496-1547

Arun, A., Ansari, M. I., Popli, P., Jaiswal, S., Mishra, A. K., Dwivedi, A., et al. (2018). New Piperidine Derivative DTPEP Acts as Dual-Acting Antibreast Cancer Agent by Targeting ERα and Downregulating PI3K/AktPkcα Leading to Caspase-dependent Apoptosis. Cell Prolif 51 (6), e12501. doi:10.1111/cpr.125

Barinta, W. Nur, K. dan Nunung, S. (2016) Efek Sitotoksik Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*.) Padas el Kanker Payudara T47D. Vol 2 (6) : 68-71.

Bolanos de la Torre AAS, T. Henderson, PS. Nigam, RK. Owusu-Apenten. 2015. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for food and applications to Manuka honey. Food Chemistry. 174: 119-123. Dx.doi.org/10.1016/\_foodchem.2014.11.009.

Casez, Jack. 2001. *Encyclopedia of Chromatography*. New York : Marcell Dakker Inc.

Chen, S.-J.; Yao, X.-D.; Peng, B.; Xu, Y.-F.; Wang, G.-C.; Huang, J.; Liu, M.; Zheng, J. Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration and invasion of human renal carcinoma cells by downregulating matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. Exp. Ther. Med. 2016, 11, 1243–1248

Chen, S.-J.; Yao, X.-D.; Peng, B.; Xu, Y.-F.; Wang, G.-C.; Huang, J.; Liu, M.; Zheng, J. Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration and invasion of human renal carcinoma cells by downregulating matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. Exp. Ther. Med. 2016, 11, 1243–1248

Choirunnisa AR, I. Firdianny, K. Ruslan. 2016. Comparison of five antioxidant assays for estimating antioxidant capacity from three Solanum Sp. Extracts. 9(2): 123-128

Chyau CC, Ko PT, Mau JL (2006) Sifat antioksidan ekstrak air dari daun Terminalia catappa. LWT - Teknologi Ilmu Pangan 39: 1099-1108.

Cowan, M., 1999. Plant Product as Antimicrobial. Clinical Microbiology Reviews. 12(4) : 564-582

Darlimarth, S., Soediyo., 1999, *Awet Muda Dengan Tumbuhan Obat dan Diet Suplemen,* Trubus Agriwidya, semarang. 1-8

Darmapatni, K. A. G., A. Basori, dan N. M. Suantiti. 2016. Pengembangan Metode GC-MS Untuk Penetapan Kadar Acetaminophrn Pada Spesimen Rambut Manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 3(18): 62-69

Dash, BK., S, Sultana., N, Sultana., 2011. Antibacterial Activities of Methanol and Acetone Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum). Life Sciences and Medicine Research,* 2011: LSMR-27

Dewi Pramesti, Anisa Rahmawati Putri, Siti Harnina Bintari3, Ibnul Mubarok (2022) Uji Efektivitas Ekstrak Buah Ketapang (Terminalia catappa) terhadap Bakteri Escherichia coli dan Bacillus subtilis 11 (1) : 2022

Djajanegara, L., & Prio Wahyudi, 2009, Pemakaian Sel Hela dalam Uji sitotoksisitas Fraksi Kloroform dan Etanol Ekstraksi Daun Annona squamosal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, hal 7-11, 1693-1831.

Dominika Istarina, Siti Khotimah, M. T. (2015). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Buah Ketapang (Terminalia catappa Linn.) terhadap Pertumbuhan Staphylococcus epidermidis dan Salmonella typhi. *Jurnal Protobiont*, 4(3), 98–102.

Droge W. 2002. Free Radicals In The Physcological Of Cell Fungstion. Physiol. Rev 82: 47–95

Fan YM, Xu LZ, Gao J, Wang Y, Tang XH, et al. (2004) Phytochemical and antiinflammatory studies on Terminalia catappa. Fitoterapia 75: 253-260

Fogler. (1992). *Element of Chemical Reaction Engginering*, Edisi 2. New York: Prentice-Hall International Inc.

Gandjar I. G. dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.

Gao dkk, 2004. Hepatoprotective Activity of Terminalia Catappa L. Leaves and its Two Triterpenoids. Journal Pharmacy and Pharmacology. 56: 1449- 1455.

Georgakilas AG. 2012. Cancer Prevention-From Mechanisms to Translational Benefits. Rijeka: INTECH

Harborne, J. B., 1987. Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro, 4-7 : 69-76. ITB Bandung

Harborne, J.B, 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan. Edisi II. Bandung : ITB

He L, Wu J, Tang W, Zhou X, Lin Q, Luo F, Yin Y and Li T: Prevention of oxidative stress by alpha‑ketoglutarate via activa‑ tion of CAR signaling and modulation of the expression of key antioxidant‑associated targets in vivo and in vitro. J Agric Food Chem 66: 11273‑11283, 2018

HeL, Wu J, Tang W, Zhou X, Lin Q, Luo F, Yin Y and Li T: Prevention of oxidative stress by alpha‑ketoglutarate via activa‑ tion of CAR signaling and modulation of the expression of key antioxidant‑associated targets in vivo and in vitro. J Agric Food Chem 66: 11273‑11283, 2018

Hikmah, F. dinul. Pengaruh partisi bertingkat cair-cair ekstrak etanol rimpang jahe (Zingiber officinale Rosc.) terhadap profil kandungan senyawa kimia dan aktivitas antiradikalnya. Pengaruh Partisi Bertingkat Cair-Cair Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (Zingiber Officinale Rosc.) Terhadap Profil Kandungan Senyawa Kimia Dan Aktivitas Antiradikalnya, 2012; 1–17

Hostettmann, K & Wolfender, J. L., 2004, Applications of Liquid Chromatography/UV/MS and Liquid Chromatography/NMR for the On-line Identification of Plant Metabolites. In : *Bioavtive Compounds from Natural Sources Isolation, Charecterisation and Biological Properties.* Edited by Corrado Tringali, Taylor & Francis Inc. New York, pp. 31-68

Iheagwam, F. N., Israel, E. N., Kayode, K. O., De Campos, O. C., Ogunlana, O. O., & Chinedu, S. N. (2019). GC-MS Analysis and Inhibitory Evaluation of Terminalia catappa Leaf Extracts on Major Enzymes Linked to Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2019*, 14 pages.

Indri Reski Wahyuni, ‘Indri Resi Wahyuni’, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makasar, 2015.

Jia, Luoqi, Hongyan J., Jiayi Z., Lianghua C., Yiling L., Yanling M. and Yinhua Y. 2013. A Potential Anti-tumor Herbal Medicine, Corilagin, Inhibits Ovarian Cancer Cell Growth Trough Blocking the TGF-β Signaling Pathways. BMC Complementary and Alternative Medicine. 13:33

Kinoshita S, Inoue Y, Nakama S, Ichiba T, Aniya Y (2007) Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, Terminalia catappa L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. Phytomedicine 14: 755-762

Kristanti, A. N., Nanik S. A., Mulyadi T., dan Bambang K. 2006. *Buku Ajar Fitokimia. Surabaya : Universitas Airlangga*

Labola, Y.A., & Puspita, D. (2017). ‘Peran Antioksidan Karotenoid Penangkal Radikal Bebas Penyebab Berbagai Penyakit’. Majalah Farmasetika, 2(2)

Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida. USU Repository, 1–25.

Li, Y., Lu, X., Qi, H., Li, X., Xiao, X., Gao, J. 2014. Ursolic Acid Induces Apoptosis Trough Mitochondrial Intrinsic Pathway and Suppression of ERK1/2 MAPK in HeLa cells. J. Pharmacol. Sci. Vol. 125, 202–210

Lin YL, Kuo YH, Shiao MS, Chen CC, Ou JC (2000) Flavonoid glycosides from Terminalia catappa L. J Chin Chem Soc 47: 253-256.

Maharadingga., Ani. P., Desilva, A., (2021) Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Ketapang (Terminalia catappa L.) Pada Hamster Syrian Jantan Hiperglikemia Dan Hiperkolesterolemia Dengan Parameter Pengukuran Kolesterol Total Dan LDL. Vol 2:2.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica, 45(1), 31–34

Molyneux, P, 2004, The Use Of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhidrazyl (DPP) for Estimating Antioxidant Activity, J. Sci. Technol. 26 (2); 211-219.

Murni, Rasidah, Mellani, E., Zakiah, N., & Nasir, M. 2018. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun ketapang (Terminalia catappa l.) warna hijau dan warna merah serta kombinasinya. Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product. 1(2): 8–13.

Pandya, N. B., Tigari, P., Dupadahalli, K., Kamurthy, H., & Nadendla, R. R. (2013). Antitumor and antioxidant status of Terminalia catappa against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Indian Journal of Pharmacology*, *45*(5), 464–469. https://doi.org/10.4103/0253-7613.117754

Pauly, G., 2001, Cosmetic, Dermatological and Pharmaceutical Use of an Extrack of Terminalia Catappa. United State Patent Application no. 20010002265:1-2.

Pfundstein B, El Desouky SK, Hull WE, Haubner R, Erben G, et al. (2010) Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (Terminalia bellerica, Terminalia chebula and Terminalia horrida): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. Phytochemistry 71: 1132-1148.

Priyanto. 2009. Toksikologi: mekanisme, terapi antidotum, dan penilaian resiko. Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi, Jakarta.

Putricia V. T., Johanis J. P., Febby E.F. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (Terminalia catappa L.) TERHADAP BAKTERI Bacillus amyloliquefaciens. l 5:2.

Rahayu, Dwi Sri., Dewi, K., dan Enny, F., 2009. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*) dengan metode *1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil* (DPPH). Universitas Diponegoro.

Ramdhani, R. (2020). Efisiensi Ekstrak Tanin Daun Ketapang (Terminalia Cattapa L) Sebagai Inhibitor Organik Terhadap Laju Korosi Pada Logam Besi Dalam Medium Air Laut. Universitas Sumatra Utara.

Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, dan mamidi S. 2011. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidant. Free Rad. and Antiox. 1(4). https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2

Rao PS, Kalva S, Yerramilli A, dan mamidi S. 2011. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidant. Free Rad. and Antiox. 1(4). https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.2

Rilantono LI. 1992. Pokok-Pokok Pengembangan Penelitian Kardiovaskuler Di Bagian Kardiologi FKUI. Jakarta, Universitas Indonesia, Fakultas Kedokteran.

Rohman, A.; Riyanto S.; Yuniarti N.; Saputra W.R.; Utami R.; Mulatsih W. 2010. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Total Flavaonoid of Extracts and Fractions of Red Fruit (Padanus conoideus Lam). *International Food Research Journal* 17: 97-106

Salimi, Y. K., Kamarudin, J., Ischak I. N., Bialangi N., 2022. Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L.). Jamb. J. Chem. 4(2): 12-21

Silalahi, Aldo dan Soegihardjo. “Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolat Total Fraksi Air Daun Ketapang (Terminalia catappa L.) dengan metode DPPH dan Metode Folin-Ciocelteu”. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunikasi* 9, no. 2 (2006).

Sparkman., O.D., Penton,Z.E. and Kitson,F.G. 2011. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry A Practical Guide*. California : Academic Press Elsevier.

St Maryam and others, ‘DENGAN METODE CUPRIC ION REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makassar’, *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2.1 (2016), 90-93.

Subekti, N.K. 2014. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Laban Abang (Aglaia elliptica Blume) Terhadap Larva Udang (Artemia salina L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.

Sudarmadji, S., Haryono, B., & Suhardi. (2007). *Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty. Yogyakarta

Suryani, N. C., dan Permana, Dewa Gede Mayun Jambe, A. A. G. N. A. 2016. Pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan total flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun matoa (Pometia pinnata). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*. 5: 1–10.

Susanti, E., Kamairullah., & Alfian. 2011. Uji Senyawa Sitotoksitas Dari Tumbuhan Akar PKI (*Mikana micrantha* H. B.K). *e-Publikasi Ilmiah* Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.

Tapan, E., 2005, Kesehatan Keluarga Penyakit Degeneratif, PT Elex Media Komputindo,Jakarta

Tasneem, D.F.M.I. dan Narsegowda, P.N. 2019. Antioxidant activity of different varieties of terminalia catappa. European *Journal of Pharmaceutical and Medical Research.* 6(1): 453–456.

Tasneem, D.F.M.I., dan Narsegowda, P.N. 2018. Antimicrobial activity of different varieties of terminalia catappa leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(10), 4430–4435.

Thomson, L., & Evans, B., 2006. Terminalia cattapa (tropical almond). Species Profiles Pacifis Island, Ver.2.2, 1-20

Venkatalakshmi, P., Vadivel, V., & Brindha, P. (2016). Identification of flavonoids in different parts of terminalia catappa L. Using LC-ESI-MS/MS and investigation of their anticancer effect in EAC cell line model. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *8*(4), 176–183

Winangsih & Prihastanti, E. P. S. (2013) Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (zingiber aromaticum L.) *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 21(1),10-25

Winarsi, Hady. 2007. Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas. Kanisius : Yogyakarta.

Wozniak, Lukasz, Sylwia S. and Krystian M. 2015. Ursolic Acid- A Pentacyclic Triterpenoid a Wide Spectrum of Pharmacological Actvities. *Journal of Molecules*. 20, 20614-20641

Wyllie, A. H. 2010. *Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation 3rd*. Roche Applied Science

Xiangying Yu *et al*. (2013). Identification of 2,3-dihydro3,5-dihydroxy-6-methyl-4Hpyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. Food Res Int. 51(1):397 – 403

Xiangying, Y., Mingyue, Z., Fei L., Shitong, Z.,Jun, H., Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. Int 51 (2013) 397–403

Y.-H. Lee, J.Kwak, H.-K. Choi dkk., “EGCG menekan pertumbuhan sel kanker prostat dengan memodulasi asetilasi reseptor androgen melalui aktivitas anti-histone asetiltransferase,” *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 1, hal. 69–74, 2012

Yoon, H.-G.; Lee, Y.-H.; Kwak, J.; Choi, H.-K.; Choi, K.-C.; Kim, S.; Lee, J.; Jun, W.; Park, H.-J. EGCG suppresses prostate cancer cell growth modulating acetylation of androgen receptor by anti-histone acetyltransferase activity. Int. J. Mol. Med. 2012.

Yuszda. K. S., Jumarni. K., Netty. I. I., dan Nurhayati. B., (2022). Aktivitas Antioksidan Senyawa Metabolit Sekuder Ekstrak Metanol Daun Ketapang (*Terminalia Catappa L*.) 4(2).

# LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian

1. **Diagram Umum Penelitian**

Analisis Data

Uji Sitotoksik Menggunakan BSLT

Simplisia Daun Ketapang

Kadar Air

* Preparasi Sampel

Ekstraksi Metode Maserasi Selama 3x24 Jam

Metanol 70%

Ekstrak Kasar Daun Ketapang

Rendemen

* Dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*

Uji Aktivitas Antioksidan

Mengidentifikasi senyawa aktif dengan GC-MS

Fraksinasi

1. **Skema Kerja Persiapan Sampel Uji**

Daun Ketapang

Disortasi dan Dicuci

Dipotong-potong Dengan Gunting

Dikeringkan menggunakan oven

Dihaluskan Menggunakan Blender

Disaring Menggunakan Ayakan

Serbuk Simplisia Daun Ketapang

1. **Skema Penentuan Kadar Air**

Cawan/Botol timbang

Oven Selama 30 Menit Pada Suhu 105oC

Dinginkan Selama 15 Menit Dalam Desikator

Simplisia Daun ketapang (3 gram)

Masukan kedalam Cawan/Botol timbang

Oven Selama 3 Jam Pada Suhu 105oC

Timbang

Sampai Dicapai Berat Konstan

1. **Ekstraksi sampel**

50 gr Simplisia Daun Ketapang

Ekstraksi Metode Maserasi 3x24 jam

Metanol 70%

Saring Menggunakan Kertas Whatman

-Wadah Tertutup pada Suhu Ruang

Filtrat

Residu

Evaporasi 45-55oC 100 rpm

Timbang dan Hitung Randemennya

Ekstrak Kental

Dibuang

1. **Fraksinasi**

Kocok dan diamkan hingga terbentuk 2 fase

+ 10 gram sampel dilarutkan + 100 mL aquades

+ 100 mL n-heksan

Lapisan aquades

Lakukan beberapa kali hingga lapisan n-heksan jernih

Ambil lapisan n-heksan

Fraksinasi dengan etil-asetat, butanol dan aquades

Hasil fraksinasi (n-heksan : etil-asetat : n-butanol dan aquades) di uapkan dengan rotary evaporator

1. **Analisis antioksidan**

* Metode DPPH

25 µM

1250 µL

1875 µL

2500 µL

3750 µL

Tera dengan etanol 96% hingga volume 10 ml

626 µL

150 µM

50 µM

75 µM

100 µM

Larutan Standar

1,5 mL larutan standar dan esktrak + 4,5 mL DPPH etanolik

Spektrofotometer λ 510 nm

Inkubasi suhu ruang 60 menit keadaan gelap

Larutan Induk I :

2 mg vit c + 10 mL etanol p.a 96%

Larutan Induk II :

500 µL + 500 µL etanol p.a 96%

* Pembuatan Larutan Sampel

215,2 mg ekstrak N-Heksan + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

150,8 mg ekstrak etil asetat + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

110,5 mg ekstrak methanol + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

Dipipet

1,5 ml

1,5 ml larutan uji + 4,5 ml DPPH etanolik

125 µM

Inkubasi suhu ruang selama 30 menit

Spektrofotometer λ

510 nm

* Metode CUPRAC

10 µM

1250µL

1750µL

2750µL

3750µL

Tera dengan etanol 96% hingga volume 10 ml

250µL

170 µL

50 µM

90 µM

130 µM

Larutan Standar

40 µL standard dan ekstrak + 50 µL CuCl2 + 50 µL neukuproin etanolik + 60 µL NH4CH3COO 1 M (pH 7)

Spektrofotometer λ 450 nm

Inkubasi suhu ruang 60 menit keadaan gelap

Larutan Induk :

10 mg + 100 mL etanol p.a 96% (400 µM)

* Pembuatan Sampel

10,4 mg ekstrak methanol + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

10,7 mg ekstrak N-Heksan + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

10,2 mg ekstrak Etil-Asetat+ etanol 96% ke dalam labu 25 ml

Dipipet

40 µL

40 µL larutan standard dan ekstrak + 50 µL CuCl2 + 50 µL neukuproin etanolik + 60 µL NH4CH3COO 1 M (pH 7)

Inkubasi suhu ruang

Spektrofotometer λ

450 nm

* **Metode Frap**

10 µM

1250 µL

1750 µL

2750 µL

3750 µL

Tera dengan etanol 96% hingga volume 10 ml

250 µL

150 µM

50 µM

70 µM

110 µM

Larutan Standar

20 µL larutan standar dan esktrak + 180 µL Reagen FRAP

Spektrofotometer λ 593 nm

Inkubasi suhu ruang 30 menit keadaan gelap

Reagen FRAP : buffer asetat (pH 3,6) + TPTZ 10 mM dalam HCl + FeCl3.6H20 20 mM (50:1:1)

Larutan Induk I :

10 mg + 100 mL etanol p.a 96%

* Pembuatan sampel

15,2 mg ekstrak methanol + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

30 mg ekstrak N-Heksan + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

20,8 mg ekstrak methanol + etanol 96% ke dalam labu 25 ml

Dipipet

20 µL

Eksrak + 180 µL Reagen FRAP

Inkubasi suhu ruang

Spektrofotometer λ

593 nm

1. **Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT**

* Penyiapan Larva Udang A. Salina Leach

10 mg telur Telur A. salina Leach

Di rendam

+ 250 mL air laut

Di aerasi selama 48 jam

* Penyiapan Larutan Uji

20 mg sampel

+ 10 mL air laut

Larutan konsentrasi 2000 ppm

1000 ppm

100 ppm

10 ppm

Diencerkan

* Pelaksanaan Larutan Uji

Masing-masing konsentrasi ekstrak sampel dimasukan kedalam vial yang berisi air laut

+ 10 ekor larva udang berumur 48 jam

Pengamatan dilakukan selama 1x24 jam pada suhu kamar

Lampiran 2 Dokumentasi Penelitian

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **No** | **Perlakuan** | **Gambar** |
| 1. | Pengumpulan sampel dan pengeringan |  |
| 2. | Penghalusan dan pengayakan |  |
| 3. | Uji kadar air |  |
| 4. | Proses penyaringan hasil maserasi dan fraksinasi |  |
| 5. | Proses evaporasi |  |
| 6. | Hasil ekstrak dan fraksi |  |
| 7. | Analisis antioksidan metode DPPH |  |
| 8. | Analisis antioksidan metode CUPRAC |  |
| 9. | Analisis antioksidan metode FRAP |  |

Lampiran 3 Data Hasil Ektraksi

3.1 Uji Kadar Air

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ulangan** | **Cawan 1** | **Cawan 2** | **Cawan 3** |
| Bobot Sampel (W) | 10,0006 | 10,0012 | 10,0011 |
| Bobot cawan kosong (W2) | 38,9127 | 42,3914 | 41,5546 |
| Penimbangan 1 | 48,2457 | 51,7575 | 50,8800 |
| Penimbangan 2 | 48,2918 | 51,8136 | 50,9256 |
| Penimbangan 3 | 48,2225 | 51,7360 | 50,8528 |
| Penimbangan 4 (W1) | 48,2222 | 51,7357 | 50,8525 |
| **Kadar Air %** | **6,91** | **6,56** | **6,84** |

**Perhitungan kadar air :**

Kadar air (%) = x 100%

* Cawan 1 = x 100%

= 6,91 %

* Cawan 2 = x 100%

= 6,57%

* Cawan 3 = x 100%

= 6,84%

* Kadar Air =

= 6,77%

Standar Deviasi (s)

Standar Deviasi

(s) **=** 1,8288

%RSD =

* 1. **Rendemen ekstraksi dan fraksinasi**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Pelarut** | **Berat Ekstrak (gr)** | **Rendemen (%)** |
| Methanol | 58,33 | 17% |
| N-Heksan | 1,9518 | 4,87% |
| Etil-Asetat | 3,1342 | 7,83% |

**Contoh Perhitungan Rendemen**

* Metanol
* N-Heksan
* Etil-Asetat

Lampiran 4 Uji Aktivitas Antioksidan

1. **DPPH**

**Kurva Standar**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Abs Kontrol | Abs Standar | ∆ Absorbansi |
|  | 0.626 | 0.112 |
|  | 0.532 | 0.206 |
| 0.738 | 0.357 | 0.381 |
|  | 0.269 | 0.469 |
|  | 0.161 | 0.577 |
| Abs Kontrol | Abs Standar | ∆ Absorbansi |
|  | 0.635 | 0.103 |
|  | 0.487 | 0.215 |
| 0.738 | 0.412 | 0.326 |
|  | 0.315 | 0.423 |
|  | 0.185 | 0.553 |

|  |  |
| --- | --- |
| Konsentrasi | ∆ Absorbansi |
| 25 | 0.112 |
| 50 | 0.206 |
| 75 | 0.381 |
| 100 | 0.469 |
| 150 | 0.577 |

|  |  |
| --- | --- |
| konsentrasi | ∆ Absorbansi |
| 25 | 0.103 |
| 50 | 0.215 |
| 75 | 0.326 |
| 100 | 0.423 |
| 150 | 0.553 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Ekstrak | Bobot | Volume sampel | Rata-rata absorbansi | Kadar vit C |
| Metanol | 110,5 mg | 25 mL | ∆A1= 0,353  ∆A2= 0,334 | 1. 18,5282  2. 18,0429  X = 18,2855 |
| N-heksan | 215,2 mg | 25 mL | ∆A1= 0,336  ∆A2= 0,431 | 1. 8,9940  2.12,3942  X = 10,6941 |
| Etil-asetat | 150,8 mg | 25 mL | ∆A1= 0,350  ∆A2= 0,347 | 1. 13,4458  2. 13,8198  X= 13,6328 |

**Contoh perhitungan**

y1 = 0,0038x + 0,0418

y2 = 0,0036x + 0,0469

**Ekstrak Metanol**

Diketahui :

∆A1 = 0,353

∆A2 = 0,334

bobot sampel = 110,5 mg

volume sampel = 25 mL

Ditanya : Konsentrasi sampel dan Kadar Vit C?

* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Kadar Vit C = µg/mg
* Kadar Vit C = µg/mg

1. **Cuprac**

**Kurva Standar**

|  |  |
| --- | --- |
| Konsentrasi | Absorbansi |
| 10 | 0.160 |
| 50 | 0.253 |
| 90 | 0.363 |
| 130 | 0.483 |
| 170 | 0.527 |

|  |  |
| --- | --- |
| Konsentrasi | Absorbansi |
| 10 | 0.101 |
| 50 | 0.237 |
| 90 | 0.357 |
| 130 | 0.475 |
| 170 | 0.541 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Ekstrak | Bobot | Volume sampel | Rata-rata absorbansi | Kadar vit C |
| Metanol | 10,4 mg | 25 mL | A1= 0,441  A2= 0,445 | 1. 302,1817  2. 304,3581  X = 302,7199 |
| N-heksan | 10,7 mg | 25 mL | A1= 0,295  A2= 0,299 | 1. 150,6035  2. 173,8983  X = 165,3114 |
| Etil-asetat | 10,2 mg | 25 mL | A1= 0,351  A2= 0,330 | 1. 215,1754  2. 209,5588  X= 212,3671 |

**Contoh perhitungan**

y1 = 0,0024x + 0,1403

y2 = 0,0028x + 0,0906

**Ekstrak Metanol**

Diketahui :

A1 = 0,441

A2 = 0,445

bobot sampel = 10,4 mg

volume sampel = 25 mL

Ditanya : Konsentrasi sampel dan Kadar Vit C?

* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Kadar Vit C = µg/mg
* Kadar Vit C = µg/mg

1. **FRAP**

**Kurva Standar**

|  |  |
| --- | --- |
| Konsentrasi | Absorbansi |
| 10 | 0.118 |
| 50 | 0.252 |
| 70 | 0.369 |
| 110 | 0.479 |
| 150 | 0.536 |

|  |  |
| --- | --- |
| Konsentrasi | Absorbansi |
| 10 | 0.124 |
| 50 | 0.286 |
| 70 | 0.374 |
| 110 | 0.489 |
| 150 | 0.524 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Ekstrak | Bobot | Volume sampel | Rata-rata absorbansi | Kadar vit C |
| Metanol | 20,5 mg | 25 mL | A1= 0,449  A2= 0,437 | 1. 179,2763  2. 181,6582  X = 180,4672 |
| N-heksan | 30 mg | 25 mL | A1= 0,451  A2= 0,437 | 1. 91,3709  2. 87,4425  X = 89,4067 |
| Etil-asetat | 20,8 mg | 25 mL | A1= 0,431  A2= 0,443 | 1. 124,0306  2. 128,6057  X= 126,3181 |

**Contoh perhitungan**

y1 = 0,0031x + 0,1111

y2 = 0,0029x + 0,1327

**Ekstrak Metanol**

Diketahui :

A1 = 0,449

A2 = 0,437

bobot sampel = 20,5 mg

volume sampel = 25 mL

Ditanya : Konsentrasi sampel dan Kadar Vit C?

* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Konsentrasi sampel = µg/mL
* Kadar Vit C = µg/mg
* Kadar Vit C = µg/mg

Lampiran 5. Uji Toksisitas (BSLT)

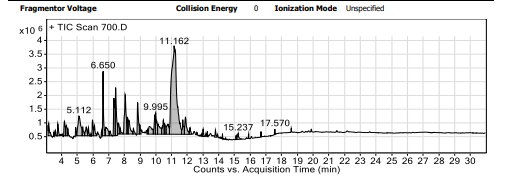
1. Hasil pengamatan Larva Artemia salina terhadap Ekstrak methanol Daun Ketapang (*Terminalia Catappa L*)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Konsentrasi | Replikasi | Total Larva | Jumlah Larva | Rata-Rata | % Mortalitas |
| (ppm) |  |  | Mati |  |  |
|  | 1 | 10 | 0 |  |  |
| 10 | 2 | 10 | 1 | 0.02 | 2 |
|  | 3 | 10 | 1 |  |  |
|  | 1 | 10 | 2 |  |  |
| 100 | 2 | 10 | 2 | 0.05 | 5 |
|  | 3 | 10 | 1 |  |  |
|  | 1 | 10 | 6 |  |  |
| 500 | 2 | 10 | 5 | 0.17 | 17 |
|  | 3 | 10 | 6 |  |  |
|  | 1 | 10 | 10 |  |  |
| 1000 | 2 | 10 | 10 | 0.30 | 30 |
|  | 3 | 10 | 10 |  |  |

1. Analisis probit

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Confidence Limits** | | | | | | |
|  |  | 95% Confidence Limits for Konsentrasi | | | | |
|  |
|  | Probability | Estimate | Lower Bound | | Upper Bound | |
| PROBIT | ,010 | -231,349 | -485,490 | | -85,045 | |
| ,020 | -156,084 | -380,886 | | -24,312 | |
| ,030 | -108,330 | -314,931 | | 14,633 | |
| ,040 | -72,407 | -265,587 | | 44,203 | |
| ,050 | -43,187 | -225,660 | | 68,465 | |
| ,060 | -18,316 | -191,848 | | 89,289 | |
| ,070 | 3,492 | -162,352 | | 107,697 | |
| ,080 | 23,017 | -136,077 | | 124,315 | |
| ,090 | 40,775 | -112,304 | | 139,551 | |
| ,100 | 57,122 | -90,535 | | 153,691 | |
|  | ,150 | 124,799 | -1,832 | | 213,657 | |
| ,200 | 178,587 | 66,554 | | 263,428 | |
| ,250 | 224,733 | 123,255 | | 308,097 | |
| ,300 | 266,173 | 172,295 | | 350,089 | |
| ,350 | 304,573 | 215,952 | | 390,787 | |
| ,400 | 341,011 | 255,705 | | 431,078 | |
| ,450 | 376,265 | 292,629 | | 471,599 | |
| ,500 | 410,961 | 327,575 | | 512,869 | |
| ,550 | 445,656 | 361,277 | | 555,383 | |
| ,600 | 480,911 | 394,412 | | 599,693 | |
| ,650 | 517,349 | 427,664 | 646,485 | |
| ,700 | 555,749 | 461,805 | 696,699 | |
| ,750 | 597,189 | 497,808 | 751,728 | |
| ,800 | 643,334 | 537,088 | 813,817 | |
| ,850 | 697,122 | 582,045 | 887,018 | |
| ,900 | 764,800 | 637,668 | 980,064 | |
| ,910 | 781,146 | 650,980 | 1,002,660 | |
| ,920 | 798,904 | 665,395 | 1,027,255 | |
| ,930 | 818,430 | 681,195 | 1,054,348 | |
| ,940 | 840,237 | 698,784 | 1,084,664 | |
| ,950 | 865,109 | 718,777 | 1,119,305 | |
| ,960 | 894,329 | 742,187 | 1,160,085 | |
| ,970 | 930,252 | 770,861 | 1,210,324 | |
| ,980 | 978,006 | 808,825 | 1,277,261 | |
| ,990 | 1,053,271 | 868,373 | 1,383,051 | |

Lampiran 7 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan GC-MS



|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Integration Peak List** | | | | | | | |
| **Peak** | **Start** | **RT** | **End** | **Height** | **Area** | **Area %** |
| 1 | 4.971 | 5.112 | 5.317 | 715257 | 8710310.74 | 11.85 |
| 2 | 6.586 | 6.65 | 6.778 | 2352298 | 8110930.22 | 11.04 |
| 3 | 7.266 | 7.329 | 7.419 | 1372323 | 7961943.39 | 10.83 |
| 4 | 7.419 | 7.445 | 7.573 | 1747293.25 | 8410223.07 | 11.44 |
| 5 | 7.919 | 8.047 | 8.163 | 1436706.63 | 10090603.46 | 13.73 |
| 6 | 8.793 | 8.842 | 8.957 | 1151442.85 | 5642876.65 | 7.68 |
| 7 | 9.841 | 9.944 | 9.97 | 704473.29 | 3356093.76 | 4.57 |
| 8 | 9.97 | 9.995 | 10.111 | 778976.67 | 4397568.62 | 5.98 |
| 9 | 10.867 | 11.162 | 11.636 | 3228379.32 | 73498064.52 | 100 |
| 10 | 11.815 | 11.879 | 12.123 | 613680.52 | 5041304.99 | 6.86 |

