

**ISOLASI SENYAWA AKTIF ANTIOKSIDAN RIMPANG
GANDASULI (*Hedychium coronarium*)**

LAPORAN TUGAS AKHIR

AYU ERIZKA DWI FEBRIANTY

13151004



**SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG
PROGRAM STUDI STRATA I FARMASI
BANDUNG
2017**

**ISOLASI SENYAWA AKTIF ANTIOKSIDAN RIMPANG
GANDASULI (*Hedychium coronarium*)**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Kelulusan
Program Strata Satu

**AYU ERIZKA DWI FEBRIANTY
13151004**

Bandung, Agustus 2017

Menyetujui

Pembimbing Utama



(Aris Suhardiman, M.Si., Apt.)

Pembimbing Serta



(Asep Roni, M.Si., Apt.)

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

ABSTRAK

ISOLASI SENYAWA AKTIF ANTIOKSIDAN RIMPANG GANDASULI (*Hedychium coronarium*)

Oleh:

AYU ERIZKA DWI FEBRIANTY

13151004

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat pembentukan radikal bebas dan melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif. Salah satu tanaman dari suku Zingiberaceae yang berpotensi sebagai antioksidan adalah rimpang gandasuli (*Hedychium coronarium*). Rimpang gandasuli merupakan tanaman yang tumbuh di beberapa negara di Asia dan Afrika, telah banyak digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit. Penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa aktif antioksidan rimpang gandasuli. Rimpang gandasuli diekstraksi secara maserasi dengan etanol 96%. Fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan n-heksan dan etil asetat. Fraksi etil asetat difraksinasi lanjutan dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Pemurnian dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis pengembangan tunggal dengan tiga pengembang berbeda dan dua dimensi. Identifikasi isolat menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan inframerah. Pengujian aktivitas antioksidan isolat dilakukan secara kualitatif dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Isolat murni diperoleh dari fraksi 6 hasil KCV dan memiliki aktivitas antioksidan ditandai dengan bercak kuning setelah disemprot DPPH 0,2% dalam metanol. Isolat mempunyai panjang gelombang maksimum 262 nm dan 270 nm dan isolat mengandung gugus O-H, C-H, dan C=C.

Kata kunci: *Hedychium coronarium*, antioksidan, isolasi

ABSTRACT

ISOLATION ANTIOXIDANT ACTIVE COMPOUND OF GANDASULI (*Hedychium coronarium*)

By:

**AYU ERIZKA DWI FEBRIANTY
13151004**

Antioxidants are compounds that can inhibit the formation of free radicals and protect the body from various degenerative diseases and cancer. One of the plants of Zingiberaceae tribe that could potentially be an antioxidant is Hedychium coronarium. This plant grows in several countries in Asia and Africa, has been widely used to treat various diseases. This study aims to isolate the antioxidant active compound from Hedychium coronarium. The sample was extracted by maseration using 96% ethanol. The fractionation was carried out by liquid-liquid extraction using n-hexane and ethyl acetate. The fractionation fraction of ethyl acetate continued with vacuum liquid chromatography (VLC) method. Purification by preparative thin layer chromatography. Purity test was done with single development with three different eluents and two dimensional thin layer chromatography. Identification of isolate using UV-Vis and infrared spectrophotometry. Testing of antioxidant activity of isolate was done qualitatively using DPPH free radical reduction method. Pure isolates were obtained from the fraction number 6 of VLC yields and has antioxidant activity with yellow spot after being sprayed with 0.2% DPPH in methanol. The isolate has a maximum wavelength of 262 nm and 270 nm and the isolate contains O-H, C-H, and C=C groups.

Keywords: *Hedychium coronarium, antioxidant, isolation*

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir ISOLASI SENYAWA AKTIF ANTIOKSIDAN RIMPANG GANDASULI (*Hedychium coronarium*).

Penyusunan laporan tugas akhir ini tidak lepas dari bantuan beberapa pihak. Penulis menyampaikan rasa terima kasih sebesar-besarnya kepada

1. Bapak Aris Suhardiman, M.Si., Apt. dan Bapak Asep Roni, M.Si., Apt. atas bimbingan dan pembelajaran selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan tugas akhir tepat waktu,
2. Orang tua dan keluarga atas dukungan moril dan materil serta doa yang tak henti setiap hari,
3. Seluruh dosen dan staf Sekolah Tinggi Farmasi Bandung atas segala ilmu pengetahuan dan dukungan yang telah diberikan,
4. Rekan-rekan Ekstensi Angkatan 2015 dan Reguler Angkatan 2013 atas kerjasama dan semangat selama perkuliahan.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan laporan tugas akhir ini. Oleh sebab itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak.

Akhir kata, semoga laporan tugas akhir ini bermanfaat bagi kita semua.

Bandung, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
Bab I Pendahuluan	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Perumusan Masalah	2
I.3 Tujuan Penelitian	2
I.4 Tujuan Penelitian	2
I.5 Manfaat Penelitian	2
Bab II Tinjauan Pustaka	3
II.1 Uraian Tanaman	3
II.2 Ekstraksi	5
II.3 Fraksinasi	6
II.4 Kromatografi	7
II.5 Spektrofotometri	11
II.6 Antioksidan	12
II.6 Metode Uji Antioksidan DPPH	13
Bab III Metodologi Penelitian	15
Bab IV Alat dan Bahan	17
IV.1 Alat	17

IV.2 Bahan	17
Bab V Prosedur Penelitian	18
V.1 Penyiapan Bahan	18
V.2 Pengolahan Bahan	18
V.3 Karakterisasi Simplisia	18
V.4 Penapisan Fitokimia	21
V.5 Ekstraksi dan Fraksinasi	24
V.6 Fraksinasi Lanjutan	24
V.7 Pemurnian dan Uji Kemurnian Isolat	24
V.8 Identifikasi Isolat	25
Bab VI Hasil dan Kesimpulan	26
VI.1 Penyiapan Bahan	26
VI.2 Karakterisasi Mutu Simplisia	26
VI.3 Penapisan Fitokimia	28
VI.4 Ekstraksi dan Fraksinasi	29
VI.5 Fraksinasi Lanjutan	33
VI.6 Pemurnian dan Uji Kemurnian	34
VI.7 Identifikasi Isolat	38
Bab VII Kesimpulan dan Saran	40
VII.1 Kesimpulan	40
VII.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel VI.1 Karakteristik Makroskopik Rimpang Gandasuli	27
Tabel VI.2 Karakterisasi Simplisia Rimpang Gandasuli.....	27
Tabel VI.3 Penapisan Fitokimia Rimpang Gandasuli	29
Tabel VI.4 Rendemen Ekstrak Rimpang Gandasuli	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar II.1 Tanaman Gandasuli	44
Gambar II.2 Rimpang Gandasuli	45
Gambar VI.1 Kromatogram KLT ekstrak dan fraksi pengembang non polar	31
Gambar VI.2 Kromatogram KLT ekstrak dan fraksi pengembang semi polar	31
Gambar VI.3 Kromatogram KLT ekstrak dan fraksi pengembang polar	32
Gambar VI.4 Kromatogram KLT fraksi hasil KCV	33
Gambar VI.5 Kromatogram KLT preparatif	35
Gambar VI.6 Kromatogram isolat KLT tiga pengembang berbeda	35
Gambar VI.7 Kromatogram isolat KLT dua dimensi	36
Gambar VI.8 Kromatogram KLT identifikasi isolat	37
Gambar VI.9 Spektrum serapan ultraviolet isolat dalam metanol	38
Gambar VI.10 Spektrum serapan inframerah isolat	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A GAMBAR TANAMAN GANDASULI <i>(Hedychium coronarium)</i>	44
Lampiran B GAMBAR RIMPANG GANDASULI <i>(Hedychium coronarium)</i>	45
Lampiran C HASIL DETERMINASI TANAMAN GANDASULI (<i>Hedychium coronarium</i>).....	46
Lampiran D BAGAN ALIR PROSEDUR PENELITIAN	47

Bab I Pendahuluan

I.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, sangat reaktif dan tidak stabil, untuk mencapai kestabilannya radikal bebas akan bereaksi dengan atom atau molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini berlangsung terus menerus dalam tubuh, dan menimbulkan reaksi berantai yang mampu merusak struktur sel, bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Kikuzaki *et al*, 2002).

Untuk meredam aktivitas radikal bebas diperlukan antioksidan (Ingrid dan Santoso, 2014). Antioksidan berfungsi menetralisasi radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapatkan pasangan elektron dan menjadi stabil. Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker (Winarsi, 2007).

Menurut Atta-ur-rahman dan Choudhary (2001), beberapa senyawa dapat berpotensi sebagai antioksidan yang diantaranya flavonoid, fenolat dan alkaloid. Salah satu tanaman dari suku Zingiberaceae yang dapat berpotensi sebagai antioksidan adalah rimpang gandasuli (*Hedychium coronarium*). Menurut Singh *et al* (2013), skrining fitokimia ekstrak metanol gandasuli menunjukkan hasil gandasuli mengandung senyawa komponen fenolik, flavonoid, protein, steroid dan triterpenoid, glikosida kardiak, diterpenoid, saponin dan minyak atsiri. Potensi antioksidan juga telah dilakukan terhadap ekstrak

metanol, air dan minyak dari bagian daun dan rimpang gandasuli dengan menggunakan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Dari hasil perbandingan, aktivitas antioksidan yang paling baik ditunjukkan oleh ekstrak air daun dan ekstrak metanol rimpang, yaitu dalam konsentrasi 1 mg/mL menunjukkan hasil 98.1% dan 95.5% secara berurutan (Ching Ho, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik untuk melakukan isolasi senyawa aktif antioksidan yang terkandung dari rimpang gandasuli (*Hedychium coronarium*).

I.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini antara lain,

- a. Apakah senyawa dari rimpang gandasuli dapat diisolasi?
- b. Apakah isolat rimpang gandasuli memiliki aktivitas antioksidan?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa aktif antioksidan rimpang gandasuli.

I.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang senyawa isolat rimpang gandasuli yang aktif sebagai antioksidan dan pengembangan penggunaan gandasuli dalam bidang farmasi.

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Uraian Tanaman

Uraian tanaman meliputi taksonomi tanaman, nama daerah, morfologi tumbuhan, persebaran tanaman, pemanfaatan tanaman, dan kandungan senyawa kimia.

II.1.1 Taksonomi Tanaman

Kingdom	: Plantae
Super Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monokotil
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Hedychium
Spesies	: <i>Hedychium coronarium</i> J. (Shekhar dan Anju, 2015)

II.1.2 Nama Daerah dan Nama Asing

Tanaman gandasuli dikenal dengan berbagai nama di Indonesia, antara lain gondosulu (Jawa Tengah), gandasuli (Jawa Barat), mandasuling (Bali), dagasuli (Halmahera). Di negara asing gandasuli dikenal dengan dolan champa (Hindi), suruli sugandhi (Kannada), *butterfly lily* (Inggris), dan guajirol (Spanyol) (Shekhar dan Anju, 2015).

II.1.3 Morfologi Tanaman

Herba tanaman gandasuli ini memiliki tinggi pohon hingga 3 – 6 m, permukaan batang berbentuk bulat, tidak bercabang, terbungkus pelepah daun dan berwarna hijau. Daun tunggal, berseling,

berpelepah dan berbentuk lanset dengan ujung runcing dengan pangkal tumpul, memiliki panjang daun 20 – 30 cm dan lebar 3 – 10 cm. Bunga majemuk, di ujung batang, berbau harum, kelopak hijau, kerucut, terdiri dua daun kelopak, mahkota bentuk kupu-kupu, daun mahkota empat, benang sari putih, berlekatan, putik panjang \pm 5 cm, putih kekuningan, putih. Akar serabut berwarna kuning (Shekhar dan Anju, 2015). Gambar tanaman dan rimpang gandasuli dapat dilihat di halaman lampiran.

II.1.4 Persebaran Tanaman

Gandasuli dapat ditemukan di beberapa negara tropis dan subtropis di Asia dan Afrika. Tempat tumbuh gandasuli ini adalah di tanah yang agak basah dan tumbuh baik setelah musim hujan. Gandasuli lebih suka tumbuh di tempat yang basah, hutan hujan, hutan lembab, tepi jalan, area terbuka, dan aliran sungai (Aziz *et al*, 2009; Bahuguna dan Kumar, 2014). Herba ini dapat tumbuh di dataran rendah maupun pegunungan dari ketinggian lima meter hingga 2.000 meter dari permukaan laut.

II.1.5 Pemanfaatan Tanaman

Rimpang gandasuli dapat digunakan untuk mengobati diabetes, demam, anti rematik, antioksidan, antihipertensi, antikanker, diuretik, antimalaria. (Ramarao dan Gurjar, 1990; Thanh *et al*, 2014). Selain itu, rimpang berkhasiat sebagai obat rematik, sakit kepala, pilek dan influenza. Bunga gandasuli dapat digunakan sebagai peluruh haid, obat bengkak, obat radang tenggorokan dan sebagai bahan baku kosmetika.

II.1.6 Kandungan Senyawa Kimia

Kandungan kimia dari ekstrak rimpang gandasuli mengandung karbohidrat, protein, flavonoid, fenol, tannin, steroid dan terpenoid, saponin, glikosida, dan minyak (Singh, 2013). Hasil isolasi ekstrak etanol tanaman gandasuli dari perbandingan eluen n-heksan:etil asetat (85:15) diperoleh senyawa 8a, hydroxyl hedychilactone (Shekhar dan Anju, 2015). Pada bagian bunga gandasuli, terkandung coronalactosides I dan II, serta coronadiene yang menunjukkan efek hepatoprotektif terhadap hepatosit tikus (Nakamura *et al*, 2008).

II.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan zat yang larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair atau cairan penyari (Harbone, 1987). Pelarut atau cairan penyari yang digunakan dalam ekstraksi dapat berupa air, campuran etanol-air dan eter.

Berdasarkan Departemen Kesehatan RI (2000), beberapa metode ekstraksi diantaranya,

1. Cara dingin
 - a. Maserasi
 - b. Perkolasi
2. Cara panas
 - a. Refluks
 - b. Digesti
 - c. Sokletasi
 - d. Infus
 - e. Dekok

II.2.1 Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang dimasukkan ke wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan peyaringan. Metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil, tetapi membutuhkan banyak waktu dan pelarut yang cukup banyak, besar kemungkinan beberapa senyawa akan hilang dan sulit diekstraksi pada suhu kamar.

II.3 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan kandungan zat berdasarkan perbedaan kepolaran dari kandungan kimia masing-masing. Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama lainnya jumlah dan jenis senyawa yang dapat dipisahkan menjadi beberapa fraksi, tergantung pada jenis tumbuhannya (Harborne, 1987)

Dalam metode fraksinasi, pengetahuan mengenai sifat senyawa yang terdapat dalam ekstrak akan sangat mempengaruhi proses fraksinasi. Oleh karena itu, jika digunakan air sebagai pengekstraksi maka senyawa yang terekstraksi akan bersifat polar, termasuk senyawa yang bermuatan listrik. Jika digunakan pelarut non polar misalnya heksan, maka senyawa yang terekstraksi bersifat non polar dalam ekstrak (Harborne, 1987).

Ekstraksi cair-cair merupakan pemisahan komponen kimia diantara dua fase pelarut yang tidak dapat saling bercampur dimana sebagian komponen larut pada fase pertama dan sebagiannya lagi larut pada fase kedua. Kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok, lalu dibiarkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase zat cair. Komponen kimia akan terpisah ke dalam dua fasa tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap (Sudjadi, 1988).

II.4 Kromatografi

Definisi Keulemans menyatakan kromatografi adalah suatu metode pemisahan fisik, di mana komponen-komponen yang dipisahkan didistribusikan di antara dua fasa, salah satu fasa tersebut adalah suatu lapisan diam dengan permukaan yang luas, yang lainnya sebagai fluida yang mengalir lambat di sepanjang landasan diam. Fasa diam bisa berupa padatan maupun cairan, sedangkan fasa bergerak bisa berupa cairan maupun gas (Day dan Underwood, 1999).

Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi :

- a) Kromatografi adsorpsi
- b) Kromatografi partisi
- c) Kromatografi pasangan ion
- d) Kromatografi penukar ion
- e) Kromatografi eksklusi ukuran, dan
- f) Kromatografi afinitas

Berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas :

- a) Kromatografi kertas
- b) Kromatografi lapis tipis
- c) Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dan
- d) Kromatografi gas (Rohman, 2009).

II.4.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode isolasi yang terjadi berdasarkan perbedaan daya serap (adsorpsi) dan daya partisi serta kelarutan dari komponen-komponen kimia yang akan bergerak mengikuti kepolaran eluen. Oleh karena daya serap adsorben terhadap komponen kimia tidak sama, maka komponen bergerak dengan kecepatan yang berbeda sehingga hal inilah yang menyebabkan pemisahan (Hostettmann *et al*, 1995).

Pada proses pemisahan dengan kromatografi lapis tipis, terjadi hubungan kesetimbangan antara fase diam dan fasa gerak, dimana ada interaksi antara permukaan fase diam dengan gugus fungsi senyawa organik yang akan diidentifikasi yang telah berinteraksi dengan fasa geraknya. Kesetimbangan ini dipengaruhi oleh 3 faktor, yaitu kepolaran fase diam, kepolaran fase gerak, serta kepolaran dan ukuran molekul.

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm (Gandjar dan Rohman, 2007). Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusinya. Penyerap yang

paling sering digunakan adalah silika gel dan serbuk selulosa (Gandjar dan Rohman, 2012).

Selain fasa diam, dalam KLT juga diperlukan fasa gerak atau eluen yang berperan penting pada proses elusi bagi larutan umpan (*feed*) untuk melewati fasa diam (adsorben). Interaksi antara adsorben dengan eluen sangat menentukan terjadinya pemisahan komponen. Suatu pelarut yang bersifat larutan relatif polar, dapat mengusir pelarut yang tak polar dari ikatannya dengan alumina (gel silika). Semakin dekat kepolaran antara senyawa dengan eluen maka senyawa akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut. Hal ini berdasarkan prinsip “*like dissolved like*” (Watson, 2010).

II.4.2 Kromatografi Cair Vakum

Kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan penjerap lalu divakumkan lagi. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai (Hostettmann *et al*, 1995).

Sampel dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimasukkan langsung pada bagian atas kolom atau pada lapisan penjerap dan dihisap perlahan-lahan ke dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom dielusi dengan campuran pelarut yang cocok, mulai dari pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolarannya ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Oleh karena itu kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Hostettmann *et al*, 1995).

II.4.3 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Kromatografi lapis tipis (KLT) preparatif merupakan salah satu metode pemisahan yang memerlukan pembiayaan yang paling murah dan memakai peralatan yang paling dasar. Ketebalan penyerap yang sering dipakai adalah 0,5-2 mm, ukuran plat kromatografi biasanya 20x20 cm atau 20x40 cm. KLT preparatif dapat memisahkan bahan alam dalam jumlah gram, sebagian besar pemakaian hanya dalam jumlah miligram. Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika gel dan dipakai untuk pemisahan senyawa lipofil maupun campuran senyawa hidrofil (Hostettmann *et al*, 1995).

II.4.4 Kromatografi Lapis Tipis dengan Pengembang Tunggal

Sistem yang paling sederhana ialah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Gandjar dan Rohman, 2007).

Multi eluen adalah penggunaan eluen atau fase gerak yang berbeda yang memungkinkan pemisahan analit dengan berdasarkan tingkat polaritas yang berbeda. Sebuah fase kurang polar dapat digunakan pertama, diikuti oleh fase yang lebih polar, atau sebaliknya.

II.4.5 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

KLT dua arah atau KLT dua dimensi ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika komponen-komponen solut mempunyai karakteristik kimia yang hampir sama, karena nilai R_f juga hampir sama. Selain itu, dua sistem fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan pada suatu campuran tertentu sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan analit

yang mempunyai tingkat polaritas yang hampir sama. Dengan demikian maka KLT dua dimensi dapat dipakai untuk memeriksa kemurnian isolat (Rohman, 2009).

II.5 Spektrofotometri

II.5.1 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan sinar tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bias didapatkan dari spektrumvini. Namun, spektrum sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bias ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan Hukum Lambert-Beer. Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200 – 400 nm dan 400 – 800 nm untuk sinar tampak.

Untuk mendapatkan hasil pengukuran yang optimum, setiap komponen yang dipakai harus berfungsi dengan baik. Komponen spektrofotometri UV-Vis meliputi:

- a. Sumber sinar, lampu deuterium atau hidrogen untuk UV dan tungsten untuk visible,
- b. Monokromator, digunakan untuk mendispersikan sinar ke dalam komponen-komponen panjang gelombangnya yang selanjutnya akan dipilih oleh celah,

- c. Optik-optik, dapat didesain untuk memecah sumber sinar sehingga sumber sinar melewati dua kompartemen.

II.5.2 Spektrofotometri Inframerah

Spektrofotometri inframerah (*infrared*) merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75-1000 μm atau pada bilangan gelombang 13.000-10 cm^{-1} . Spektrofotometri inframerah pada umumnya digunakan untuk menentukan gugus fungsi suatu senyawa organik dan mengetahui informasi struktur suatu senyawa organik dengan membandingkan daerah sidik jarinya.

Spektroskopi inframerah didasarkan pada senyawa yang terdiri atas dua atom atau diatom yang digambarkan dengan dua buah bola yang saling terikat oleh pegas. Jika pegas direntangkan atau ditekan dengan jarak keseimbangan tersebut, maka energi potensial dari sistem tersebut akan naik. Setiap senyawa pada keadaan tertentu mempunyai tiga macam gerak, yaitu gerak translasi, vibrasi, dan rotasi. Bila ikatan bergetar, maka energi vibrasi secara terus-menerus dan secara periodik berubah dari energi kinetik ke energi potensial dan sebaliknya. Jumlah energi total adalah sebanding dengan frekuensi vibrasi dan tetapan gaya dari pegas dan massa dari dua atom yang terikat.

II.6 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan pembentukan oksigen reaktif dan radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil karena tidak memiliki elektron yang tidak berpasangan

dalam orbital luarnya sehingga sangat reaktif untuk mendapatkan pasangan elektron dengan mengikat sel-sel tubuh. Apabila hal tersebut terjadi secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Sies, 1993).

Antioksidan alami dapat diperoleh dari makanan sehari-hari seperti sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan dan tanaman lainnya yang mengandung antioksidan bervitamin (vitamin A, C, dan E), asam-asam fenolat (asam ferulat, asam klorogelat, asam elegat, dan asam kafeat), dan senyawa flavonoid seperti kuersetin, mirisetin, apigenin, luteolin, dan kaemferol (Rohdiana, 2001).

II.7 Metode Uji Antioksidan DPPH

Aktivitas antioksidan tidak dapat diukur secara langsung melainkan melalui efek antioksidan dalam mengontrol proses oksidasi. Banyak metode yang bisa digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan (Antolovich *et al*, 2002). Salah satu metode mengukur aktivitas antioksidan total suatu senyawa adalah DPPH.

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Green, 2004; Gurav *et al*, 2007).

Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ini berdasarkan dari hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh antioksidan. Intensitas warna dari larutan uji diukur melalui spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang sekitar 520 nm.

Hasil dari uji ini diinterpretasikan sebagai IC_{50} , yaitu jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi awal DPPH sebesar 50%. Pada metode ini tidak diperlukan substrat sehingga memiliki keuntungan, yaitu lebih sederhana dan waktu analisis yang lebih cepat (Antolovich *et al*, 2002).