

**PENETAPAN KADAR FENOLAT, FLAVONOID, DAN AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK BATANG BROTOWALI (*Tinospora
crispa* (L.) DENGAN METODE CUPRAC**

Laporan Tugas Akhir

**Nurani Hafsyah
191FF04052**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

**PENETAPAN KADAR FENOLAT, FLAVONOID, DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
PADA EKSTRAK BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L.) DENGAN METODE
CUPRAC**

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**Nurani Hafsyah
191FF04052**

Bandung, 17 Juli 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



(apt. Asep Roni, M.Si.)
NIDN. 0425128003

Pembimbing Serta,



(Dewi Kurnia, M.Si.)
NIDN. 0416038501

ABSTRAK**Penetapan Kadar Fenolat, Flavonoid, Dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Dengan Metode Cuprac**

Oleh :
Nurani Hafsyah
191FF04052

Stres oksidatif adalah kerusakan yang diakibatkan oleh spesi oksigen reaktif . Senyawa yang dapat mencegah terjadinya stres oksidatif yaitu antioksidan. Tanaman brotowali (*Tinospora crispa*) telah digunakan untuk pengobatan diabetes dan hipertensi. Tanaman brotowali mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya yaitu flavonoid. Flavonoid diketahui merupakan golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada batang brotowali yang diekstraksi dengan pelarut berbeda kepolaran, sehingga dapat diketahui jenis pelarut manakah yang paling baik dalam mengekstrak tanaman uji batang brotowali. Ekstraksi dilakukan dengan metode refluks bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96%. Penetapan aktivitas antioksidan menggunakan metode CUPRAC. Penetapan kadar fenol total menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan asam galat sebagai standar. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode aluminium klorida kolorimetri dengan kuersetin sebagai standar. Hasil menunjukkan sampel ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dibandingkan sampel ekstrak dengan etanol 96% dan n-heksana. Nilai EC₅₀ ekstrak etil asetat sebesar 53,637 µg/mL. Ekstrak dengan pelarut etil asetat memiliki kadar fenol total paling tinggi yaitu 7,211 ± 0,009 gGAE/100 g Ekstrak. Ekstrak dengan pelarut n-heksana memiliki kadar flavonoid paling tinggi yaitu 9,937 ± 0,009 gQE/100 g Ekstrak.

Kata Kunci : antioksidan, brotowali, CUPRAC, *Tinospora crispa*

ABSTRACT**Determination of Phenolic Levels, Flavonoids, and Antioxidant Activity in Extracts of Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Using Cuprac Method**

By :
Nurani Hafsyah
191FF04052

Oxidative stress is damage caused by reactive oxygen species. Compounds that can prevent oxidative stress are antioxidants. The brotowali plant (*Tinospora crispa*) has been used for the treatment of diabetes and hypertension. The brotowali plant contains secondary metabolites such as flavonoids. Flavonoids are known to be a class of compounds that have antioxidant activity, so it can be kind of solvent which is the most excellent in the test plant extract *brotowali*. Extraction was conducted by reflux-rise that use n-hexane, ethyl acetate and ethanol 96%. Determination of antioxidant activity using the m CUPRAC method. Determination of total phenol content using the Folin-Ciocalteu method with gallic acid as the standard. Determination of total flavonoid content using colorimetric aluminum chloride method with quercetin as standard. The results showed that the ethyl acetate extract sample had strong antioxidant activity compared to the extract sample with 96% ethanol and n-hexane. The EC₅₀ value of the ethyl acetate extract was 53.637 g/mL. The extract with ethyl acetate solvent had the highest total phenol content, which was 7.211 ± 0.009 gGAE/100 g extract. Extract with n-hexane solvent had the highest flavonoid content, namely 9,937 ± 0.009 gQE/100 g extract.

Keywords: antioxidant, brotowali, CUPRAC, *Tinospora crispa*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbilalamin, puji dan syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT yang mencurahkan rahmat dan hidayahnya, sehingga saya dapat menyelesaikan Proposal Penelitian yang berjudul “Penentuan Kadar Fenolat, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Dengan Metode CUPRAC”. Saya menyadari, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tugas akhir ini. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat dan kerendahan hati, saya mengucapkan banyak terima kasih kepada :

- 1) Rektor Universitas Bhakti Kencana Bapak Dr. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes.
- 2) Ibu Dr.apr. Patonah Hasimun, M.Si. selaku Dekan Farmasi Universitas Bhakti Kencana
- 3) Bpk. Apr. Asep Roni, M.SI. selaku dosen pembimbing utama dan Ibu Dewi Kurnia, M.SI. selaku pembimbing serta tugas akhir yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan memberi arahan kepada saya.
- 4) Seluruh jajaran Staff dan Dosen Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana.
- 5) Kedua orang tua dan keluarga yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan baik moril dan materil.
- 6) Teman-teman seperjuangan yang tidak berhenti memberi motivasi dalam penyusunan tugas akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga Tugas Akhir ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Bandung, 17 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Rumusan masalah.....	3
I.3. Tujuan dan manfaat penelitian	3
I.4. Hipotesis penelitian	3
I.5. Tempat dan waktu Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Tinjauan Botani	4
II.2 Kandungan Kimia.....	5
II.3 Khasiat dan Penggunaan di Masyarakat.....	6
II.4 Aktivitas Farmakologi	7
II.5 Teknik Ekstraksi Bahan Alam.....	7
II.6 Kromatografi Lapis Tipis	11
II.7 Spektrofotometer UV-Vis	13
II.8 Radikal Bebas.....	13
II.9 Antioksidan	14
II.10 Uji Aktivitas Antioksidan.....	17
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	19
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	20
IV.1 Alat dan Bahan	20
4.1.1 Alat	20
4.1.2 Bahan.....	20
IV.2 Jenis Penelitian.....	20
IV.3 Penyiapan Bahan	20
IV.4 Karakterisasi simplisia	21
IV.5 Penapisan fitokimia	23
IV.6 Proses pembuatan ekstrak batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i>)	24
IV.7 Penetapan Kadar Fenol Total	25
IV.8 Penetapan Kadar flavonoid Total.....	25
IV.9 Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	25
IV.10 Analisis data	26
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
V.1. Penyiapan Bahan dan Determinasi Tanaman.....	27
V.2. Pengolahan Bahan	27
V.3. Karakterisasi Simplisia.....	27
V.4. Penapisan Fitokimia	29

V.5. Ekstraksi	29
V.6. Pemantauan Ekstrak	30
V.7. Penetapan Kadar Fenol Total	32
V.8. Penetapan Kadar Flavonoid Total	34
V.9. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC	36
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	38
VI.1. Simpulan.....	38
VI.2. Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN	42

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar II.1 Tanaman Brotowali (<i>Tinospora crispa</i> (L.) Hook. F.....	5
Gambar V.1 Kromatogram Lapis Tipis.....	34
Gambar V.2 Kurva Standar Asam Galat.....	35
Gambar V.3 Kadar Fenol Total.....	36
Gambar V.4 Kurva Standar Kuersetin.....	37
Gambar V.5 Kadar Flavonoid Total.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel V.1 Hasil Karakterisasi Simplisia Batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i>).....	30
Tabel V.2 Penampisan Fitokimia Simplisia batang brotowali (<i>Tinospora crispa</i>)...	31
Tabel V.3 Hasil Rendemen Ekstrak.....	32
Table V.4 Hasil Pengukuran Absorbansi Standar Asam Galat.....	35
Tabel V.5 Hasil Pengukuran Absorbansi Standar kuersetin.....	37
Table V.6 Hasil EC ₅₀ dengan Metode CUPRAC.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman.....	44
Lampiran 2. Perhitungan Kadar Fenol Total.....	45
Lampiran 3. Perhitungan Kadar Flavonoid Total.....	46
Lampiran 4. Perhitungan nilai EC ₅₀ Standar Vitamin C.....	47
Lampiran 5. Perhitungan nilai EC ₅₀ Sampel Ekstrak Batang Brotowali.....	48
Lampiran 6. Surat Pernyataan Bebas Plagiasi.....	49
Lampiran 7. Surat Persetujuan untuk dipublikasikan di media on line.....	50

BAB I. PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Proses penuaan ialah perubahan bertahap yang terjadi dalam tubuh manusia. Penuaan yang terjadi lebih cepat dari pada waktu umumnya disebut penuaan dini. Salah satu penyebab terjadinya penuaan dini adalah karena adanya spesi oksigen reaktif. Spesi oksigen reaktif adalah molekul yang tidak berpasangan, sehingga sangat tidak stabil dan sangat reaktif.. Spesi oksigen reaktif yang paling banyak dipelajari karena memiliki efek berbahaya dan merusak ialah superoksida (O₂⁻), hidroksil (-OH), dan perhidroksil (-O₂H). Kerusakan akibat spesi oksigen reaktif disebut dengan stress oksidatif. Sumber utama pembentukan spesi oksigen reaktif adalah pencemaran lingkungan, sinar ultraviolet yang berbahaya, ataupun diproduksi secara terus-menerus sebagai hasil dari metabolisme normal didalam tubuh, dll. spesi oksigen reaktif akan menyebabkan *misfolding* protein, kerusakan kolagen, kerusakan lipid, kerusakan DNA dan fragmentasi (Manisha, hasan whidul, 2017).

Hasil penelitian Taniyama, 2003 menunjukkan bahwa fungsi dari *endothelium* dipengaruhi oleh spesi oksigen reaktif yang dapat menginaktivasi nitrik oksida (degradasi NO^{*}). Nitrik oksida bukan radikal yang sangat reaktif, namun produksi berlebihan menyebabkan *ischemia reperfusion* dan degenerasi syaraf serta penyakit peradangan kronis seperti artritis rematik dan peradangan lambung. Nitrik oksida yang berada pada plasma darah menyebabkan penurunan konsentrasi vitamin C dan asam urat serta memulai peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan degradasi oksidatif lipid dimana target utama terjadi pada membran sel karena memiliki dua lapisan fosfolipid dan protein yang menyebabkan kerusakan pada sel. Produk hasil oksidasi lipid salah satunya adalah malonaldehid yang dapat bereaksi dengan grup amino protein, fosfolipid, dan asam nukleat yang menyebabkan terjadinya modifikasi struktural yang dapat menyebabkan tidak berfungsinya sistem imun semuanya ini merupakan mekanisme yang mengawali perkembangan *atherosclerosis*, hipertensi dan penyakit jantung coroner (Muchtadi, 2009).

Berdasarkan uraian tersebut, perlu upaya untuk mencegah terjadinya stres oksidatif yang dapat menyebabkan sejumlah penyakit berbahaya sehingga diperlukan suatu antioksidan. Antioksidan yaitu senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul yang dapat menghasilkan radikal bebas. Terdapat dua jenis antioksidan yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintetik yang sering digunakan adalah senyawa fenolik seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan terbutilasi hidroksi - toluena (BHT), namun penggunaan antioksidan sintetik dalam jangka waktu

yang lama, telah diteliti dengan sangat teliti akan memberikan efek samping pada tubuh (Kesuma, sayuti & Yenrina, 2015). Badan internasional penelitian kanker mengevaluasi bahwa BHA dapat menyebabkan karsinogenitas pada hewan percobaan (Botterweck et al., 2000). Efek samping dari antioksidan sintetik tersebut membuat masyarakat lebih memilih penggunaan bahan alami karena, lebih aman dan minimnya efek samping yang ditimbulkan.

Salah satu alternatif antioksidan alami yang potensial adalah tanaman brotowali (*Tinospora crispa* (L.). tanaman ini termasuk dalam genus *Tinospora* dari keluarga Menispermaceae. Biasanya terdapat di hutan hujan primer atau hutan gugur campuran di Asia Tenggara dan Afrika termasuk Thailand, Malaysia, dan Indonesia. *T. crispa* telah banyak digunakan sebagai antipiretik, pengobatan peradangan internal, meningkatkan rasa lapar, mengobati keracunan yang disebabkan oleh obat-obat atau alkohol. Di Indonesia tepatnya di daerah Kalimantan telah digunakan untuk pengobatan diabetes dan hipertensi. *T. crispa* memiliki keragaman metabolit sekunder. Sejumlah studi telah dilakukan pada konstituen *T. crispa*, dan lebih dari 65 senyawa telah diisolasi. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang telah teridentifikasi diantaranya furanoditerpen, lakton, steroid, flavonoid, lignan, dan alkaloid (Ahmad et al., 2016).

Flavonoid telah diketahui merupakan golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Mekanisme kerja flavonoid dalam menangkal radikal bebas yaitu dengan mengikat ion – ion logam seperti Fe dan Cu. Flavonoid juga merupakan antioksidan yang efektif untuk inaktivasi radikal hidroksil dan peroksil. Flavonoid dapat membentuk ikatan kompleks dengan ion logam dan menghambat inisiasi logam untuk melakukan oksidasi lipid (Muchtadi, 2009). Flavonoid yang teridentifikasi terdapat dalam batang brotowali diantaranya apigenin, luteolin 4'-metileter7-glukosida, dan diosmetin (Ahmad et al., 2016).

Salah satu upaya untuk mengoptimalkan kandungan antioksidan brotowali perlu dilakukan uji aktivitas golongan senyawa antioksidan dengan memvariasi pelarut pada proses ekstraksi. Pelarut yang dipilih berdasarkan dengan tingkat kepolaran yang berbeda dengan tujuan memperoleh pelarut terbaik yaitu pelarut yang dapat mengekstrak golongan senyawa antioksidan yang mempunyai aktivitas tertinggi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Irianti uji aktivitas penangkapan radikal DPPH pada ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa*) memiliki aktivitas terbaik pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 200 µg/mL berhasil menangkap sebesar 53,57% radikal bebas (Irianti et al., 2011).

Pengujian antioksidan yang akan dilakukan menggunakan metode uji antioksidan CUPRAC. metode uji antioksidan dengan pereaksi CUPRAC mempunyai keunggulan diantaranya lebih selektif karena potensi redoksnya lebih rendah, kemudian reaksi redoks yang menimbulkan kelat berwarna Cu (I) -Nc relatif tidak sensitif terhadap sejumlah parameter yang mempengaruhi reagen radikal tertentu seperti DPPH yaitu udara, sinar matahari, jenis pelarut, dan pH (Apak et al., 2007). Maka dari itu, perlu dilakukan pengujian dengan pelarut yang berbeda yang dapat mengekstraksi jenis golongan senyawa yang berbeda yang terkandung dalam batang brotowali, sehingga diharapkan dapat mengetahui jenis pelarut paling baik untuk ekstraksi yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan paling tinggi dengan menggunakan metode CUPRAC.

I.2. Rumusan masalah

Bagaimana aktivitas antioksidan paling baik pada batang brotowali (*Tinospora crispa*) yang dilakukan dengan variasi pelarut dalam ekstraksi bertingkat menggunakan metode CUPRAC?

I.3. Tujuan dan manfaat penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pelarut yang paling baik dalam mengekstrak tanaman uji batang brotowali (*Tinospora crispa*) yang mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dengan metode CUPRAC.

I.4. Hipotesis penelitian

Ekstrak dengan pelarut etil asetat memiliki persentase terbesar dalam menangkal radikal bebas. Sehingga senyawa metabolit sekunder dari batang brotowali (*Tinospora crispa*) akan menghasilkan antioksidan terbaik jika menggunakan pelarut yang memiliki sifat semipolar.

I.5. Tempat dan waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Bhakti Kencana. Waktu penelitian pada bulan Februari 2021 sampai Mei 2021.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Botani

Semak tahunan, bentuk kayu memanjat dengan cara membelit, tinggi atau panjang tanaman bisa mencapai 15 meter. putih kotor, akar tunggang. Batang bulat, berkayu, permukaan batang tua terdapat bintil-bintil sampai bertotol – totol kasar, batang muda tidak berambut, pahit. Letak daun tersebar, daun tunggal, daun berbentuk jantung, ujung meruncing pangkal terbelah, panjang 6-13 cm, tangkai 4-16 cm. bunga jantan 3 bersama 1 tangkai bunga majemuk tandan, panjang 7 – 25 cm, kelopak warna hijau, berjumlah 6 daun mahkota, panjang rata-rata 2,5 mm, panjang benang sari 2-2,5 mm. buah batu, kecil, hijau (Aspan Ruslan, 2008).

2.1.1 Klasifikasi

Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Bangsa : *Ranunculales*
Suku : *Menispermaceae*
Marga : *Tinospora*
Jenis : *Tinospora crispa* (L.) Hook. F. (Aspan Ruslan, 2008)



Gambar 2.1 Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Hook. F. (Aspan Ruslan, 2008)

2.1.2 Sinonim

Menispermum crispum L.; *Menispermum tuberculatum* Lamk.; *Menispermum Verrucosum* Flem.; *Tinospora rumphii* Boerl.; *Cocculus crista* DC ; *T. tuberculata* (Lamk) Beumee ex Heyne. (Aspan Ruslan, 2008)

2.1.3 Nama Daerah

Bratawali (Melayu); Brotowali (Jawa Tengah); Antawali (Bali), Andawali (Sunda); (Aspan Ruslan, 2008)

2.1.4 Nama Umum

Bratawali (Aspan Ruslan, 2008)

II.2 Kandungan Kimia

2.2.1 Flavonoid

Flavonoid memiliki atom karbon dalam inti dasarnya, memiliki susunan struktur C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatic yang dihubungkan oleh satuan C₃ yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ke tiga. Flavonoid termasuk ke dalam fenol alami yang banyak ditemukan pada tanaman hijau. (Markham K.R., 1982).

Aglikon flavonoid jika dalam suasana yang terlalu basa akan menyebabkan terurainya senyawa flavonoid hal ini dikarenakan aglikon flavonoid merupakan turunan senyawa fenol yang bersifat asam. Aglikon flavonoid memiliki sejumlah gugus hidroksil yang dapat larut dalam senyawa polar. Adanya gula yang terikat pada satu atau lebih gugus hidroksil dengan ikatan hemiasetal yang tak tahan asam dinamakan flavonoid *O*-glikosida. Gugus glikosida dapat mengurangi aktivitas dari flavonoid dan memiliki sifat yang lebih polar. (Markham K.R., 1982).

Gula yang terikat pada atom karbon nomor 6 dan 8 dalam inti flavonoid dimana gula tersebut terikat pada inti benzene dinamakan dengan Flavonoid *C*-glikosida. Flavonoid *C*-glikosida lebih tahan asam karena memiliki ikatannya karbon dengan karbon dan gula yang terlibat jauh lebih sedikit dibandingkan dengan flavonoid *O*-glikosida hal ini yang menyebabkan flavonoid jenis ini memiliki sifat kelarutan yang kurang polar. Sehingga Aglikon yang memiliki sifat kurang polar seperti isoflavan, flavanon, dan flavon cenderung lebih larut pada dalam pelarut eter dan kloroform. Pada batang brotowali *Tinospora crista* teridentifikasi memiliki tiga senyawa flavon diantaranya Apigenin, Diosmetin, dan genkwanin, dan tiga senyawa glikosida flavon luteolin 4'-methyl ether 7-glucoside, genkwanin 7-glucoside, and luteolin 4'-methyl'ether 3-glucoside (Markham K.R., 1982).

2.2.2 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa yang memiliki aksi fisiologis yang memiliki cincin heterosiklik yang terikat dengan satu atau lebih atom nitrogen sehingga memiliki sifat basa. Alkaloid banyak bersumber dari tumbuhan. Alkaloid umumnya ditemukan pada *Magnoliaceae*), *Papaverales* (*Papaveraceae*, *Fumariaceae*), *Rosales* (*Leguminosae*, subfamily *Papilionaceae*), *Magnoliales* (*Lauraceae*, *Rutales* (*Rutaceae*), *Gentiales* (*Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Rubiaceae*), *Ranunculales* (*Berberidaceae*, *Menispermaceae*, *Ranunculaceae*), *Tubiflorae* (*Boraginaceae*, *Convolvulaceae*, *Solanaceae*), *Campanulales* (*Campanulaceae*, sub-family *Lobelioideae*; *Compositae*, subfamily *Senecioneae*) dan *Centrospermae* (*Chenopodiaceae*). Alkaloid berdasarkan struktur kimianya dibagi menjadi :(Evans, 2009)

- a. Non-heterosiklik atau atipikal alkaloid, atau biasanya disebut dengan proto alkaloid atau amina biologis yaitu unsur nitrogennya tidak berikatan dengan cincin heterosiklik. Contohnya ephedrine.
- b. Heterosiklik atau tipikal alkaloid yang dibagi ke dalam 14 grup berdasarkan perbedaan strukturnya. Grup tersebut diantaranya pirole dan pirolidin, pirolizidin, piridin dan piperidin, Tropan, Quinolon, Isoquinolon, Aporfin, Quinolizidin, indol atau benzopirol, indolizidin, imidazole atau glioksalin, purin, steroidal, dan terpenoid.

II.3 Khasiat dan Penggunaan di Masyarakat

Brotowali di Indonesia banyak ditemukan di Pulau Jawa, Bali, dan Ambon. Dimasyarakat Indonesia brotowali digunakan untuk mengobati rheumatik, demam, kencing manis, kudis, Luka, gatal – gatal pada badan, dan lain sebagainya. Sedangkan di cina digunakan sebagai obat demam. Kemudian di Negara Asia Tenggara lainnya seperti di Filipina dan Malaysia, brotowali digunakan sebagai obat untuk mengatasi kadar gula dalam darah yang tinggi atau penyakit diabetes militus atau kencing manis. Didaerah jawa brotowali digunakan untuk mengobati penyakit gatal atau koreng (Suliswinarni, 2010).

II.4 Aktivitas Farmakologi

2.4.1 Aktivitas Imunomodulator

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Ekstrak etanol *Tinospora crispa* dan farksinya dapat meningkatkan ekspresi intraseluler sitokin, INF- γ , IL-6, dan IL-8- Fraksi etil asetat paling efektif dalam menunjukan peningkatannya. Senyawa dalam *Tinospora crispa* yang larut dalam etil asetat dan memiliki aktivitas imunomodulator yaitu cordioside, quercetin, paullinic acid, dan boldine yang diidentifikasi dengan analisis LC-MS (Abood et al., 2014).

2.4.2 Aktivitas Antidiabetes

Tinospora crispa mengandung senyawa yang dapat mensekresi insulin dengan memodulasi konsentrasi Ca^{2+} . Penelitian menunjukan bahwa serbuk kering *Tinospora crispa* pada pasien hipoglikemik dengan sindrom metabolic dengan dosis 250 mg *Tinospora crispa* dua kali sehari secara signifikan menurunkan glukosa darah puasa dari nilai awal. Ekstrak etanol *Tinospora crispa* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu borapetosides A dan borapetosides C yang menunjukan efek hipoglikemik pda Tikus diabetes. Senyawa tersebut mengurangi kadar glukosa plasma pada tikus diabetes tipe 1 yang diinduksi dengan streptozotocin. Selain itu, bropetoside C meningkatkan penggunaan glukosa di jaringan perifer dan menurunkan glukoneogenesis hati, sehingga memperhitungkan efek hipoglikemik (Sriyapai et al., 2009).

2.4.3 Aktivitas inhibitor artherosklerosis

Penelitian yang dilakukan oleh amom menunjukan bahwa ekstrak air dari batang *Tinospora crispa* yang diberikan pada kelinci uji yang mengalami hiperkolesterolemia dapat memperlambat perkembangan asterosklerosis dengan menekan kasar kolesterol total Trigliserida dan LDL, dimana LDL dapat meningkatkan kolesterol total secara signifikan. Suplemen *Tinospora crispa* juga dikathui dapat menurunkan kadar MDA plasma dengan memperlambat atau menurunkan stress oksidatif yang terkait dengan peroksidasi lipid (Amom et al., 2011).

II.5 Teknik Ekstraksi Bahan Alam

Ekstraksi senyawa bukan minyak atsiri pada umumnya berwujud padat pada suhu ruang menggunakan pendekatan teknik ekstraksi yang berbeda dalam rangka untuk mendapatkan rendeman yang maksimal dengan mutu yang tetap terjaga. Kesesuaian sifat kepolaran dan perlakuan panas serta tekanan akan dapat meningkatkan efisiensi dan rendemen proses ekstraksi senyawa metabolit sekunder. Meskipun demikian, ada juga senyawa metabolit sekunder non atsiri

yang tidak stabil pada suhu tinggi. Dalam hal ini, pendekatan teknik ekstraksinya tetap harus menggunakan teknik ekstraksi tanpa perlakuan panas (Agung Nugroho, 2017).

2.5.1 Prinsip Ekstraksi

Ekstraksi dengan pemanasan dilakukan untuk membuka jaringan atau dinding sel pada tumbuhan, sehingga senyawa target pada tumbuhan akan tertarik berdasarkan sifat kepolaran yang sama dengan pelarut yang digunakan. Ekstraksi dengan pelarut sangat berhubungan dengan dua tipe ekstraksi, yaitu ekstraksi dengan padatan-cairan (*solid-liquid extraction*) dan juga ekstraksi cairan-cairan (*liquid-liquid extraction*). Ekstraksi padatan-cairan berarti pengambilan atau pemisahan senyawa metabolit dari suatu matriks bahan padat yang berupa bagian tertentu atau keseluruhan bagian bahan tanaman dengan menggunakan pelarut tertentu. Sedangkan ekstraksi cairan-cairan adalah pengambilan atau pemisahan senyawa metabolit yang sudah terlarut sebelumnya pada suatu bahan pelarut dengan cara mencampurkannya dengan pelarut lain yang bersifat immiscible (tidak dapat bercampur baik) dengan pelarut awal tetapi memiliki kemiripan tingkat polaritas dengan senyawa yang akan dipisahkan, sehingga senyawa-senyawa target dapat terlarutkan atau terkumpul pada pelarut baru tersebut (Agung Nugroho, 2017).

Proses ekstraksi simplisia akan kontak langsung dengan pelarut yang digunakan, proses tersebut terjadi secara dinamik yang di bagi menjadi tiga tahap, yaitu: dinding sel dan jaringan akan dirusak oleh pelarut, pelarut masuk ke dalam sel, kemudian senyawa-senyawa metabolit akan berdifusi dari jaringan keluar sehingga terlarut dalam pelarut yang digunakan, selanjutnya pelarut di hilangkan dari biomassa penghasil. Oleh karena itu memperkecil ukuran simplisia dan juga peningkatan temperatur sangat diperlukan untuk mempercepat tahap-tahap tersebut. Pelarut dipisahkan melalui proses evaporasi untuk menghasilkan ekstrak kasar, baik dalam bentuk cairan kental atau padatan (*solid*) (Agung Nugroho, 2017).

2.5.2 Metode Ekstraksi

Pemilihan metode didasarkan pada karakteristik bahan dan senyawa metabolit yang akan diekstrak, rendemen ekstrak yang ingin diperoleh, kecepatan ekstraksi, dan juga biaya. Beberapa metode ekstraksi antara lain: (Agung Nugroho, 2017)

a) Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana dan kuno. Meskipun demikian, metode ini masih secara luas digunakan karena beberapa kelebihan seperti biaya yang murah,

peralatan yang sederhana, serta tanpa perlakuan panas sehingga menjadi pilihan tepat untuk ekstraksi senyawa-senyawa yang tidak tahan panas (*termolabile*). Prosedur maserasi adalah dengan merendam bahan baku yang telah disiapkan ke dalam pelarut yang sesuai pada suatu bejana dan ditempatkan pada suhu ruang dan ditunggu untuk beberapa waktu, Pengadukan secara kontinyu atau berkala juga dapat dilakukan untuk mempercepat proses ekstraksi. Proses ekstraksi dapat dihentikan jika telah diperoleh titik jenuh (*equilibrium*) antara konsentrasi senyawa metabolit pada larutan ekstrak dengan konsentrasi senyawa metabolit pada bahan. Setelah selesai maka larutan ekstrak dapat disaring dengan kertas saring untuk memisahkan dengan bahan asalnya.

Kelemahan metode maserasi adalah kurang efisien dari segi waktu dan rendemen. Satu kali ekstraksi memerlukan waktu sekitar 1 hari sampai dengan satu minggu, tergantung pada jenis bahan yang diekstrak, semakin kuat jaringan dan dinding sel pada bahan maka membutuhkan waktu yang lebih panjang. Selain itu, maserasi juga membutuhkan pelarut dengan volume yang lebih banyak, dan peluang hilangnya senyawa metabolit selama proses juga lebih banyak, karena menempel pada bahan, menempel pada kertas saring, menempel pada bejana, dll. Ada kemungkinan terjadinya perubahan struktur kimia dari metabolit yang tidak stabil karena lamanya proses dan kontak dengan air atau pelarut.

b) Perkolasi

Alat utama yang digunakan dalam Perkolasi yaitu perkolator, yaitu sebuah bejana berbentuk silindris atau kerucut terbalik yang dilengkapi dengan lobang atau kran di bagian ujung bawahnya. Proses perkolasi sendiri dilakukan dengan melarutkan senyawa metabolit pada suatu bahan yang akan diekstrak dengan cara mengalirkan pelarut yang sesuai pada matriks bahan atau sampel yang telah dipak atau ditata pada perkolator sehingga senyawa metabolit terikat dengan pelarut dan mengalir keluar dari bejana untuk ditampung. Prosedur ini dapat diulangi berkali-kali sampai dirasa mulai tidak efisien lagi dikarenakan metabolit yang terbawa terlalu sedikit yang terlihat dari perubahan warna larutan ekstrak atau dari hasil tes dengan bahan kimia tertentu (reagent) untuk mendeteksi dan memastikan apakah masih ada senyawa yang terikat apa tidak. Metode ini sudah tentu tidak membutuhkan proses filtrasi, karena ekstrak sudah tersaring pada perkolator.

Kelemahan mendasar dari metode perkolasi adalah volume pelarut yang dibutuhkan tentu lebih banyak, karena dilakukan secara kontinyu dan tanpa adanya waktu kontak yang lama. Selain itu, karena sampel bahan dipak pada bejana perkolator, maka ada kemungkinan packing tersebut tidak homogen, ada bagian yang padat tetapi ada juga yang kurang padat. Sudah tentu pada bagian padat

akan lebih sulit bagi pelarut untuk melewatinya sehingga kemungkinan senyawa metabolit yang tertinggal pada bagian itu menjadi cukup tinggi. Kelemahan lain yang perlu diatasi adalah masalah sumbatan pada perkolator yang disebabkan terlarutnya beberapa jenis resin yang menggumpal serta sifat bahan tanaman yang mudah hancur dan larut sehingga menyumbat perkolator.

c) Ekstraksi dengan Refluks

Refluks adalah proses ekstraksi menggunakan pelarut yang diputar kembali atau di-*recycle* secara berkesinambungan melalui pengkondensasian berulang pada sebuah alat kondensor. Simplisia dan pelarut akan dimasukkan ke dalam labu alas bulat yang ditempatkan pada sebuah pemanas (dapat menggunakan *water bath*, *heating mantle*, atau *hot plate*). Lubang pada bagian atas labu dihubungkan dengan dengan alat pendingin balik (kondesor).

Pelarut akan mendidih dan menguap karena proses pemanasan, pelarut panas merusak jaringan dan dinding sel, kemudian pelarut akan menembus ke dalam sel dan melarutkan senyawa metabolit, sehingga senyawa metabolit akan larut di dalam pelarut. Pada saat pelarut mendidih, maka zat-zat yang terlarut akan tertinggal di dalam labu ekstraksi. Sementara itu, pelarut akan mendidih, menguap dan mengalir dengan bergerak ke atas menuju kondensor. Pada saat yang sama, karena dialiri dengan fluida dingin, maka suhu kondensor jauh di bawah suhu uap pelarut. Dengan demikian uap pelarut akan cepat mengalami kondensasi (pendinginan dan berubah wujud menjadi cair kembali) yang kemudian mengalir ke bawah lagi menuju labu ekstraksi. Proses ini berlangsung secara kontinyu sampai mekanisme pemanasan dihentikan.

Melalui metode seperti ini, maka akan menghemat penggunaan pelarut, karena proses ekstraksi dilakukan secara berkelanjutan. Selain itu, rendemen ekstrak yang dihasilkan juga lebih tinggi, dikarenakan proses ekstraksi berlangsung pada suhu tinggi sehingga mempercepat kerusakan sel dan jaringan tumbuhan serta mempercepat proses pelarutan. Salah satu kelemahan metode ini adalah pada penggunaan suhu tinggi yang berpotensi mendegradasi beberapa senyawa yang tidak stabil pada temperatur tinggi. Selain itu, tentu saja biaya energi yang lebih besar karena diperlukan dalam proses pemanasan dan juga proses pendinginan pada kondensor

d) Ekstraksi dengan Soxhlet

Ekstraksi dengan soxhlet juga termasuk salah satu metode yang paling banyak digunakan karena tingkat kepraktisan dan kenyamanannya. Prinsip ekstraksi dengan metode soxhlet adalah dengan mengekstrak bahan yang sudah dihaluskan dan dibungkus pada selembar kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam alat soxhlet yang sebelumnya telah ditempatkan pelarut pada labu soxhlet

yang berada di bagian bawah. Persis di bawah labu soxhlet tersebut ditempatkan sebuah heating mantle atau hot plate untuk memanaskan labu soxhlet

Ketika soxhlet dipanaskan, maka pelarut pada labu soxhlet akan menguap dan terkondensasi kembali karena adanya sistem pendingin (kondensasi) pada bagian atas, sehingga mencair kembali dengan menyiram dan merendam bahan dalam bungkus kertas saring tadi. Akibatnya adalah pelarut tersebut akan mengekstrak bahan/sampel dan melarutkan senyawa metabolitnya. Setelah beberapa saat, maka larutan ekstrak akan mencapai volume tertentu, dan dengan mekanisme soxhlet maka larutan tadi akan terpompa dan mengalir ke bawah menuju bagian labu soxhlet. Pada saat yang sama, labu dalam kondisi panas, sehingga larutan tersebut akan kembali menguap dengan meninggalkan ekstraknya pada labu dan hanya pelarutnya yang menguap kembali untuk dikondensasi kembali. Proses ini berlangsung secara kontinyu sehingga menyebabkan sampel secara terus menerus terkena efek mekanik dan kimia dari pelarut yang menyebabkan proses ekstraksi berjalan lebih cepat dan efisien.

Kelebihan utama soxhlet adalah sistem kerjanya yang kontinyu. Dengan prinsip seperti itu maka proses ekstraksi dapat dilakukan dengan lebih cepat. Selain itu jumlah pelarut yang digunakan juga dapat diminimalisasi. Sedangkan untuk kelemahannya adalah sekali lagi karena prosesnya melibatkan panas yang cukup tinggi, yaitu pemanasan sampai titik didih pelarut maka resiko kerusakan senyawa metabolit yang sensitif terhadap panas juga cukup tinggi.

II.6 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis mungkin merupakan metode termudah dan paling sering diterapkan untuk menilai Kemurnian (kompleksitas dan sifat) senyawa organik. Pada kromatografi lapis tipis fase diam adalah lapisan tipis dari adsorben yang tersebar di atas lembaran kaca atau plastik. kalsium sulfat atau polimer organik berfungsi untuk mengikat adsorben ke lempengan. Sejumlah kecil sampel ditempatkan di bagian bawah lempengan dan lempengan ditempatkan di dalam wadah dengan pelarut yang dangkal: jarak perpindahan pelarut dari senyawa ke bagian atas lempengan kromatogram tergantung pada kemampuan senyawa untuk mengikuti sistem adsorben, serta banyak faktor lainnya. Sistem adsorben-pelarut dapat ditemukan untuk memisahkan sebagian besar komponen dari campuran yang diberikan. prosedur ini sangat berguna untuk senyawa yang peka terhadap panas atau non-volatil.

Senyawa dapat dideteksi pada lempeng TLC dengan berbagai cara. Cara yang paling sederhana adalah dengan menggunakan lampu UV berdaya rendah. prosedur ini memerlukan penggunaan

adsorben KLT yang telah dicampur dengan indikator fluoresen. Kasus seperti itu senyawa yang dielusi akan muncul sebagai bercak-bercak gelap karena menghalangi indikator fluoresen. Lempekan yang tersedia di pasaran dilapisi dengan alumina (Al_2O_3) atau silika gel ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Jika sinar UV akan digunakan sebagai metode visualisasi, maka gunakan pelat TLC yang berisi indikator fluoresen. Jika tabung kapiler halus tidak tersedia maka siapkan dari tabung titik leleh yang kedua ujungnya terbuka.

Larutan 1-10% sampel dalam pelarut disiapkann. Sisi pelat TLC digambar garis pensil sekitar 1 sentimeter dari bawah dan 1 sentimeter dari atas. Gunakan tabung kapiler TLC ke permukaan larutan dan biarkan beberapa larutan naik ke dalam tabung melalui aksi kapiler. Tempatkan spot dengan menyentuh tabung ke posisi hanya pada satu garis pensil. batasi jumlah dan ukuran tetesan dengan meletakkan jari di atas pipa kapiler. Di chamber tempat pengembangan, letakkan selebar kertas saring yang terlipat di sepanjang sisinya. jenuhkan kertas saring dengan pelarut dan tambahkan pelarut secukupnya sehingga tingginya berada pada 5 mm dari bagian bawah. Sandarkan sisi alumina pada kaca dan jangan biarkan kertas saring menyentuhnya. Kemudian tutup chamber. Biarkan pelarut naik ke pelat sampai bagian depan pelarut berada di garis pensil atas. Ambil pelat dari chamber dan biarkan mengering. Lingkari setiap titik yang terlihat. Jika pelat TLC berisi indikator fluoresen, tempatkan lampu ultraviolet pelat TLC. Jangan melihat langsung ke sinar UV karena dapat menyebabkan kerusakan mata. Tandai setiap titik gelap dengan melingkarinya. Bercak-bercak gelap dapat diamati karena bercak sampel menghalangi Indikator fluoresen.

Fase gerak dan fase diam pada KLT memiliki sifat yang berbeda hal ini bertujuan untuk mengetahui sifat senyawa aktif yang akan di uji cenderung mengikuti fase diam atau fase geraknya. Jika senyawa aktif memiliki sifat yang mirip dengan fase diamnya, maka senyawa tersebut tidak akan terelusi dengan cepat mengikuti laju pergerakan *solvent* yang disebabkan oleh daya kapilaritas, sehingga titik henti atau waktu retensi atau retention time (R_f), berada pada nilai rendah (posisi bagian bawah dari TLC), biasanya memiliki nilai R_f antara 0.20-0.30. Sedangkan jika senyawa aktif cenderung memiliki sifat yang sama dengan fase geraknya, maka senyawa tersebut akan cepat bergerak mengikuti arus kapilaritas dari *solvent* tersebut, biasanya berada pada nilai R_f antara 0.70-0.90 (Agung Nugroho, 2017).

II.7 Spektrofotometer UV-Vis

Spektroskopi ultraviolet (UV) merupakan metode fisik spektroskopi optik yang memakai sinar dalam rentang tampak, ultraviolet, serta inframerah dekat. Hukum Lambert Beer menerangkan jika absorbansi larutan berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa dalam larutan serta panjang gelombang. Metode analisis spektrofotometer UV didasarkan pada pengukuran penyerapan cahaya monokromatik oleh senyawa tak berwarna di jalur spektrum ultraviolet dekat (200-380nm). Prinsip dasar pengoperasian spektrofotometer yang meliputi daerah UV terdiri dari sinar dengan interval panjang gelombang tertentu melewati sel dengan pelarut serta jatuh ke sel fotolistrik yang mengubah energi radiasi menjadi energi listrik yang diukur dengan galvanometer. Daerah energi UV-Vis untuk spektrum elektromagnetik mencakup 1,5 - 6.2eV yang berhubungan dengan rentang panjang gelombang 800 - 200 nm (Gandhimathi et al., 2012).

Molekul senyawa yang dapat dideteksi oleh sinar UV-Vis adalah elektron-elektron ikatan (kromofor) dan pasangan elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat dengan gugus kromofor (auksokrom). Energi yang dihasilkan cahaya UV serta Vis, yang apabila mengenai elektron-elektron tersebut, maka elektron akan tereksitasi dari kondisi dasar ke tingkatan tenaga yang lebih besar, eksitasi elektron-elektron ini, direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang serta absorbansi, sesuai dengan jenis elektron-elektron yang ada dalam molekul yang dianalisis. Nilai absorbansi yang tinggi dan semakin besar panjang gelombang yang diserap dikarenakan mudahnya elektron-elektron bereksitasi. Spektrofotometri UV-Visible dapat digunakan untuk penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Persyaratan pelarut yang dapat digunakan: (Suharti, 2017)

1. Sampel yang akan dilarutkan harus melarut dengan sempurna.
2. Pelarut yang digunakan tidak boleh memiliki struktur molekul yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi serta tidak berwarna.
3. inert atau tidak boleh memiliki interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
4. kemurnian pelarut yang tinggi.

II.8 Radikal Bebas

Suatu molekul atom yang mempunyai elektron dengan jumlah satu atau lebih dan tidak berpasangan pada orbital terluarnya dinamakan radikal bebas. Atom atau molekul tersebut memiliki sifat yang tidak stabil sehingga senyawa yang berada disekitarnya akan kehilangan elektron karena akan tertarik oleh molekul radikal. Pengambilan elektron dari zat atau senyawa

tersebut akan menyebabkan zat tersebut kekurangan elektron sehingga menjadi zat atau senyawa radikal. Adanya electron yang tidak berpasangan tersebut yang menyebabkan radikal bebas secara kimiawi menjadi sangat aktif. Radikal bebas dapat bermuatan positif, negative, atau tidak bermuatan.

Molekul oksigen terdapat yang stabil dan tidak stabil pada tubuh manusia. Molekul oksigen yang stabil dapat memelihara kehidupan sel dengan baik. Molekul oksigen tidak stabil atau radikal bebas dalam jumlah yang cukup diperlukan untuk melawan radang, membunuh bakteri dan mengatur tonus otot polos dalam organ maupun pembuluh darah namun, dalam jumlah yang tak terkendali radikal bebas bersifat merusak dan sangat berbahaya (Giriwijoyo, 2004). Penyakit seperti kanker, jantung, penuaan dini dan menurunnya sistem imun tubuh salah satunya dikarenakan reaksi radikal yang terjadi terus – menerus dalam tubuh manusia (Irianti et al., 2017).

Radikal bebas merupakan turunan dari C dan N, namun radikal yang banyak diketahui adalah radikal oksigen. Proses metabolisme tubuh serta zat – zat kimiawi yang berasal dari makanan dan minuman yang dikonsumsi, serta polusi udara dan sinar ultraviolet dapat menghasilkan radikal bebas. Proses tersebut sering kali menyebabkan kebocoran elektron. Dalam kondisi ini, radikal bebas seperti anion superoksida, hidroksil mudah sekali terbentuk. Radikal bebas dapat disebabkan juga akibat dari tubuh mengalami stress berlebihan, baik stress secara fisik, psikologis maupun biologis. Radikal bebas juga bisa terbentuk dari senyawa yang bukan radikal namun mudah berubah menjadi radikal bebas misalnya H_2O_2 . Makromolekul pembentuk sel ialah protein, karbohidrat, lemak serta asam nukleat yang dapat dirusak oleh radikal bebas yang reaktif. Radikal bebas dalam jumlah tidak terkendali perlu diredam oleh senyawa bersifat antioksidan. (Irianti et al., 2017).

II.9 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam. Mekanisme Kerja antioksidan dengan cara mendonorkan satu elektronnya agar berikatan dengan senyawa oksidan. Antioksidan memiliki jenis yang bermacam – macam diantaranya:

a) Antioksidan Alami

Antioksidan alami banyak dijumpai pada beberapa jenis tumbuhan. Antioksidan yang berasal dari tumbuhan adalah berupa senyawa-senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan tersebut diantaranya

senyawa tokoferol, polifenol atau fenolik, turunan asam sinamat, golongan flavonoid, kumarin, dan asam organik (Irianti et al., 2017; Madhavi, 1996).

1) α -Tokoferol

α -Tokoferol adalah antioksidan yang kuat dan memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan sel tubuh manusia, memperlambat terjadinya penuaan dini dan menangkal radikal bebas yang dapat membahayakan kesehatan jantung dan paru-paru. α -Tokoferol bereaksi dengan radikal peroksil asam lemak, produk utama peroksidasi lipid, dan memotong reaksi berantai. α -Tokoferol diketahui merupakan antioksidan larut lemak paling kuat. Gugus fungsi dari senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan berada pada Gugus fenol hidroksil cincin C₆ dan cincin kromanol yang dapat menstabilkan elektron tidak berpasangan. Pada minyak bunga matahari, kacang – kacangan, biji gandum, dan kacang-kacangan banyak mengandung senyawa α -Tokoferol (Evans, 2009; Irianti et al., 2017).

2) Asam Askorbat

Asam askorbat atau Vitamin C dapat meredam senyawa radikal bebas yang larut dalam air hal ini karena sifat asam askorba yang larut dalam air. Asam askorbat bereaksi dengan cepat pada radikal hidroksil dan hydrogen peroksida dengan cara menangkap oksigen singlet. Asam askorbat dapat dioksidasi dan direduksi oleh radikal bebas dimana aktivitasnya berada pada gugus 2,3-enediol. Asam askorbat terdapat dalam 2 bentuk di alam yaitu L-askorbat dan L-dehidro askorbat (bentuk teroksidasi).

Asam askorbat dapat memproduksi kolagen, membantu menjaga kesehatan pembuluh kapiler, gigi dan gusi, meningkatkan penyerapan zat besi dalam tubuh. Asam askorbat juga dapat meningkatkan HDL, menurunkan kolesterol dalam darah dan mengurangi peningkatan karsinogen pada DNA (Irianti et al., 2017).

3) Polifenol

Polifenol adalah kelompok antioksidan paling banyak terdapat dalam tanaman pangan, dengan lebih dari 8000 struktur fenolik. Mekanisme senyawa polifenol dalam menginaktivasi senyawa radikal di antaranya dapat sebagai pereduksi atau memberikan elektron, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam dan peredam terbentuknya oksigen singlet. (Irianti et al., 2017).

4) Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok antioksidan penting untuk tubuh manusia. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol. Flavonoid secara langsung menangkal radikal bebas. Gugus hidroksil

pada senyawa flavonoid sangat reaktif dalam mengoksidasi radikal bebas, sehingga menghasilkan radikal yang lebih stabil.

Flavonoid sebagai antioksidan dapat menangkap sejumlah ion oksidatif, di antaranya 42 anion superperoksida, radikal hidroksil atau radikal peroksi. Flavonoid juga dapat memadamkan oksigen singlet. Berdasarkan penelitian, ada beberapa mekanisme dalam aktivitas antioksidan oleh flavonoid ini. Keberadaan katekol pada cincin B berperan utama dalam mengontrol pemadaman O_2 dan keberadaan gugus hidroksil pada posisi 3 sebagian besar menentukan efisiensi reaktivitas kimia flavonoid dengan O_2 . Gugus karbonil pada C-4 dan ikatan rangkap antara C-2 dan C-3 pada flavonoid juga berperan pada aktivitas antioksidan yang tinggi. Kemungkinan mekanisme lain yaitu kemampuan flavonoid dalam menstabilkan membran dengan cara mengurangi fluiditas membran (Irianti et al., 2017).

b) Antioksidan Sintetik

1) Butyl Hidroksi Anisol (BHA)

BHA sudah sejak lama digunakan untuk mengawetkan makanan yang mengandung minyak. Cincin aromatis terkonjugasi pada struktur BHA bertindak menstabilkan radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tidak terjadi. BHA memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan vitamin E (Irianti et al., 2017).

National Institute of Health Amerika Serikat melaporkan BHA yang ditambahkan dalam pakan tikus dengan dosis tinggi dapat menyebabkan timbulnya papilloma dan squamous cell carcinoma. Pada mencit, efek buruk yang terjadi adalah BHA melindungi terhadap kanker dari zat kimia. Sedangkan pada manusia, penelitian menyebutkan BHA pada dosis tinggi menimbulkan reaksi alergi yang dapat mengurangi fungsi ginjal dan hati.

2) Butyl Hidroksi Toluen (BHT)

BHT digunakan sebagai antioksidan dalam kosmetik, makanan dan sediaan farmasi dengan fungsi yang sama seperti BHA. Kombinasi BHA menghasilkan efek sinergis. BHT digunakan secara luas karena harganya relatif murah. BHT menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan dengan cara mendeaktifasi senyawa radikal. BHT juga dapat berfungsi sebagai peredam (quencher) bagi oksigen singlet. BHT memiliki sifat yang tahan terhadap pemanasan. Pada proses Fotooksidasi, terbentuk senyawa radikal akibat dari reaksi hidroperoksida yang terurai menjadi hidroperoksi, BHT berperan dalam menghambat reaksi tersebut dengan cara menangkap radikal bebas. (Irianti et al., 2017).

II.10 Uji Aktivitas Antioksidan

2.10.1 Uji DPPH

DPPH merupakan senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan warna ungu tua. DPPH menerima elektron atau hidrogen untuk membentuk molekul yang stabil. Warna violet tersebut akan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm karena adanya delokalisasi electron. Interaksi antioksidan dengan DPPH dapat menetralkan sifat radikal dari DPPH dengan cara transfer elektron atau radikal hidrogen. Semakin banyak elektron yang berpasangan dengan DPPH maka warna ungu violet akan berubah menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang (λ_{max}) 517 nm akan hilang. Perubahan warna tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer dan diplotkan terhadap konsentrasi (Irianti et al., 2017).

Penggunaan metode DPPH untuk mengukur aktivitas antioksidan in vitro dapat memberikan informasi tentang reaktivitas senyawa yang diuji dengan radikal bebas yang stabil. IC50 atau konsentrasi inhibisi digunakan sebagai parameter aktivitas antioksidan. IC50 adalah jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan 50% konsentrasi DPPH awal. (Irianti et al., 2017).

2.10.2 Uji Metode ABTS (garam 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonikacid) diazonium)

Metode ABTS adalah metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan dengan reaksi langsung atau reduksi radikal kationik ABTS yang dihasilkan oleh reaksi kimia. ABTS merupakan radikal dengan pusat nitrogen. Pusat nitrogen tersebut dapat berwarna biru kehijauan dimana ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal tidak berwarna. Kemampuan relatif antioksidan pendonor hidrogen untuk meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dalam fase air, dapat diukur secara spektrofotometri, dengan pengukuran di daerah inframerah-dekat pada 734 nm, yang meminimalkan gangguan dari komponen penyerap lainnya dan dari kekeruhan sampel (Irianti et al., 2017).

Metode ini baik digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dan fenolik. ABTS memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH. Tidak seperti DPPH yang sensitive pada pH asam, metode ABTS lebih fleksibel yakni dapat digunakan dalam berbagai level pH. Sehingga, metode ini baik digunakan untuk melihat efek pH dalam aktivitas antioksidan berbagai senyawa. ABTS larut dalam pelarut organik dan non organik. Metode ini juga lebih cepat jika digunakan pada PBS (pelarut non organik) (Irianti et al., 2017)

2.10.3 Metode FRAP

FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) merupakan uji aktivitas antioksidan yang dapat digunakan untuk analisis senyawa rutin. Prinsip metode FRAP adalah reduksi analog ferroin, kompleks Fe^{3+} dari tripyridyltriazine $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$, menjadi kompleks Fe^{2+} berwarna biru pekat $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ karena adanya antioksidan pada suasana asam (pH 3,6). $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$ oleh antioksidan. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 595 nm (Irianti et al., 2017).

2.10.4 Metode CUPRAC

Pada metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) reaksi yang terjadi adalah kompleks bis-neocuproin-tembaga (II) akan mengoksidasi komponen kimia yang memiliki sifat antioksidan dalam ekstrak tanaman dan mengalami reduksi membentuk kompleks bis-neocuproin-tembaga (I). Prinsip dari pengujian ini adalah menggunakan pH 7 warna redoks bis-neocopper (II) untuk membentuk khelat. Standar antioksidan yang digunakan dalam metode ini dicampur dengan CuSO_4 dan basis neocopper. Reaksi didiamkan selama 30 menit kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm. Jika larutan mengalami perubahan warna dari biru toska menjadi kuning maka menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Pereaksi CUPRAC memiliki nilai potensial reduksi sebesar 0,17 V, hal ini yang membuat pereaksi CUPRAC lebih selektif. Hasil yang diperoleh dinyatakan dalam mg Trolox per liter sampel. Kelebihan metode ini adalah reagen yang digunakan cepat, selektif, stabil, mudah diperoleh, dan mudah diaplikasikan. (Irianti et al., 2017).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan secara *True-eksperimental* di Laboratorium Fitokimia Universitas Bhakti Kencana. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga bulan Mei 2021. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu penyiapan bahan, karakterisasi simplisia, penapisan fitokimia, proses ekstraksi, pengujian aktivitas antioksidan ekstrak batang brotowali dengan metode CUPRAC menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, Pengolahan data dan analisis statistik.

Tanaman uji yang digunakan adalah batang brotowali (*Tinospora crispa*). Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, pengolahan bahan. Pengolahan bahan terdiri dari beberapa proses diantaranya sortasi basah bahan simplisia, pencucian bahan simplisia, penirisan, perajangan, kemudian simplisia basah dikekeringkan dan disortasi kering.

Karakterisasi simplisia meliputi susut pengeringan, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol. Setelah dilakukan karakterisasi simplisia kemudian dilakukan penampisan fitokimia pada simplisia yaitu dengan pemeriksaan senyawa alkaloid, pemeriksaan senyawa flavonoid, pemeriksaan saponin, pemeriksaan tanin, pemeriksaan kuinon, dan pemeriksaan steroid dan triterpenoid.

Batang brotowali kemudian diekstraksi dengan cara refluks bertingkat. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi bertingkat yaitu n-heksan (non polar), etil asetat (semi polar) dan etanol 70% (polar). Ekstrak kental dari ketiga pelarut yang diperoleh kemudian dilakukan penetapan kadar fenol total dan Flavonoid total menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar fenol total dihitung terhadap kurva kalibrasi asam galat sebagai standar sedangkan kadar flavonoid total dari bahan uji dihitung terhadap kurva kalibrasi *quercetin* sebagai standar. Uji Aktivitas antioksidan dilakukan dengan pengujian uji kualitatif senyawa yang terkandung dalam bahan uji menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan pengujian kuantitatif dengan metode CUPRAC yang dilihat berdasarkan tingkat absorbansi Cu (I)-neocuproine yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Microsoft Excel* secara statistik.