

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT
SEKUNDER DARI EKSTRAK DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens*
Jack) SERTA UJI IMUNITAS TERHADAP MENCIT (*Mus musculus* L.)**

(Skripsi)

Oleh

**Pandu Tris Mahendra
1717011044**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG**

2023

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack) SERTA UJI IMUNITAS TERHADAP MENCIT (*Mus musculus* L.)

Oleh

Pandu Tris Mahendra

Indonesia merupakan negara dengan sumber daya alam yang sangat melimpah, seperti jumlah tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat. Saat ini penggunaan tumbuhan yang bertujuan untuk meningkatkan imunitas dalam tubuh sedang marak dilakukan untuk menghindari berbagai penyakit. Salah satu tumbuhan yang memiliki efektivitas terhadap imunitas adalah tanaman sungkai. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstrak daun sungkai dan mengetahui efek imunomodulator pada ekstrak daun sungkai. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi maserasi dan metanol sebagai pelarut. Pemisahan senyawa menggunakan Teknik kromatografi cair vakum (KCV), dilanjutkan pemurnian menggunakan teknik kromatografi kolom (KK). Evaluasi setiap pemisahan dimonitorng menggunakan kromatografi lapis-lapis (KLT), karakterisasi menggunakan *IR*, *UV-Vis*, dan *LCMS/MS*. Uji imunitas dilakukan dengan metode *in vivo* menggunakan mencit jenis (*mus musculus* L.) dengan 5 perlakuan. Dosis yang digunakan pada ekstrak adalah 0,186; 0,375; 0,5625 mg/kgbb. Ketiga dosis Ekstrak daun sungkai yang diberikan kepada mencit yang memiliki efek terhadap imunitas mencit pada dosis 0,186 mg/kgbb. Hasil analisis senyawa dengan menggunakan alat *IR*, *UV-VIS*, dan *LCMS/MS* diduga bahwa senyawa yang diisolasi adalah *phepopitin a*.

Kata Kunci: *Imunomodulator*, Sungkai, *Phepopitin a*

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SECONDARY
METABOLITE COMPOUNDS FROM SUNGKAI LEAF EXTRACT
(*Peronema canescens* Jack) AS WELL AS IMMUNITY TESTS AGAINST
MICE (*Mus musculus* L.)**

By

Pandu Tris Mahendra

Indonesia is a country with very abundant natural resources, such as the number of plants that can be used as medicine. Nowadays, the use of plants that are intended to increase immunity in the body is being carried out to avoid various diseases. One of the plants that has effectiveness against immunity is the sungkai plant. This study aims to extract sungkai leaves and determine the immunomodulatory effect on sungkai leaf extract. Extraction is performed using the maceration maceration method and methanol as solvent. Separation of compounds using vacuum liquid chromatography (KCV) technique, followed by purification using column chromatography (KK) technique. Evaluation of each separation was monitored using layered chromatography (KLT), characterization using *IR*, *UV-Vis*, and *LCMS/MS*. Immunity testing is carried out by *the in vivo* method using a type of mice (*mus musculus* L.) with 5 treats. The dosage used on the extract was 0.186; 0,375; 0.5625 mg/kgbb. The three doses of sungkai leaf extract were given to mice which had an effect on mice immunity at a dose of 0.186 mg / kgbb. The results of the analysis of compounds using *IR*, *UV-VIS*, and *LCMS / MS* tools suspected that the isolated compound was *phepopitin a*.

Keywords: *Imunomodulator*, Sungkai, *Phepopitin a*

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT
SEKUNDER DARI EKSTRAK DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens*
Jack) SERTA UJI IMUNITAS TERHADAP MENCIT (*Mus musculus* L.)**

Oleh

Pandu Tris Mahendra

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
GELAR SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Univeristas Lampung**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA
METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK
DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack)
SERTA UJI IMUNITAS TERHADAP MENCIT
(*Mus musculus* L.)**

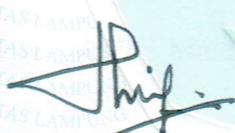
Nama Mahasiswa : **Pandu Tris Mahendra**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011044

Program Studi : S1 Kimia

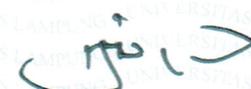
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.
NIP 197308252000031001


Dr. Yuli Ambarwati, M.Si.
NIP 197406112000031002

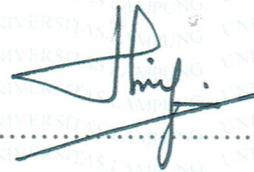
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP 19740611200031002

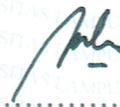
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

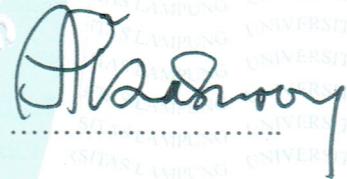
Ketua : Syaiful Bahri, S.Si., M.Si



Sekretaris : Dr. Yuli Ambarwati, S.Si., M.Si.



Anggota : Prof. Noviany, S.Si., M.Si, Ph.D



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, M.T

NIP.197407052000031001



Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 20 Januari 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Pandu Tris Mahendra
NPM : 1717011044
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta Uji Imunitas Terhadap Mencit (*Mus musculus* L.)” adalah benar karya dan penelitian saya sendiri, kecuali yang secara tertulis tercantum dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya, saya tidak keberatan jika Sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebanar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 13 Februari 2023
Yang Menyatakan



Pandu Tris Mahendra
NPM. 1717011044

RIWAYAT HIDUP

Pandu Tris Mahendra lahir di Gedung Karya Jitu pada tanggal 14 Agustus 1998. Penulis merupakan anak ke tiga dari lima bersaudara dari pasangan Bapak Budi Santoso dan Ibu Suryati. Penulis memiliki dua kakak dan dua adik.

Penulis menyelesaikan Pendidikan Taman Kanak-kanak di TK Citra Insani pada tahun 2005. Penulis melanjutkan Pendidikan sekolah dasar di SDS Citra Insani dan menyelesaikannya pada tahun 2011. Kemudian, melanjutkan pendidikan sekolah menengah pertama di SMP N 1 Rawajitu Timur dari tahun 2011-2014 dan SMA N 1 Simpang Pematang dari 2014-2017. Pada tahun 2017 , penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti beberapa kegiatan mahasiswa, dimulai dengan menjadi Kader Muda Himaki pada tahun 2017. Penulis juga aktif sebagai anggota Biro Usaha Mandiri (BUM) Himaki FMIPA Unila pada tahun 2018-2019. Penulis telah menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Adi Mulya (SP8) , Kecamatan Panca Jaya, Kabupaten Mesuji pada tahun 2020.

KATA INSPIRASI

“...maka bertasbihlah dengan memuji Tuhanmu dan mohonlah ampunan kepada-Nya. Sungguh, Dia Maha Penerima tobat.”

(Q.S An-Nasr: 3)

“sungguh, manusia berada dalam kerugian, kecuali orang-orang yang beriman dan mengerjakan kebajikan serta saling menasihati untuk kebenaran dan saling menasihati untuk kesabaran.”

(Q.S Al-‘Asr: 2-3)

“Dan Bersabarlah, Sesungguhnya Allah Bersama orang-orang yang sabar.”

(Q.S Al-Anfaal: 46)

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah puji syukur kepada Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan nikmat-Nya, serta shalawat beriring salam semoga selalu tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW. Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti,cinta,dantanggung jawabku kepada:

Orang Tua dan Saudara Tercinta

Terimakasih atas segala do'a, kasih sayang, kesabaran, semangat dan perhatian yang tidak pernah henti sampai saat ini sehingga penulis dapat menyelesaikan karya ini dengan baik.

Rasa hormatku kepada:

**Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si, Ibu Dr. Yuli Ambarwati, S.Si., M.Si.,
Ibu Prof. Noviany, S.Si., M.Si, Ph.D**

Dosen pembimbing penelitian dan tugas akhirku yang telah memberikan bimbingan, saran,nasihat, dan kesabaran dalam membimbing selama ini.

Dosen Jurusan Kimia

Atas segala ilmu, bimbingan, serta pengalaman kepada penulis selama menempuh pendidikan.

Seluruh sahabat dan teman-temanku yang selalu memberikan semangat, motivasi, nasihat dan menjadi pendengar serta pengingat kepada penulis.

Serta Almamaterku tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Puji dan syukur kepada Allah SWT. Tuhan semesta alam atas rahmat dan nikmat Nya, sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta Uji Imunitas Terhadap Mencit (*Mus musculus* L.)”** sebagai salah satu syarat untuk mendapat gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Pada kesempatan kali ini dengan teriring doa penulis mengucapkan terima kasih begitu tulus atas segala bimbingan, bantuan dan keberadaan yang diberikan kepada beberapa pihak yang turut membantu menyelesaikan skripsi ini. Penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Budi Santoso dan Ibu Suryati atas segala do'a, cinta dan kasih, dukungan moral dan finansial, nasihat serta motivasi yang sampai saat ini tak pernah berhenti, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah membalas atas segala yang telah diberikan dengan Jannah-Nya.
2. Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si selaku pembimbing 1 atas segala kebaikan, kesabaran, motivasi, kritik dan saran serta bimbingan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik.
3. Ibu Dr. Yuli Ambarwati, S.Si., M.Si selaku pembimbing 2 atas segala bimbingan, saran, nasehat, motivasi, kesabaran, dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis dalam perencanaan dan penyelesaian penelitian serta skripsi ini.
4. Ibu Prof. Noviany, S.Si., M.Si, Ph.D selaku penguji atas segala bimbingan, saran dan kritik penelitian dan penulisan dalam penyusunan skripsi, dan

ilmu yang bermanfaat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

5. Ibu Dr. Ilim, M.S., selaku pembimbing akademik, atas bimbingan, perhatian, nasehat, dan kesabaran dalam membimbing penulis terkait permasalahan akademik selama masa perkuliahan ini.
6. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Unila.
9. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas seluruh ilmu, bimbingan, dan nasihat yang telah diberikan selama perkuliahan.
10. Kedua kakakku Ira Supriyati dan Yopi Firdaus serta adikku Destia Reza Puspita dan Patih Taruna Dijaya yang selalu memberikan semangat, canda tawa, dan kebahagiaan. Semoga Allah SWT senantiasa memberkahi, melindungi, dan mempermudah disetiap urusan kalian berempat
11. Teruntuk Rinda Harijuliatri, S.Si., M.Si., yang selalu menemani dan memberi semangat serta kebahagiaan, canda tawa, nasihat, motivasi, serta bantuan kepada penulis.
12. Teman-teman Rezal Fahlefi, Annisa Alita Kurniawati, S.Pd., M.Pd. (soon), Rizki Okta, S.Kom., Anggi Dwi Chandra, S.Kom., Wisnu Hidayat, S.Si. (soon), Irfan, S.Kom., M. Naufal Alfarizi, S.Kom., Aan Felmansyah, M. Wahyudi, Muhlis, Bobby, dan Harist atas segala do'a, kebaikan, canda tawa, nasihat, motivasi, serta bantuan yang diberikan kepada penulis.

13. Keluarga Kimia 2017 yang telah kebersamai dari awal hingga akhir pendidikan di kampus. Terimakasih atas segala bantuan selama menjadi mahasiswa di jurusan Kimia.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, tetapi semoga dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Bandar Lampung, 03 Februari 2023

Penulis,

Pandu Tris Mahendra

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Verbenaceae.....	4
2.2 Tanaman Sungkai (<i>Peronema canescens</i> Jack).....	4
2.3 Senyawa Metabolit Sekunder	6
2.3.1 Senyawa Terpenoid.....	7
2.3.2 Senyawa Flavonoid	9
2.3.3 Senyawa Alkaloid	10
2.4 Ekstraksi	12
2.5 Kromatografi	13
2.5.1 Kromatografi Cair Vakum (KCV)	14
2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	14
2.5.3 Kromatografi Kolom (KK)	15
2.6 Spektrofotometri.....	16
2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis	17
2.6.2 Spektrofotometri IR	18
2.6.3 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).....	19
2.7 Uji Imunitas Terhadap Mencit Putih (<i>Mus musculus</i> L.)	20
III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Waktu dan tempat	22
3.2 Alat dan Bahan.....	22
3.2 Tahapan Penelitian.....	23

3.2.1	Pengambilan dan persiapan sampel	23
3.2.2	Ekstraksi bubuk daun sungkai	23
3.2.3	Uji fitokimia	24
3.2.4	Fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian	25
3.2.5	Analisis kemurnian	26
3.2.6	Uji bioaktivitas terhadap mencit	26
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1	Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun Sungkai	28
4.1.1	Ekstraksi.....	28
4.1.2	Pemurnian senyawa metabolit sekunder	30
	4.1.2.1 Kromatografi cair vakum	32
	4.1.2.2 Kromatografi kolom gravitasi (KKG).....	33
4.3	Analisis Spektrofotometri	34
4.3.1	Karakterisasi LCMS/MS.....	34
4.3.2	Analisis Spektrofotometri UV-Vis	37
4.3.3	Analisis Fourier Transform Infrared Spektrometer (FTIR).....	37
4.4	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun sungkai terhadap Leukosit Tikus	39
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	42
5.1.	Kesimpulan	42
5.2.	Saran	42
	DAFTAR PUSTAKA	43
	LAMPIRAN.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik serapan IR dari beberapa gugus fungsi.....	19
2. Perlakuan uji imunitas terhadap mencit.....	26
3. Uji fitokimia masing-masing ekstrak kasar	31
4. Gabungan subfraksi KKG.....	34
5. Puncak 9 kromatogram LCMS/MS	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pohon dan daun sungkai.....	6
2. Contoh senyawa terpenoid (Alfinda,2008)	7
3. Struktur senyawa peronemin n B2 (1), A2 (2), B1 (3), C1 (4), B3 (5),A3 (6), dan D1 (7) yang diekstrak dari daun sungkai (Halim, dkk., 2020)	8
4. Kerangka dasar flavonoid.....	9
5. Senyawa flavonoid glikosida (Neldawati, dkk., 2013).....	10
6. Struktur inti senyawa alkaloid (Alfinda, dkk., 2008)	11
7. Jenis radiasi elektromagnetik dan panjang gelombangnya(Ibnu dan Abdul, 2018)	17
8. Diagram skema kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (Harmita, dkk. 2019).....	20
9. Proses maserasi (a) Tahap perendaman, (b) penyaringan, (c) hasil maserasi.....	29
10. Profil KLT heksan:Etil asetat (8:2).....	29
11. (a) Partisi heksan : metanol (b) Partisi etil asetat : metanol.....	30
12. Proses KCV fraksi n-heksana.....	32
13. Kromatogram KLT hasil KCV heksan: etil asetat 8:2.....	32
14. Proses kolom kromatografi gravitasi dan evaluasi KLT heksan:etil asetat 7:3	33
15. Evaluasi KLT isolat PS1a heksan : etil asetat 7:3.....	34
16. Kromatogram isolate PS1a.....	35
17. Spektrum massa dari massa molekul 871.5735 m/z	36
18. Usulan struktur isolate PS1a	36
19. Spektrum serapan UV-Vis.....	37
20. Spektrum IR isolat PSA1a	38
21. Grafik jumlah total leukosit (per mm ³).....	40

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan sumber daya alam yang sangat melimpah. Secara geografis Indonesia termasuk ke dalam salah satu negara dengan hutan tropis paling besarketiga di dunia setelah Brazil dan Zaire. Jumlah tumbuhan obat yang berkhasiat di Indonesia diperkirakan sekitar 1.260 jenis tumbuhan dimana sekitar 2,5% yang telah dieksplorasi dan dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Hadi, 2011). Tumbuhan obat merupakan salah satu sumber senyawa yang berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit (Sumarsi dan Slamet, 1992; Mohamad dkk., 2015). Hal ini menjadi penting karena tanaman obat banyak mengandung berbagai senyawa-senyawa metabolit sekunderseperti terpenoid, steroid, alkaloid dan flavonoid yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktifitas tinggi (Andriani, 2014) sehingga sangat berpotensi sebagai sumber baru obat (Andriani dan Mohamad, 2013).

Sumber alam nabati saat ini merupakan salah satu sumber bahan kimia baru yang tidakterbatas, terutama senyawa isolasi murni yang dipakai langsung (Sinambela, 2002). Berbagai macam penyakit dan keluhan ringan maupun berat dapat diobati dengan memanfaatkan ramuan dari tumbuh-tumbuhan tertentu yang mudah didapat di sekitar perumahan. Oleh karena itu pengetahuan tentang tanaman obat sangat penting untuk dijaga dandisimpan sebagai bentuk kekayaan bangsa (Kartasapoetra,1996). Salah satunya tanaman sungkai (*Peronema canescens* Jack) yang dapat digunakan sebagai obat herbal yang terdapat di Indonesia. Daun sungkai mengandung

metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan tannin (Hadi, 2011). Menurut Hollman (1996) dalam Gresinta (2012) mengatakan bahwa senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai *imunostimulan agent* yaitu golongan senyawa polisakarida, terpenoid, alkaloid dan polifenol.

Sistem imunitas diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari bahaya yang dapat ditimbulkan berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Daya tahan tubuh atau sistem imun diantaranya memiliki jumlah sel darah putih atau leukosit dalam darah. Sel darah putih salah satu bagian yang penting dalam sistem kekebalan tubuh. Sel darah putih merupakan jenis zat berbahaya dalam darah dan membantu untuk menerima pesan tentang zat-zat berbahaya dalam sistem darah. Untuk membunuh infeksi sel darah putih yang digunakan dalam sistem kekebalan tubuh. Sel darah putih diproduksi dalam sumsum tulang tetapi tidak seperti sel-sel darah lainnya, mereka perlu dewasa untuk menjadi efektif. Ada lima jenis dan langkah-langkah yang terlibat dalam proses kehidupan sel-sel darah putih, neutrofil, limfosit, monosit, eosinofil, dan basofil.

Sel darah putih mempertahankan fungsi tubuh terhadap infeksi, sehingga sel darah putih bertanggung jawab terhadap imunitas tubuh, serta evaluasi infeksi bakteri dan virus. Terdapat dua jenis pengujian yang bertujuan untuk mengetahui efek imunomodulator di antaranya metode *caron clearance* dan *neutrophil adhesion*. Aktivitas eliminasi partikel karbon dari aliran darah oleh makrofag menggunakan metode *carbon clearance*, sedangkan metode *neutrophil adhesion* digunakan untuk mengetahui daya lekat dari neutrofil terhadap serat nilon yang berhubungan dengan proses pelepasan neutrofil dalam pembuluh darah (Thakur et al., 2006).

Tumbuhan sungkai (*P. canescens* Jack) sering disebut sebagai jati sabrang, ki sabrang, kurus sungkai, atau sekai, merupakan tumbuhan obat yang termasuk kedalam famili *Verbenaceae*. Di daerah kalimantan khususnya suku Dayak biasa menggunakan tanaman sungkai (*P. canescens* Jack) pada bagian daun muda sebagai obat pilek, demam, obat cacingan dan sebagai obat kumur pencegah sakit gigi. Sebagian masyarakat di Sumatera Selatan dan Lampung menggunakan daun

sungkai (*P. canescens* Jack) sebagai antiplasmodium dan obat demam (Harmida, dkk., dalam Yani, 2014).

Berdasarkan pemaparan di atas, banyaknya tanaman sungkai yang terdapat di Indonesia menjadi salah satu tanaman obat yang berguna untuk kesehatan. Salah satu pemanfaatan tanaman sungkai yang terdapat pada daunnya yaitu untuk meningkatkan sistem imun yang telah diujikan ke beberapa mencit (*Mus musculus* L.). Uji imunitas ini merupakan uji pendahuluan yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian dalam penggunaan daun sungkai sebagai peningkat imunitas.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak heksan daun sungkai (*P. canescens*).
2. Menguji daya imunitas isolat terhadap mencit putih (*Mus. musculus*).

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan berguna untuk memberikan informasi ilmiah kandungan senyawa metabolit sekunder yang aktif pada daun sungkai yang berpotensi untuk meningkatkan daya imunitas. Data yang diperoleh dapat digunakan sebagai validasi ilmiah khasiat daun sungkai bagi masyarakat pengguna obat tradisional.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Verbenaceae

Verbenaceae merupakan salah satu famili dari ordo Lamiales. Famili Verbenaceae memiliki sekitar 1.100 spesies yang terdiri dari 30 genus, famili ini juga biasa dikenal sebagai Verbena atau Vervain dan memiliki jenis tipe daun tunggal. Bunganya diagregasikan dalam lonjakan, kelompok, atau raceme yang biasanya terdiri dari tabung yang melebar menjadi empat atau lima lobus yang hampir sama-sama dipotong. Jenis genus Verbena hampir semuanya berasal dari Belahan Bumi Barat. Salah satu spesies dari Verbenaceae adalah *Peronema canescens* Jack (Heywood et al., 2007).

2.2 Tanaman Sungkai (*Peronema canescens* Jack)

Sungkai (*P. canescens* Jack) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang banyak ditemui di wilayah Sumatera bagian selatan dan Kalimantan (Imelda *et al.*, 2007; Jalius & Muswita, 2013). Sungkai sering disebut sebagai jati sabrang, ki sabrang, kurus sungkai, atau sekai, termasuk kedalam famili Verbenaceae. Di Bengkulu, *P. canescens* dapat dijumpai di hutan, kebun, maupun halaman, biasanya ditanam sebagai pembatas rumah atau berfungsi sebagai pagar hidup pada bagian belakang rumah. Menurut Harmida dan Yuni (2011) Pada suku

Dayak di Kalimantan Timur sampai saat ini masih tetap mempertahankan tradisi dengan memanfaatkan tumbuhan di sekitarnya untuk pengobatan ataupun perawatan kesehatan misalnya tanaman sungkai (*P. canescens*.Jack). Menurut Hollman (1996) dalam Gresinta (2012) mengatakan bahwa senyawa yang mempunyai bioaktivitas sebagai *imunostimulan agent* yaitu golongan senyawa polisakarida, polifenol, terpenoid dan alkaloid.

Daun sungkai secara empiris digunakan sebagai obat memar, obat pilek, obat demam, obat cacingan, dan pencuci mulut untuk mencegah penyakit gigi (Ningsih & Ibrahim, 2013). Selain itu juga digunakan sebagai obat luka luar, obat luka dalam, anti-plasmodium, dan obat diare berdarah (Andriani *et al.*, 2017; Ningsih & Ibrahim, 2013). Berdasarkan penelitian sebelumnya dilaporkan beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun Sungkai yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan fenolik (Ramadenti *et al.*, 2017). Senyawa flavonoid, saponin, alkaloid dan fenol memiliki aktivitas antiinflamasi. Kandunganmetabolit sekunder yaitu tanin, flavonoid, terpenoid dan alkaloid. Senyawa tersebutmemiliki aktivitas sebagai antioksidan sehingga dapat mencegah kerusakan akibat stress oksidatif dan luka terbuka (Latief *et al.*, 2020).

Secara umum, klasifikasi ilmiah dari tanaman sungkai (*P. canescens* Jack) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: Peronema
Spesies	: <i>Peronema canescens</i> Jack (Plantamor, 2008).



Gambar 1. Pohon dan Daun Sungkai

Tinggi pohon sungkai mencapai 20–30 m, panjang batang bebas cabang mencapai 15 m dengan diameter 50-70 cm atau lebih, batang lurus dan sedikit berlekuk dangkal, dan ranting penuh bulu halus. Kulit luar berwarna kelabu atau sawo muda, beralur dangkal, mengelupas kecil-kecil dan tipis. Kayu teras berwarna krem atau kuning muda (Departemen Kehutanan, 2006).

2.3 Senyawa Metabolit Sekunder

Pada setiap spesies tanaman biasanya dapat menghasilkan beragam senyawa organik, sebagian besar senyawa yang dihasilkan tidak berperan secara langsung terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman tersebut. Salah satu dari senyawa organik yang dapat dihasilkan pada tanaman yaitu metabolit. Metabolit diklasifikasikan menjadi dua, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan senyawa yang dibentuk pada tanaman dalam jumlah terbatas yang penting untuk pertumbuhan tanaman. Sedangkan sebaliknya metabolit sekunder merupakan senyawa yang dibentuk pada tanaman tetapi tidak digunakan untuk pertumbuhan tanaman dan diproduksi lebih banyak pada saat tanaman dalam kondisi stres (Yuhernita dan Juniarti, 2011).

Beberapa jenis metabolit sekunder tersebut diantaranya yaitu golongan senyawa fenolik, flavonoid, saponin, minyak atsiri, terpenoid, tannin, alkaloid (terbatas pada beberapa genus), dan steroid (Saifudin, 2002).

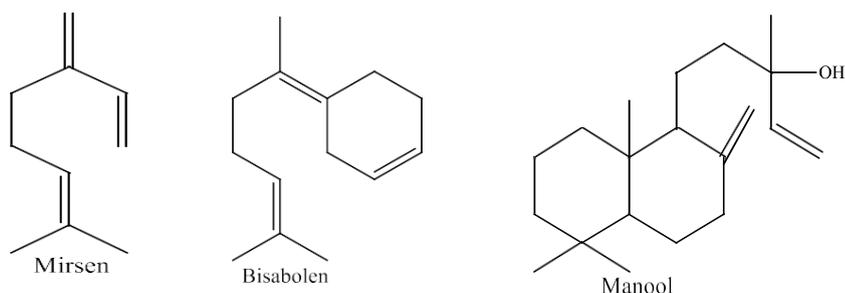
2.3.1 Senyawa Terpenoid

Terpenoid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang terbesar, dapat dilihat dari jumlah senyawa maupun variasi kerangka dasar strukturnya.

Terpenoid ditemukan berlimpah dalam tanaman tingkat tinggi, meskipun demikian, dari penelitian diketahui bahwa jamur, organisme laut dan serangga juga menghasilkan terpenoid. Selain dalam bentuk bebasnya, terpenoid di alam juga dijumpai dalam bentuk glikosida, glikosil ester dan iridoid. Terpenoid juga merupakan komponen utama penyusun minyak atsiri.

Senyawa-senyawa yang termasuk dalam kelompok terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah atom karbon penyusunnya. Senyawa terpenoid tersusun atas karbon karbon dengan jumlah kelipatan lima. Diketahui juga bahwa sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun oleh dua atau lebih unit C, yang disebut unit isopren. Disebut unit isopren karena kerangka karbon C, ini sama seperti senyawa isopren. Dari beberapa struktur senyawa terpenoid yang telah berhasil diidentifikasi, dapat diketahui bahwa unit-unit isopren tersebut saling berkaitan secara teratur di mana "kepala" dari unit yang satu berikatan dengan "ekor" dari unit yang lain. Keteraturan mengenai struktur terpenoid tersebut dirumuskan dalam suatu aturan yang disebut kaidah isopren.

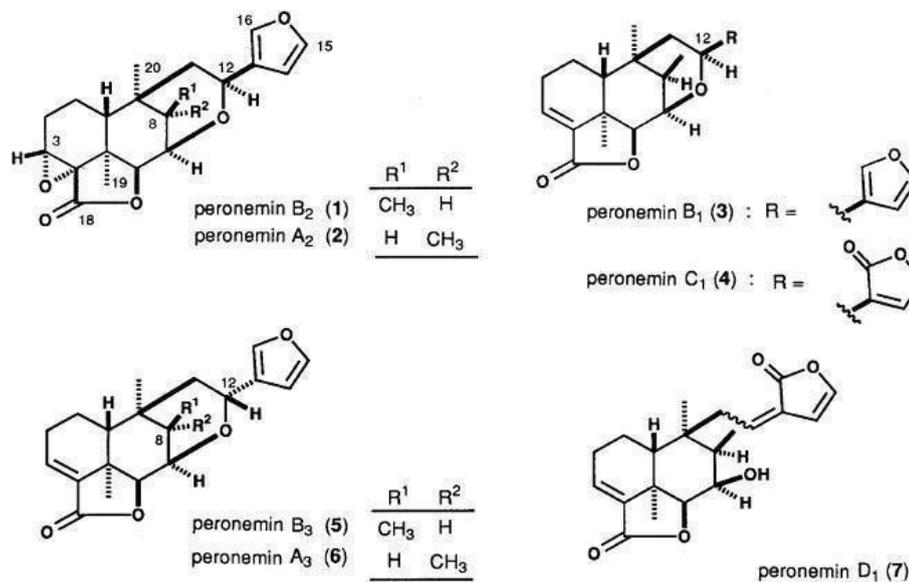
Kaidah ini menyatakan bahwa struktur molekul terpenoid dibangun oleh dua atau lebih unit isopren yang saling berikatan "kepala-ke ekor". Kaidah ini merupakan ciri khas senyawa golongan terpenoid sehingga dapat digunakan sebagai hipotesis dalam menentukan/menetapkan struktur suatu senyawa terpenoid (Alfinda, 2008)



Gambar 2. Contoh senyawa terpenoid (Alfinda, 2008)

Penelitian Kitagawa, dkk. (1994) dan uji fitokimia Halim, dkk. (2020) melaporkan jenis senyawa metabolit *clerodane* diterpenoid yaitu peronemin B₂ (1), A₂ (2), B₁ (3), C₁ (4), B₃ (5), A₃ (6), dan D₁ (7) telah ditemukan dari ekstrak daun sungkai. Hasil identifikasi ekstrak daun sungkai dilaporkan juga mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, fenolik/ tanin, dan saponin (Fransisca, dkk. 2020). Dalam penelitian lain, (Kusriani, dkk. 2015) melaporkan bahwa ekstrak daun sungkai mengandung senyawa fenolik, tannin, flavonoid, alkaloid, steroid, dan saponin.

Menurut Ningsih dan Subehan (2013) dari hasil isolasi ekstrak n-heksan daun sungkai (*Peronema canescens*.Jack) diperoleh satu senyawa, yaitu golongan senyawa terpenoid, data spektra UV dengan panjang gelombang maksimum 207, dan data IR senyawa isolat aktif mengandung gugus fungsi OH (hidroksil) -CH- alifatik, C=O (karbonil), C – O (keton), C=C- (ester siklik atau aromatik), dan CH₂ dan CH₃ (alkil alifatik)

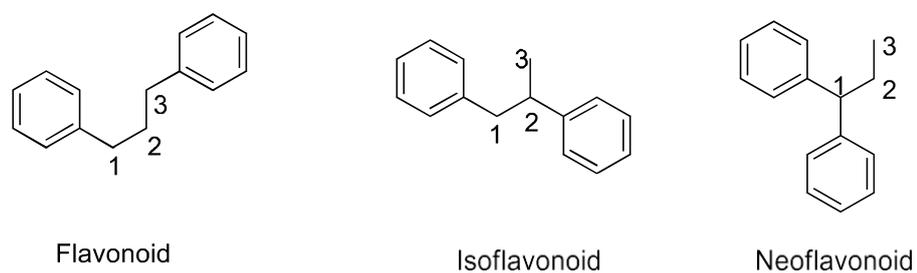


Gambar 3. Struktur senyawa peronemin B₂ (1), A₂ (2), B₁ (3), C₁ (4), B₃ (5), A₃ (6), dan D₁ (7) yang diekstrak dari daun sungkai (Halim, dkk., 2020)

2.3.2 Senyawa Flavonoid

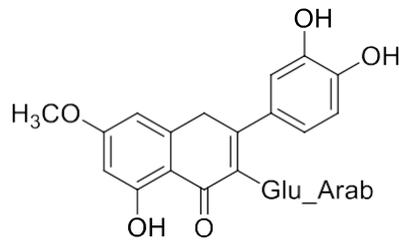
Flavonoid adalah senyawa polifenol yang banyak terdapat pada sayuran dan buah-buahan. Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan disebabkan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikosilasi pada struktur tersebut. Flavonoid telah menunjukkan perannya sebagai antioksidan, antimutagenik, antineoplastik dan aktivitas vasodilatator (Miller, 1996). Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna primer yang berupa merah, ungu, biru dan sebagian kuning yang terdapat dalam suatu tanaman. Sebagai pigmen bunga, flavonoid jelas berperan dalam menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid yang lain bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat antimikroba, antivirus dan anti insekta.

Beberapa flavonoid sengaja dihasilkan oleh jaringan tumbuhan sebagai respons terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungsi penyerangnya. Telah banyak flavonoid yang diketahui memberikan efek fisiologitertentu. Oleh karena itu, tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional.



Gambar 4. Kerangka dasar flavonoid.

Senyawa aktif dari daun sungkai telah berhasil diisolasi adalah senyawa flavonoid glikosida yang didapat dari ekstrak metanol daun sungkai.



Gambar 5 Senyawa flavonoid glikosida (Neldawati, dkk., 2013).

2.3.3 Senyawa Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa bahan alam (natural product) yang memiliki unsur nitrogen dalam struktur kimianya, biasanya dalam struktur yang heterosiklik. Berbeda dengan protein, senyawa alkaloid merupakan senyawa metabolit sekunder, sedangkan protein merupakan metabolit primer. Alkaloid dapat dihasilkan dari bahan alam seperti tanaman, hewan, bakteri maupun jamur, namun kandungan dan distribusi terbesar terdapat di dalam tanaman.

Pada umumnya senyawa alkaloid terdapat dalam 2 bentuk, yaitu bentuk bebas/bentuk basa dan dalam bentuk garamnya. Alkaloid dalam bentuk basa akan mudah larut dalam pelarut organik seperti eter, kloroform, sedangkan senyawa alkaloid dalam bentuk garam lebih mudah larut dalam air. Alkaloid biasanya berasa pahit dan memiliki aktivitas farmakologis tertentu. Sifat alkaloid hampir mirip dengan beberapa senyawa amina maka dapat bereaksi dengan garam-garam valensi dua dari merkuri (Hg), gold (Au) dan platinum (Pt 2) dan dapat membentuk kristal-kristal yang spesifik dan dapat digunakan untuk identifikasi secara kualitatif. Senyawa alkaloid akan bereaksi dengan pereaksi Wagner (iodine dalam KI) dan Dragendorff's (Bismuth KI).

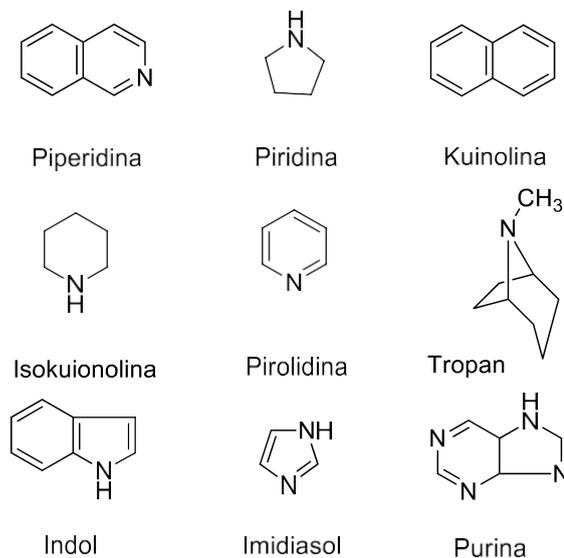
Tumbuhan yang mengandung senyawa alkaloid tersebar dalam beberapa famili dengenus dalam Angiospermae seperti familia Leguminosae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae dan Berberidaceae, Rosaceae dan

Labiatae. Pada Gymnospermae mungkin hanya terdapat pada famili Taxaceae, demikian juga untuk tanaman kelas monokotil hanya ada beberapa famili yang mengandung alkaloid antara lain Amaryllidaceae dan Liliaceae.

Kegunaan alkaloid bagi tanaman adalah sebagai berikut :

- (1) sebagai zat racun untuk melawan serangga maupun hewan herbivora.
- (2) merupakan produk akhir reaksi detoksifikasi dalam metabolisme tanaman.
- (3) regulasi faktor pertumbuhan.
- (4) sebagai cadangan unsur nitrogen.

Terdapatnya senyawa alkaloid dalam tanaman sangat bervariasi, dapat terakumulasi dalam biji seperti alkaloid fisostigmin dan arekolina; di buah seperti alkaloid kinina; di daun seperti alkaloid beladonna, kokaina; di akar seperti alkaloid reserpina, ipeka dan di korteks seperti alkaloid kinina. Berikut struktur inti dari senyawa alkaloid.



Gambar 6. Struktur inti senyawa alkaloid (Alfinda, dkk., 2008)

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa aktif atau komponen tertentu dari komponen lain yang tidak diinginkan berdasarkan prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut yang dimulai dari pelapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut.

Proses ekstraksi khususnya yang berasal dari bahan tumbuhan dilakukan dengan cara mengelompokkan bagian tumbuhan, pengeringan, penggilingan dan pemilihan pelarut. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya. Ekstraksi dapat dilakukan dengan bertingkat dan tidak bertingkat, pada ekstraksi bertingkat digunakan dua atau lebih pelarut sedangkan yaitu hanya digunakan satu pelarut untuk ekstraksi. Ekstraksi bertingkat akan menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan, sedangkan ekstraksi tidak bertingkat menghasilkan senyawa yang terekstrak merupakan ekstrak total yang mampu terekstraksi dengan pelarut tersebut (Sudarmadji *et al.*, 1989).

Prinsip metode maserasi yaitu pengambilan zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama tiga hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antaralarutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antaralarutan di luar sel dan di dalam sel. Pelarut bersifat polar yang biasa digunakan untuk ekstraksi yaitu air, metanol, etanol dan sebagainya, pelarut semi polar yaitu etil asetat, diklorometan dan sebagainya, sedangkan pelarut yang bersifat nonpolar yaitu n-heksana, petroleum eter, kloroform dan sebagainya. Ekstrak kasar ini sulit dipisahkan dengan teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa murni, sehingga ekstrak kasar perludipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang

sama (Mukhriani, 2014). Pada penelitian ini, metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi yang merupakan metode paling sederhana yang banyak digunakan baik skala kecil maupun industri, maserasi dilakukan dengan memasukkan serbuk simplisia dan pelarut yang sesuai kedalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Metode maserasi dapat menghindari senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014).

2.5 Kromatografi

Kromatografi adalah dasar teknik pemisahan multistage pada perbedaan antara komponen penyerap permukaan atau pelarut pada cairan (Meloan, 1996).

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi atau larutan campuran menjadi komponen-komponen. Prinsip kromatografi didasarkan bahwa semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau gas). Fase gerak mengalir melalui fasediam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda.

Kromatografi juga digunakan untuk keperluan preparatif, terutama untuk isolasi dalam sejumlah kecil bahan yang memiliki nilai intrinsik yang relatif tinggi. Dalam satu langkah proses kromatografi dapat memisahkan campuran ke dalam komponen masing-masing. Sampel bisa berupa gas, cair atau padat dan dapat berkisar dalam kompleksitas dari campuran sederhana dua enantiomer untuk campuran multikomponen yang mengandung banyak spesies kimia yang berbeda (Scott, 2003).

Beberapa teknik kromatografi yang banyak digunakan antara lain kromatografi kolom vakum (KCV), kromatografi lapis tipis (KLT), dan kromatografi kolom (KK) (Atun, 2014).

2.5.1 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum (KCV) merupakan salah satu metode pemisahan dan pemurnian golongan senyawa metabolit sekunder secara kasar, pemisahan tersebut memanfaatkan kolom yang berisi fasa diam (*stationer*) dan aliran fase geraknya (*mobile phase*) yang dibantu dengan pompa vakum. Fasa diam atau adsorben yang digunakan dapat berupa silika gel atau aluminium oksida (Ghisalberti, 2008). Teknik KCV dilakukan dengan suatu sistem yang bekerja pada suatu kondisi vakum secara berlanjut dan akan menghasilkan kerapatan kemasan yang maksimum atau dengan menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju alir fase gerak.

Urutan eluen yang digunakan dimulai dari eluen yang memiliki tingkat kepolaran yang rendah dan ditingkatkan secara perlahan. Eluen yang memiliki kepolaran rendah dituangkan ke dalam permukaan penjerap lalu divakum. Kolom dihisap sampai kering dan sekarang siap dipakai (Hostettmann, 1995).

Urutan eluen pada kromatografi berdasarkan kenaikan tingkat kepolarannya adalah sebagai berikut: n-heksana > sikloheksana > karbon tetraklorida > benzena > toluena > metilen klorida > kloroform > etil asetat > aseton > n-propanol > etanol > asetonitril > Metanol > air (Gritter et al., 1991).

2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah salah satu metode pemisahan kromatografi yang sering digunakan untuk metode pemisahan. Metode analisis kromatografi lapis tipis (KLT) telah menjadi bagian dari teknik analisis yang sering digunakan di laboratorium analisis dan pengembangan produk karena memiliki beberapa keuntungan.

Teknik pemisahannya sederhana dengan peralatan yang minimal dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT) untuk membentuk zona awal. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal maupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam chamber. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam.

Deteksi senyawa menjadi mudah ketika senyawa secara alami dapat berwarna atau berfluoresensi atau menyerap sinar UV, namun, perlakuan penambahan pereaksi penampak noda dengan penyemprotan atau pencelupan terkadang diperlukan untuk menghasilkan turunan senyawa yang berwarna atau berfluoresensi. Pada umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diimpregnasi indikator fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm (Wulandari, 2011).

2.5.3 Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi kolom adalah suatu metode pemisahan, dimana senyawa-senyawa tersebut dipisahkan berdasarkan pemisahan migrasinya dalam suatu sistem dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang lazim digunakan untuk kromatografi kolom adalah silika gel, alumina, arang, selulosa, sedangkan fase gerak digunakan pelarut yang sesuai. Fase diam umumnya terbuat dari serbuk silika yang dimasukkan ke kolom dalam bentuk larutan dalam suatu pelarut organik atau serbuk kering. Sedangkan pemisahan halus biasanya melibatkan fase diam non polar misal oktadesil silika atau polisakarida misal sephadex.

Ukuran partikel khusus untuk kromatografi kolom silika, ukuran partikel silika yang digunakan untuk tahap fraksinasi adalah:

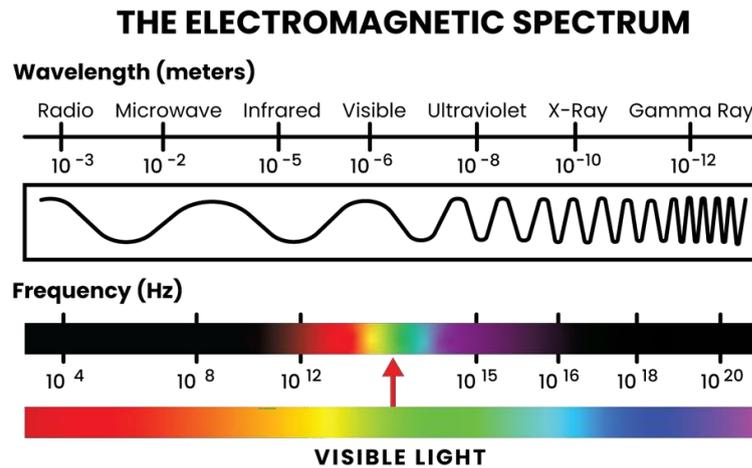
- a) 40-63 μm (230-400 Mesh), luas penggunaan yang lazim digunakan.
- b) 63-200 μm (70-230 Mesh), untuk kolom yang mengandalkan gravitasi.
Ukuran lebih kecil dari 40 μm digunakan untuk KLT (Saifudin, 2002).

Pada KK digunakan silika gel sebagai adsorben (fase diam). Silika gel dilarutkan dan diaduk dalam pelarut yang akan digunakan pada proses pengelusan hingga berbentuk bubur (slurry). Slurry tersebut dimasukkan ke dalam kolom sampai kerapatannya maksimum (tidak berongga) dan rata, kemudian sampel yang telah diimpregnasi pada silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi adsorben (fase diam). Pada saat sampel dimasukkan, diupayakan agar kolom tidak kering/kehabisan pelarut karena dapat mempengaruhi kerapatan fase diam yang telah dikemas rapat sehingga proses elusi dapat terganggu. KK dilakukan dalam kondisi normal tanpa vakum sehingga waktu yang diperlukan lebih lama, namun dengan kondisi tersebut diharapkan menghasilkan pemisahan yang lebih baik dan murni (Hernawan, 2008).

2.6 Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara materi/benda dengan radiasi elektromagnetik (Fessenden dan Fessenden, 1991). Radiasi elektromagnetik tersebut dapat berupa radiasi sinar γ , sinar-X (X-ray), ultraviolet visible (UV-Vis), infra merah (IR), gelombang mikro, dan gelombang radio (Harvey, 2000). Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang yang terdiri dari spektrofotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer merupakan alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi (Neldawati, 2013). Pada

penelitian ini digunakan berbagai macam alat spektroskopi (spektrofotometer) seperti spektroskopi UV-Vis, IR dan LCMSMS.



Gambar 7. Jenis radiasi elektromagnetik dan panjang gelombangnya (Ibnu dan Abdul, 2018)

2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah suatu metode analisis berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer dengan suatu materi (senyawa). Spektrum absorpsi daerah UV-Vis sekitar 220 nm – 800 nm.

Spektrum bagian daerah sinar ultraviolet sekitar 190-380 nm, sedangkan spektrum sinar tampak 380-780 nm (Sastrohamidjojo, 2002). Prinsip kerja spektrofotometri ini berdasarkan penyerapan sinar ultraviolet maupun sinar tampak yang menyebabkan terjadinya transisi elektron (perpindahan elektron dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi). Apabila pada suatu molekul dikenai radiasi elektromagnetik maka akan terjadi eksitasi elektron ke tingkat energi yang lebih tinggi yang dikenal sebagai orbital elektron anti

bonding. Hukum kuantitatif yang berhubungan dengan hal tersebut lebih dikenal dengan hukum Lambert- Beer.

Menurut hukum Lambert-Beer :

$$T = I_t / I_o = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot b}$$

$$A = \log I/T = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Dengan Keterangan :

T = transmittan

I_o = intensitas sinar yang datang

I_t = intensitas radiasi yang diteruskan ϵ = absorbansi molar (L/mol.cm)

c = konsentrasi (mol/L), b= tebal larutan (cm)

A = absorban (Mulja, 2000).

2.6.2 Spektrofotometri IR

Spektrofotometri IR atau FT-IR (*Fourier Transform Infrared*) adalah instrumen spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi fourier untuk mendeteksi dan menganalisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FTIR merupakan interferometer Michelson berupa alat yang digunakan untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Tujuan utama dari spektroskopi IR adalah menentukan gugus fungsi dari suatu jalur radiasi IR. Spektrometer IR dapat menentukan gugus fungsi pada jenis sampel yang beragam, seperti sampel berupa gas, cairan, dan padatan (Sudjadi, 1983). Spektrum inframerah yang dihasilkan berasal dari pentransmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel (blanko) sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang dihasilkan diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam, dkk., 2007).

Molekul yang menyerap energi infra merah akan mengalami perubahan energi vibrasi dan perubahan tingkat energi rotasi sehingga menghasilkan suatu frekuensi yang khas (Silverstein *et al.*, 2005).

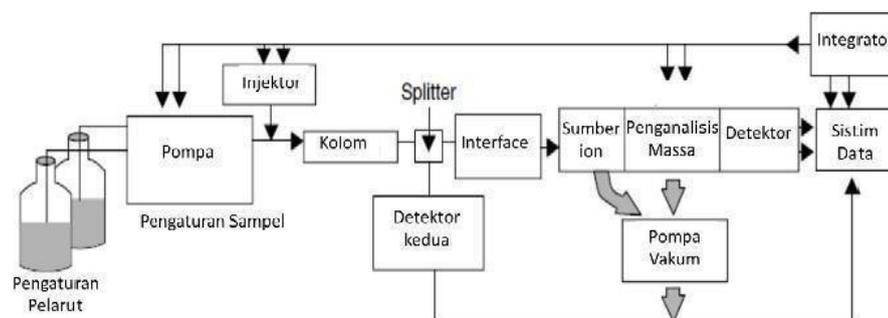
Tabel 1. Karakteristik serapan IR dari beberapa gugus fungsi

Gugus	Serapan (cm⁻¹)	Intensitas
Alkane C-H	2850-2960	Sedang
Alkena =C-H	3020-3100	Sedang
C=H	1640-1680	Sedang
Alkil halida C-Cl	600-800	Kuat
C-Br	500-600	Kuat
Alkohol O-H	3400-3650	Kuat
Cincin aromatik	1660-2000	Lemah
	1450-1600	Sedang
Amina N-H	3300-3500	Sedang
C-N	1030-1230	Sedang
Karbonil C=O	1670-1780	Kuat
Nitril C=N	2210-2260	Sedang

2.6.3 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) atau Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (KCKUT-SM/SM) merupakan suatu teknik analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan spektrometri massa sebagai detektor. LCMS-MS merupakan teknik analisis kualitatif dan kuantitatif yang efektif dengan berbagai aplikasi, seperti aplikasi klinis, termasuk pemantauan terapi obat (TDM), toksikologi, endokrinologi, pediatri, mikrobiologi, dan proteomik.

Prinsip Tandem Spektrometri Massa didasarkan pada penggunaan dua spektrometer massa bersama-sama untuk menganalisis campuran sampel. Metode ini menggunakan dua penganalisis massa yang disusun secara berurutan dengan sel kolisi (*collision cell*) di antara keduanya. Penganalisis massa digunakan untuk memilih rasio massa terhadap muatan (m/z) tertentu. Penganalisis massa pertama menganalisa rasio m/z dari ion induk, kemudian pada sel kolisi ion induk bertabrakan dengan molekul gas dan terfragmentasi menjadi ion yang lebih kecil dan diperoleh rasio m/z pada penganalisa masa kedua sebagai ion produk.



Gambar 8. Diagram skema Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (Harmita, dkk. 2019).

2.7 Uji Imunitas Terhadap Mencit Putih (*Mus musculus*)

Berdasarkan penelitian Yani (2013), bahwa dosis *Peronema canescens* untuk anti bakteri spesies protozoa parasit *Babesia gibsoni* dengan dosis 0,7 g/kgBB dan tidak menimbulkan toksisitas pada mencit yang diuji. Sehingga dosis yang digunakan tidak lebih dari 0,7 g/kgBB agar tidak menimbulkan toksisitas.

Berdasarkan kebiasaan masyarakat penggunaan daun muda *Peronema canescens* sebagai obat penurun panas adalah segenggam tangan orang dewasa dengan berat 15 g untuk sekali konsumsi, berat badan orang dewasa rata-rata 50 kg. Mencit yang akan digunakan berumur \pm 8 minggu dengan berat rata-rata 30 g. Oleh karena itu perlu dilakukan konversi dosis ekstrak daun muda *Peronema canescens* yang akan diberikan pada mencit.

Penelitian ini menggunakan metode *cardiac puncture* (tusukan jantung). Teknik ini merupakan teknik yang cocok untuk mendapatkan sampel tunggal dalam volume yang cukup besar dan berkualitas. *Cardiac puncture* bisa dilakukan untuk hewan coba yang di euthanasia, di bawah anestesi terminal, ataupun tidak memerlukan sampel untuk histologi jantung (Malole 1989) penelitian ini dilakukan secara eksperimental in vivo pada hewan uji yakni mencit putih (*Mus. musculus*).

Pengambilan sampel darah mencit menggunakan teknik *cardiac puncture* (tusukan jantung). yaitu sebanyak 25 ekor *M. musculus* jantan dengan umur 7-8 minggu, dan berat badan berkisar antara 30 g. Mencit dibagi dalam 5 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor *Mus musculus*. Lima kelompok tersebut yaitu, kelompok kontrol negatif yang diberi air, kelompok kontrol positif yang diberikan imunos dan sebagai kelompok perlakuan diberikan tiga macam dosis bertingkat, yaitu dosis 0,186 mg/kgBB; 0,375 mg/kgBB; dan 0,5625 mg/kgBB. Perlakuan dengan satu kali gavage, pada siang hari, dengan rentang waktu 24 jam. Dalam perhitungan jumlah sel darah putih (leukosit) ini diperlukan darah yang tidak terlalu banyak.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Desember 2021 sampai dengan bulan Juni 2022 bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi- LIPI Bogor. Analisis spektroskopi yang digunakan adalah spektroskopi UV-Vis dan FT-IR yang dilakukan di Laboratorium Analitik, Institut Teknologi Bandung. Uji imunitas dilakukan di Laboratorium Zoologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas berbagai ukuran, *rotary evaporator* Buchii/R210, *drying oven* Jisico, neraca analitik Wigen Houser, satu set alat pengukur titik leleh, mikropipet, kandang mencit, nampan plastik, botol minum mencit, pisau pemotong (*cutter*), blender, satu set alat *gavage* jarum suntik No 25, *haemocytometer*, mikroskop elektron axio Zeiss A1, sarung tangan, *trash bag*, kertas label, satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV), satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), satu set alat Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG), lampu UV λ 254 nm, spektrofotometer FTIR Shimadzu Prestige-21, spektrofotometer ultra ungu-tampak (UV-Vis) Hitachi model 150/20, dan LC- MS Shimadzu.

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah daun sungkai (*Peronemacanesens* Jack) dan mencit (*Mus. musculus*) jantan galur *swiss webster*. Bahan kimia yang digunakan antara lain akuades (H_2O), H_2SO_4 pekat, HCl pekat, serbuk Mg, etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), n-heksana ($n-C_6H_{14}$), isopropil alkohol (IPA), aseton, diklorometana, kloroform, etanol (EtOH), asam asetat (CH_3COOH) glasial, imunos, pereaksi serium sulfat, pereaksi meyer, larutan *Turk*, silika gel merck 60 G, plat KLT silika gel DC Kieselgel 60 W, dan silika gel Merck 60 GF₂₅₄(63-200 μm) untuk kromatografi kolom gravitasi.

3.2 Tahapan Penelitian

3.2.1 Pengambilan dan persiapan sampel

Daun sungkai diambil di Gg. Kurnia 5, Tj. Harapan, Kec. Kotabumi Selatan, Kab. Lampung Utara, Lampung 34515, Indonesia. Sebelumnya, sampel daun sungkai dideterminasi di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI. Sampel daun sungkai dicuci secara berulang untuk menghilangkan kotoran yang menempel, dikeringkan tanpa terpapar sinar matahari secara langsung selama 1 minggu, dan ditimbang. Kemudian sampel daun sungkai kering digiling hingga menjadi bubuk, lalu ditimbang untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Ahmad dan Ibrahim, 2015)

3.2.2 Ekstraksi bubuk daun sungkai

a. Proses ekstraksi

Ekstraksi bubuk daun sungkai dilakukan menggunakan metode maserasi (Ahmad dan Ibrahim, 2015) Sebanyak 2,5 kg bubuk tersebut direndam (dimaserasi) menggunakan pelarut metanol 1x24 jam dengan pengulangan 3 kali. Lalu, maseratdipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh kemudian ditimbang.

b. Proses partisi

Selanjutnya, ekstrak pekat metanol disuspensi menggunakan pelarut metanol-air. Lalu dipartisi menggunakan pelarut n-heksana, sehingga diperoleh fraksi n-heksandan fraksi air. Untuk fraksi air, dipartisi menggunakan pelarut etil asetat sehingga diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Baik fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat, dievaporasi pada suhu 30-40 °C sehingga diperoleh ekstrak kasar n-heksan dan etilasetat.

3.2.3 Uji Fitokimia

Uji fitokimia mengadopsi dari metode (Fransisca, dkk., 2020). Uji dilakukan terhadap ekstrak kasar metanol, n-heksan, dan etil asetat untuk mengetahui senyawametabolit sekunder.

a. Uji saponin

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah akuades 5 mL, dan dikocok sekitar 30 detik. Hasil positif saponin apabila timbul busa selama 15 menit.

b. Uji terpenoid dan steroid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat. Hasil positif terpenoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah dan ungu, sedangkan hasil positif steroid ditandai dengan warna hijau dan biru.

c. Uji alkaloid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 5 tetes kloroform dan pereaksi meyer. Larutan yang memberikan warna putih kecoklatan menunjukkan uji positif alkaloid.

d. Uji flavonoid

Masing-masing ekstrak kasar sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan 0,5 g serbuk Mg dan 5 mL HCl pekat sedikit demi sedikit. Apabila larutan berubah menjadi warna merah atau kuning menunjukkan uji positif flavonoid.

3.2.4 Fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian

Proses fraksinasi, pemisahan, dan pemurnian mengadopsi metode dari (Ningsih dkk., 2013). Masing-masing sampel ekstrak kasar difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Sebelum dilakukan KCV, terlebih dahulu dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen dengan perbandingan tertentu untuk mengetahui jumlah komponen, kemurnian sampel, dan sistem pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom gravitasi (KKG). Kolom KCV dimasukkan dengan gel silika Merck G 60 sebanyak 10 kali berat sampel, dan divakum. Eluen dimasukkan berurutan berdasarkan tingkat kepolaran rendah ke tinggi, dan divakum hingga siap digunakan. Sampel dilarutkan dalam aseton, diimpregnasi dengan gel silika merk G 60, dan dimasukkan di bagian atas kolom. Proses elusi digunakan eluen etil asetat : n-heksana 0% sampai etil asetat 100%. Fraksi-fraksi hasil elusi dari masing-masing pelarut ditampung, dan dimonitoring menggunakan metode KLT menggunakan eluen pelarut yang sesuai, baik tunggal maupun campuran pelarut dengan perbandingan tertentu. Noda atau bercak KLT dilihat menggunakan lampu UV λ 254 nm, dan divisualisasi menggunakan larutan serum sulfat. Nilai *Retention factor* (R_f) dari setiap noda fraksi dihitung, dan dicatat. Untuk fraksi dengan nilai R_f sama digabung untuk difraksinasi lebih lanjut dan diuji bioaktivitasnya. Fraksi yang bersifat aktif kemudian diuji KLT kembali, dipisahkan, dan dimurnikan menggunakan KKG yang telah dimasukkan silika merk 60 GF₂₅₄ (63-200 μ m) pada kolomnya untuk mendapatkan pemisahan yang baik dan diperoleh isolat yang murni.

3.2.5 Analisis kemurnian

Analisis kemurnian pada isolat dilakukan menggunakan uji KLT dan uji titik leleh sesuai prosedur (Hidayati, 2020). Uji KLT terhadap isolat menggunakan beberapa campuran eluen dan divisualisasi menggunakan larutan serium sulfat. Uji titik leleh dilakukan terhadap sampel isolat yang telah dibuat dalam bentuk bubuk kristal dan dilelehkan menggunakan alat pengukur titikleleh.

3.2.6 Uji bioaktivitas terhadap mencit

Uji bioaktivitas menggunakan ekstrak kasar sebelum pemurnian terdiri dari uji imunitas dan perhitungan jumlah leukosit mengadopsi metode dari (Hidayati, 2020)

a. Uji imunitas

Uji imunitas dilakukan secara eksperimental *in vivo* terhadap mencit putih (*Mus. musculus*) jantan galur *swiss webster*. Sebanyak 25 ekor mencit dengan umur 7-8 minggu, dan berat badan berkisar antara 30 g dibagi dalam 5 kelompok. Detail perlakuan dijelaskan pada **Tabel 2**. Lima kelompok tersebut yaitu, kelompok P1 kontrol (-) yang diberi air, kelompok P2 kontrol (+) yang diberikan imunos, dan kelompok yang diberikan tiga macam dosis bertingkat, yaitu P3, P4, dan P5. Uji perlakuan dilakukan dengan satu kali *gavage*, pada siang hari selama 24 jam.

Tabel 2. Perlakuan uji imunitas terhadap mencit.

Perlakuan	Dosis ekstrak kasar/ isolat (mg/kgbb)	Jumlah mencit (ekor)	Jumlah rata-rata leokosit
P1 kontrol (-) air	0	5	5290
P2 kontrol (+) imunos	0,07	5	7910
P3	0,186	5	10795
P4	0,375	5	6300
P5	0,5625	5	4300

b. Perhitungan jumlah leukosit

Sampel darah mencit dari masing-masing perlakuan diambil melalui ekornya mulai tahap pengambilan hingga pengamatan mikroskop dengan perbesaran 40X. Hasil dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Jumlah sel darah putih (SDP)} = N_e \times p \times 0.4$$

Keterangan : N_e yaitu jumlah sel-sel darah putih hasil pengamatan mikroskop dalam 4 kotak besar bagian pinggir, dan p adalah pengenceran.

3.2.7 Karakterisasi isolat

Sampel isolat yang sudah murni dianalisis menggunakan Spektrofotometri Ultraungu-tampak (UV-Vis), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) (Ningsih, dkk., 2013)

V. KESEMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Senyawa noda tunggal pada KLT berhasil diisolasi dengan kode PS1a .
2. Analisis dari LCMS/MS dan didukung dengan UV-Vis serta FTIR senyawa yang berhasil diisolasi, diindikasikan senyawa tersebut adalah *pheopitin a*.
3. Ekstrak daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) diduga dapat meningkatkan sistem imun ditandai dengan tingginya jumlah total leukosit setelah perlakuan.
4. Dosis rendah daun sungkai memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan K(+), dosis sedang, dan dosis tinggi.

5.2. Saran

Adapun saran untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut sehingga didapat senyawa murni yang berasal dari daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta uji imun isolat murni untuk mengetahui aktivitas senyawa murnitersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., dan Ibrahim, A. (2015). Bioaktivitas ekstrak metanol dan fraksi n-heksana daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap larva udang (*Artemia salina* leach). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1 (3) : 114 – 119.
- Alfinda N. K, Nanik S. A, Mulyadi T & Bambang K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Airlangga. UI press. Surabaya.
- Anam, C., Sirojudin, dan Firdausi, K.S. 2007. Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *J. Fisika FMIPA Undip*. **10**: 79-85.
- Andriani Y, 2014, The Miraculous Mahkota Dewa , Article in *Voyages of Discovery UMT 2*: 9, Publisher : Universiti Malaysia Terengganu, Kuala Terengganu
- Andriani, F., Sundaryono, A., & Nurhamidah. (2017). Uji Aktivitas Antiplasmodium Fraksi N-Heksana Daun *Peronema Canescens* Terhadap MusMusculus. *Alotrop: Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 1(1), 33–38.
- Andriani. Y, 2010, Study Correlation between antioxidant activity and total phenolics content of *Phaleria macrocarpa* leaves extract, *UMTAS International conference*, Universiti Malaysia Terengganu (UMT) Kuala Terengganu Malaysia 6-8 Mei
- Andriani. Y, Mohamad, H., 2013, Potential Therapeutic Lead Compounds From Our Local Coastal Forest, , *The 26th Symposium of Malaysia Analytical Sciences (SKAM 26)* , Khuching Serawak Malaysia, 4-5 December.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. **8**(2): 53-61. Departemen Kehutanan. 2006. *Seleksi Pohon Plus*. Balai Perbenihan Tanaman Hutan Jawadan Madura. Sumedang.

- Azwari, Z. 2021. Aktivitas Imonomodulator Senyawa Alkaloid yang diisolasi dari kulit Batang Tumbuhan Badak. *Skripsi*. Unand.
- Block, K. J and Mead, M. N. 2003 Immune System Effects of Echinacea Ginseng and Astragalus. *Integrative Cancer Therapies*. 2(3): 247-267
- Fessenden, R. J. dan Fessenden J. S. 1991. *Kimia Organik* Jilid I. Erlangga. Jakarta. **311-317**.
- Fransisca, D., Kahanjak, D. N., dan Frethernety, A. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer. *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan*. 4 (1) : 460 – 470.
- Ghisalberti, E.L. 2008. *Detection and Isolation of Bioactive Natural Products in Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. Taylor and Francis Group. Inc. USA. **23-27**.
- Gresinta, E. 2012. *Uji Potensi Daun etlingera hemisphaeria Terhadap Jumlah Leukosit Mus musculus dan Implementasinya Sebagai Modul Pembelajaran Sistem Imun*. Bengkulu: Tesis UNIB
- Gritter, R. J., Bobbit, J. M, and A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata*. Institut Teknologi Bandung. Bandung. **266**. Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia. Ed II*. Diterjemahkan Oleh Kosasih Patmawinata dan Iwang Sudiro. Institut Teknologi Bandung. Bandung. **147**.
- Gross, J. 1991. *Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Hadi, I. 2011. *Identifikasi Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sungkai (Peronema canescens Jack)*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman Samarinda. Samarinda.
- Halim, K. F. K., Jalani, K. J., Mohsin, H. F., and Wahab, I. A. (2020). Phytochemical Screening of *Peronema Canescens* Jack. *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science*. 1 (2020) : 7-15.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry in 1st ed*. **369:372:402**.
- Hernawan. 2008. *Isolasi Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Artocarpus rigida* (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Hidayati, I. (2020). Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) serta uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Hostettmann, K. M. 1995. *Cara kromatografi Preparatif Penggunaan pada Senyawa Bahan Alam*. ITB. Bandung.
- Imelda, M., Estiati, A. M. Y., Sari, L., & Febryana, D. A. N. (2007). *Keragaman Genetik Bibit Sungkai (Peronema canescens Jack) Hasil Kultur Jaringan tissue culture*. 8, 54–57.
- Ibnu., G., dan Abdul., R. 2018. *Spektroskopi Molekuler Untuk Analisis Farmasi*. UGM Press. Yogyakarta.
- Jalius, & Muswita. (2013). Eksplorasi Pengetahuan Lokal tentang Tumbuhan Obat di Suku Batin, Jambi. *Biospecies*, 6(1), 28–36. <https://online-journal.unja.ac.id/biospecies/article/view/688>.
- Kade Harmita, Yahdiana Harahap, Supandi. 2019. *liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)*. PT ISFI Penerbitan. Jakarta.
- Kartasapoetra, G..1996. *Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat*. CV Amalia. Jakarta,hal 25.
- Kitagawa, I., Simanjuntak, P., Hori, K., Nagami, N., Mahmud, T., Shibuya, H., and Kobayashi, M. (1994). Indonesian Medicinal Plants. VII. Seven New Clerodane-Type Diterpenoids, Peronemins A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, and D₁, from the Leaves of *Peronema canescens* (Verbenaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 42 (5) :1050 -1055.
- Kusriani, H.R., Nawawi, A. Turahman, T. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Kulit Batang Dan Daun Sungkai (*Peronema Canescens Jack*) Terhadap *Staphylococcus aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia Coli* Atcc 25922. *J. Farmasi Galenika*. **02:01**.
- Latief, Madyawati, Nelson, N., Amanda, H., Tarigan, I. L., & Aisyah, S. (2020). Potential Tracking of Cytotoxic Activities of Mangrove Perepate (*Sonneratia alba*) Root Extract as an Anti-Cancer Candidate. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*, 5(2), 48–55.
- Meloan, C.F. 1996. *Chemical Separation. Principles, Techniques and Experiments*. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Malole, MBM., 1989. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*. IPB. Bogor . hal 10
- Miller, T.1996. *Living In The Environment*. Mc Graw Hill. USA.

- Mohamad H , Andriani Y , Bakar K, Siang CC, Syamsumir, DF Alias A and RadziSAM, S, 2015, Effect of drying method on anti-micro-bial, antioxidant activities and isolation of bio-active compounds from *Peperomia pellucida* (L)Hbk, *Journal of Chemical and Pharma-ceutical Research*, 7(8). [http:// www.jocpr.com](http://www.jocpr.com).
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*. 7(2): 361-367.
- Mulja, M.D.S. 2000. *Analisis Instrumental*. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Neldawati, Ratnawulan, dan Gusnedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pillarof Physics*. 2: 76-83.
- Ningsih, A., & Ibrahim, A. (2013). Aktivitas Antimikroba Ekstrak Fraksi N-Heksan Daun Sungkai (*Peronema Canescens*: Jack) Terhadap Beberapa Bakteri Dengan Metode KLT-Bioautografi. *Journal Of Tropical Pharmacy And Chemistry*, 2(2), 76–82.
- Ningsih, A., Subehan, dan Djide, M. N. (2013). Potensi antimikroba dan analisis spektroskopi isolat aktif ekstrak n-heksan daun sungkai (*Peronema canescens*: Jack) terhadap beberapa mikroba uji. *Molekul*. 11 (1) :101-111.
- Park, S., B.K. Park., J.J Choi., S.J. Yoon. (2014). Pheophytin a and Chlorophyll a Suppress Neuroinflammatory Responses in Lipopolysaccharide and Interferon- γ -stimulated BV2 Microglia. *Life Science*. 103 (2).
- Plantamor. 2008. *Plantamor Situs Dunia Tumbuhan, Informasi Spesies Sungkai*. Diakses tanggal 13 April 2020 dari <http://plantamor.com/species/info/peronema/canescens>.
- Ramadenti, F., Sundaryono, A., & Handayani, D. (2017). Uji Fraksi Etil Asetat Daun *Peronema canescens* terhadap *Plasmodium berghei* pada *Mus musculus*. *Alotrop: Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 1(2), 89–92.
- Saifudin, A. 2002. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. 33;39;46;52;87;88.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. *Kromatografi*. Liberty. Yogyakarta. Hlm. 35-36.
- Scott, R.P.W. 2003. *Principles and Practice of Chromatography*. 1.
- Samuel C E 2001 Antiviral Actions of Interferon. *Clinical microbial* 14(4): 778-809

- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds in 7th ed.* **191-195.**
- Sinambela, J.M. 2002. *Pemanfaatan Plasma Nutfah dalam Industri Jamu dan Kosmetika Alami.* Buletin Plasma Nutfah
- Sudarmadji, S., Haryono., dan Suhardi, B. 1989. *Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian, edisi ketiga.* Badan Pengembangan dan Penelitian Industri Surabaya. Surabaya.
- Sudjadi. 1985. *Penentuan Struktur Senyawa Organik.* cetakan 1. Ghalia Indonesia. Jakarta. **283.**
- Sumarsi dan Slamet P. 1992. *Sam-Sit dari Cina dan pemanfaatannya dalam penyembuhan tumor.* Departemen Kesehatan Republik Indonesia dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis.* PT. Taman Kampus Presindo. Jember. **1-4.**
- Yani Ariefa Primair, 2013. *Kearifan Lokal Penggunaan Tumbuhan Obat oleh Suku Lembak Delapan di Kabupaten Bengkulu Tengah Bengkulu.* Semirata 2013. Unila. Lampung
- Yani, A. P., and Putranto, A. M. H. (2014). Examination of the sungkai's young leaf extract (*Peronema canescens*) as an antipyretic, immunity, anti plasmodium and teratogenicity in mice (*Mus.musculus*). *International Journal of Science and Engineering.* 7 (1) : 30-34.
- Yuhernita dan Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara Sains.* **15(1):48-52.**