

**IDENTIFIKASI DAN ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIINFLAMASI
DARI KULIT BATANG TUMBUHAN TURI PUTIH (*Sesbania grandiflora*
(L.) Poir) MENGGUNAKAN METABOLOMIK BERBASIS LC-MS/MS**

(Skripsi)

Oleh

WULANDARI AGUSTIN



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

ABSTRAK

IDENTIFIKASI DAN ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIINFLAMASI DARI KULIT BATANG TUMBUHAN TURI PUTIH (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) MENGGUNAKAN METABOLOMIK BERBASIS LC-MS/MS

Oleh

Wulandari Agustin

Turi putih (*S. grandiflora*) merupakan salah satu tumbuhan asli Indonesia yang biasa dimanfaatkan sebagai antiinflamasi. Tujuan penelitian ini mendapatkan senyawa bioaktif antiinflamasi dari hasil isolasi menggunakan metabolomik berbasis LC-MS/MS. Senyawa hasil isolasi didapatkan melalui ekstraksi dengan variasi konsentrasi pelarut MeOH 100%, EtOAc 100% dan MeOH:EtOAc 50% dengan uji antiinflamasi menggunakan metode penghambatan denaturasi protein. Aktivitas antiinflamasi yang paling baik diperoleh dari ekstrak EtOAc 100% dengan rata-rata nilai IC₅₀ sebesar 117,54 µg/mL. Dari hasil analisis LC-MS/MS didapatkan 106 senyawa *known* dan 394 senyawa *unknown*. Ekstrak sampel kulit batang tumbuhan turi putih dikelompokkan berdasarkan variasi pelarut pengeksrak melalui analisis *partial component analysis* (PCA) dengan total *primary component* (PC) 83% saat menggunakan data luas area dan 60% saat menggunakan data intensitas. Data LC-MS/MS yang berupa luas area dan intensitas dikorelasikan dengan aktivitas antiinflamasi menggunakan *orthogonal partial least squares-discriminant analysis*. Hasil analisis OPLS-DA menunjukkan bahwa senyawa 36 (Sesbgrandiflorain C), senyawa 44 (Sesbgrandiflorain B) dan senyawa 84 (2-metil-5-{2-[2-(4-metil-3,6-dioksosikloheksa-1,4-dienil)etoksi]etil}benzo-1,4 quinon) merupakan metabolit penciri *known* yang diduga berkontribusi *major* (utama) pada aktivitas antiinflamasi ekstrak kulit batang tumbuhan turi putih. Senyawa murni berhasil diisolasi dari ekstrak etil asetat 100% kulit batang tumbuhan turi putih melalui kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Isolat yang beraktivitas antiinflamasi diperoleh berupa kristal kuning sebanyak 7,2 mg dan 5 mg diduga sebagai senyawa sesbgrandiflorain C dan sesbgrandiflorain B berdasarkan hasil analisis dari LC-MS/MS serta OPLS-DA.

Kata Kunci: *S. grandiflora*, metabolomik, antiinflamasi, LC-MS/MS, PCA, OPLS-DA

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND ISOLATION BIOACTIVE ANTI-INFLAMMATORY COMPOUNDS FROM THE STEAM BARK OF TURI WHITE PLANT (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) USING METABOLOMIC-BASED ON LC-MS/MS

By

Wulandari Agustin

White turi (*S. grandiflora*) is one native Indonesian plant which is commonly used as an anti-inflammatory. The aim of this study was to obtain anti-inflammatory bioactive compounds from the results of isolation based on LC-MS/MS-based metabolomics. The isolated compounds were obtained by extraction with varying concentrations of 100% MeOH, 100% EtOAc and 50% MeOH:EtOAc with anti-inflammatory tests using the protein denaturation inhibition method. The best anti-inflammatory activity was obtained from 100% EtOAc extract with an average IC_{50} value of 117.54 $\mu\text{g/mL}$. From the results of the LC-MS/MS analysis, 106 known compounds and 394 unknown compounds were obtained. The results of the LC-MS/MS analysis, 106 known compounds and 394 unknown compounds were obtained. Extract samples of turi putih stem bark were grouped based on variations in extracting solvents through partial component analysis (PCA) with a total primary component (PC) of 83% when using area data and 60% when using intensity data. LC-MS/MS data in the form of area and intensity were correlated with anti-inflammatory activity using orthogonal partial least squares-discriminant analysis. The results of the OPLS-DA analysis showed that compound 36 (sesbagrandidflorain C), compound 44 (sesbagrandidflorain B) and compound 84 (2-methyl-5-{2-[2-(4-methyl-3,6-dioxocyclohexa-1,4)dienyl]ethoxy}ethyl}benzo-1,4-quinone) is a known characteristic metabolite which is thought to contribute majorly to the anti-inflammatory activity of turi putih stem bark extract. The pure compound was isolated from 100% ethyl acetate extract of the bark of the turi putih plant by means of vacuum liquid chromatography (KCV) and gravity column chromatography (KKG). Isolates with anti-inflammatory activity were obtained in the form of yellow crystals of 7.2 mg and 5 mg suspected as sesbagrandidflorain C and sesbagrandidflorain B based on the analysis results from LC-MS/MS and OPLS-DA.

Keywords: *S. grandiflora*, metabolomic, anti-inflammatory, LC-MS/MS, PCA, OPLS-DA

**IDENTIFIKASI DAN ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIINFLAMASI
DARI KULIT BATANG TUMBUHAN TURI PUTIH (*Sesbania grandiflora*
(L.) Poir) MENGGUNAKAN METABOLOMIK BERBASIS LC-MS/MS**

Oleh

WULANDARI AGUSTIN

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS

Pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023

Judul Skripsi

: **IDENTIFIKASI DAN ISOLASI SENYAWA
BIOAKTIF ANTIINFLAMASI DARI KULIT
BATANG TUMBUHAN TURI PUTIH
(*Sesbania grandiflora* (L.) Poir)
MENGUNAKAN METABOLOMIK
BERBASIS LC-MS/MS**

Nama Mahasiswa

: **Wulandari Agustin**

Nomor Induk Mahasiswa

: 1817011038

Program Studi

: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. **Komisi Pembimbing**

Prof. Dr. Noviany, M. Si.
NIP. 197311191998022001

Dr. Mohamad Rafi, M.Si.
NIP. 197703162006041010

2. **Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Lampung**

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. **Tim Penguji**

Ketua

: Prof. Dr. Noviany, M.Si.



Sekretaris

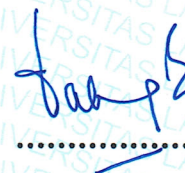
: Dr. Mohamad Rafi, M.Si.



Penguji

Bukan Pembimbing

: Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.



2. **Plt Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 03 April 2023

PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Wulandari Agustin
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011038
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul **“Identifikasi dan Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi dari Kulit Batang Tumbuhan Turi Putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) Menggunakan Metabolomik Berbasis LC-MS/MS”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi

Bandar Lampung, 05 April 2023
Yang menyatakan,



Wulandari Agustin
NPM 1817011038

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, Lampung pada tanggal 17 Agustus 2000 sebagai anak bungsu dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Marno dan Ibu Mujiati. Penulis mengawali pendidikan formal di TK Al-Hikmah pada tahun 2005-2006, kemudian melanjutkan di SD

Negeri 1 Labuhan Ratu tahun 2006-2012, selanjutnya di SMP PGRI 4 Bandar Lampung tahun 2012-2015 dan melanjutkan di SMA Negeri 5 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis diterima di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi (SBMPTN).

Pengalaman organisasi penulis dimulai sejak menjadi Anggota Kader Muda Himaki (KAMI) FMIPA Universitas Lampung periode 2018, Anggota Biro Kesekretariatan Himaki FMIPA Universitas Lampung Periode 2019 serta Anggota Biro Kesekretariatan Himaki FMIPA Universitas Lampung Periode 2020. Pada bulan Februari hingga Maret 2021, penulis melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Lingkungan II Kelurahan Kedaton, Kecamatan Kedaton, Kota Bandar Lampung selama 40 hari. Penulis berkesempatan menjadi *Oral Presenter* dalam Konferensi Internasional *The 4th International Conference on Applied Sciences, Mathematics and Informatics (ICASMI)* pada tahun 2022.

Selama masa perkuliahan, penulis menjadi salah satu mahasiswa penerima beasiswa Bidikmisi pada tahun 2018 hingga 2022. Penulis pernah menjadi Asisten Praktikum Kimia Organik I (2021), Kimia Organik I– Kimia Analitik I Jurusan Kimia (2021) , Kimia Organik II – Kimia Fisik I Jurusan Kimia (2022), Kimia Organik Jurusan Biologi (2021) dan Kimia Organik Jurusan Biologi (2022). Penulis juga pernah menjadi tutor Mata Kuliah Kimia Organik I dan Kimia Organik II pada semester ganjil 2022/2023.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya
Penulis mempersembahkan karya ini teruntuk:*

*Kedua Orang Tua Tersayang
Yang telah membesarkan, mendidik, mendo'akan, memberikan kasih sayang dan
dukungan kepada penulis, Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang
tiada henti diberikan kepada penulis*

*Kakak dan Keluarga Besar Penulis
Yang telah memberikan dukungan dan semangat*

*Prof. Dr. Noviany, M.Si. dan Dr. Mohamad Rafi, M.Si.
Yang telah sabar membimbing, memberikan ilmu, serta saran dan masukannya
selama menempuh pendidikan dan penelitian di kampus*

*Para Sahabat-sahabat
Yang selalu sabar menemani, memberikan keceriaan, motivasi dan semangat*

*Almamater Tercinta
Universitas Lampung*

MOTTO

“Maka, nikmat Tuhanmu manakah yang kamu dustakan?”

(QS. Ar-Rahman:13)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(Q.S. Al-Baqarah : 286)

“Sesungguhnya kemenangan itu beriringan dengan kesabaran.

Jalan keluar beriringan dengan kesukaran.

Dan sesudah kesulitan pasti akan ada kemudahan”

(H.R. Tirmidzi)

“Life is hard and everything doesn't always go well,

but we have to dare and move on our lives”

(Min Yoon Gi)

“Fokuslah menjadi diri yang baik, entah terlihat atau tidak terlihat oleh manusia”

(Wulandari Agustin)

SANWACANA

Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT. atas segala nikmat dan karunia-Nya yang tak terhingga serta kasih sayang yang selalu diberikan pada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Identifikasi dan Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi dari Kulit Batang Tumbuhan Turi Putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) Menggunakan Metabolomik Berbasis LC-MS/MS”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Shalawat beriring salam selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga, sahabat, dan para pengikutnya hingga akhir zaman nanti.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Teriring doa'a yang tulus, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Penyemangat terbesar dalam hidupku, kedua orang tua, Bapak Marno dan Ibu Mujiati, yang selalu mendo'akan, memberikan kasih sayang, motivasi dan dukungannya kepada penulis dalam keadaan apapun.
2. Ibu Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si. selaku Pembimbing Pertama yang banyak memberikan ilmu, bimbingan, dukungan, doa, semangat, serta kritik dan saran kepada penulis selama proses perencanaan, pelaksanaan, dan penulisan dalam skripsi ini.
3. Bapak Dr. Mohamad Rafi, M.Si. selaku Pembimbing Kedua yang telah memberikan ilmu, bimbingan, bantuan, kritik, dan saran kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku Pembahas yang telah memberikan banyak saran dan masukan positif kepada penulis.
5. Bapak Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dan Pembimbing Akademik yang selalu sabar

mebimbing, memberikan dukungan dan motivasi kepada penulis selama masa perkuliahan.

6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku PLT. Dekan FMIPA Universitas Lampung.
7. Bapak/Ibu Dosen dan Kepala Laboratorium Jurusan Kimia atas bantuan dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung.
8. Para *Staf* dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila, Pak Rudi, Bu Endang, Mba Yuni, Mas Nomo, Mba Wit dan Mba Della atas segala bantuan yang diberikan kepada penulis.
9. *One and only one, My Bro* Muhammad Ryan Lesmana semoga sehat selalu, dilimpahkan rezeki dan segera dipertemukan dengan jodoh.
10. *Bestie* Pejuang S.Si. : Reyzka Aulia Wihardini, S.Si. (Rey), Rizka Nalia Pumita, S.Si. (Kaks Kana), dan Nur Mayana Putri, S.Si. (May may may) *Big Thanks for* kebersamaannya dalam berkeluh kesah, canda tawa, serta dukungan dan motivasinya untuk lulus bersama. Mari kita ganti nama grup.
11. *Bestie* Sederajat : Mia, Wo Riva, nek Rani Wardani, S.Pd., nek Rika, Nova, Pipit dan Indah Terimakasih atas kebersamaannya semoga kita sehat selalu dan bisa bangga orang tua. Bisa yok bisa, serius jangan pance.
12. *Bestie* Rejomulyo *City* : Nivia Deza Putri, S.Adm., Selfia Indriani, S.E., Mba Dian Kartika dan Sri Dewi Mulyani. Terimakasih atas kebersamaan, do'a, dukungan serta motivasinya.
13. *My partner Noviany's Research 2018*, Rista, Reni, dan Ofri *Big Thanks for* kebersamaan, ilmu dan semangatnya. Aku yakin kalian bisa.
14. Kakak-kakak *Noviany's Research Group* : Kak Arif, Kak Tosa, Kak Hanif, Mba Habibah, Mba Uswatun, Mba Isna, Mba Dhita, Mba Feni, Mba Azizah, Mba Aul dan kakak-kaka yang lainnya. Terimakasih banyak atas ilmu, dukungan dan semangatnya. Maaf ya kak/mba suka ngepotin.
15. Adik-adik *Noviany's Research Group* : Jihan, Devi, Syaidah, Vier, Anatasya, Dilla, Siti, Icik, Vio, Govin, Inggit dan Julia terimakasih atas kerja sama seta *support* nya selama ini.

16. Kakak-kakak Lab. Kimia Organik dan Biokimia : Kak Arif, Kak Hanif, Kak Hendri, Mba Rinda, Mba Kartika, Mba Ramy, Mba Aul, Mba Azizah, Mba Putri, Mba Nisa yang telah banyak membantu penulis. Terimakasih banyak atas ilmu, dukungan dan semangatnya
17. Kawan-kawan Lab. Kimia Organik : Rista, Reni, Ofri, Antin, Armi, Andi, kaks Farah, Hendriko, Eni, Nia, Andika, Jihan, Devi, Syaidah, Vier, Rizky, Kania, Akmal, Ara, Dira dan Nabilla. Terimakasih atas bantuan, ilmu, semangat dan dukungannya kepada penulis.
18. Teman-Teman *Chemistry'18* Kelas C : Pak Vincent, Aldo, Reyhan, Randi, Sahrul, Kak Widi, Fauzan, Oliv, Rista, Risna, Nia, Ofri, Reni, Anes, Beta, Salsa, Vei, Bolo Savol, Bolo Ninid, Bolo Zhaafira, Ibu Wulan, Ibu Zulfa, Elis, Tri, Putri, Qoqom, Shafa, Phiren, Sania, Patma, Yasmin, Riska, Rey, kaks Kana dan Nurmay. Terimakasih banyak atas kebersamaan, keceriaan, semangat dan dukungan kepada penulis.
19. *Chemistry'18* yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, terimakasih atas kebersamaan, pengalaman, motivasi serta dukungan kepada penulis selama perkuliahan. Kimia 18... Totalitas, Berkualitas, Tanpa Batas.
20. Keluarga Besar Biro Kesekretariatan Himaki 2019 dan 2020 : Kak Ikrom, Mba Renny, Mba Dhita, Mba Isty, Mba Aisyah, Mba Mutiara, Mba Naura, Mba Noura, Mba Lia, Kak Widi, Aan, Vier, Arya, Aul, Dwi, Fau, Lily, Fani, Natasha, Vei, Tri, Nia, Nurmay, Kaks Kana, Rara, Ejak, Rifdah, Devi, Putri, Ayur, Cindi, Widya, Selfia dan Qonita. Terimakasih atas pengalaman, dukungan dan kerja samanya kepada penulis.
21. Keluarga KKN Lingkungan II Kel. Kedaton, Kec. Kedaton, Bandar Lampung Kak Willy, Alvin, Riski, Fira, Lala. Terimakasih atas kerja sama dan rasa kekeluargaan yang telah kalian ciptakan.
22. Kakak-kakak Kimia angkatan 2015, 2016, 2017 atas bimbingannya dan adik-adik Kimia angkatan 2019, 2020, 2021, 2022 atas dukungan, do'a dan semangat yang diberikan kepada penulis.
23. Almamater tercinta Universitas Lampung.
24. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini.

25. *Last but not least, greatest appreciation for myself. Thanks for sticking around, fighting and keeping the spirit in any condition until the end. You deserve it!*

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, akan tetapi sedikit harapan semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua. *Aamiin Ya Rabbal Alamiin.*

Bandar Lampung, 05 April 2023
Penulis

Wulandari Agustin

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR LAMPIRAN.....	vi
I . PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II . TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Fabaceae	5
2.2. Tumbuhan Turi (<i>Sesbania grandiflora</i> (L.) Poir).....	5
2.3. Efek Farmakologi Tumbuhan Turi (<i>S. grandiflora</i>).....	7
2.4. Senyawa Metabolit Sekunder dari Hasil Isolasi Tumbuhan Turi Putih .	7
2.5. Inflamasi	9
2.6. Antiinflamasi	10
2.7. Penentuan Aktivitas Antiinflamasi Menggunakan Metode Penghambatan Denaturasi Protein.....	11
2.8. Metabolomik.....	12
2.9. <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i> (LC- MS/MS)	13
2.10. Analisis Multivariat <i>Principle Component Analysis</i> (PCA).....	14
2.11. Analisis <i>Orthogonal Partial Least Squares - Discriminat Analysis</i> (OPLS-DA).....	14
2.12. Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi Turi Putih.....	15
III. METODE PENELITIAN	20
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2. Alat dan Bahan	20
3.3. Prosedur Kerja Penelitian	21
3.3.1. Persiapan Sampel	21
3.3.2. Preparasi untuk Uji Antiinflamasi dan Analisis LC-MS/MS.....	21
3.3.3. Uji Aktivitas Antiinflamasi dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein.....	22
3.3.4. Identifikasi Metabolit dan Analisis Multivariat berbasis LC- MS/MS	23

3.3.5. Analisis <i>Orthogonal Partial Least Squares Regression – Discriminant Analysis</i> (OPLS-DA).....	24
3.3.6. Isolasi Senyawa Bioaktif.....	24
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1. Ekstraksi Sampel Untuk Metabolomik.....	28
4.2. Uji Bioaktivitas Antiinflamasi.....	29
4.3. Identifikasi dan Penyelarasan Waktu Retensi Metabolit <i>Sesbania grandiflora</i> oleh LC-MS/MS.....	31
4.4. Analisis Multivariat <i>Principle Component Analysis</i> (PCA).....	33
4.5. Korelasi Aktivitas Antiinflamasi dan LC-MS/MS menggunakan OPLS-DA	34
4.6. Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi	36
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1. Simpulan.....	46
5.2. Saran	47
DAFTAR PUSTAKA.....	48
LAMPIRAN.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nilai IC ₅₀ pada 3 variasi pelarut pengestrak kulit batang turi putih dan natrium diklofenak	30
2. Tingkatan kekuatan aktivitas antiinflamasi (Minarti dkk., 2021)	30
3. Penggabungan hasil Kromatografi Cair Vakum (KCV)	38
4. Nilai IC ₅₀ dari 10 fraksi utama hasil penggabungan KCV	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bagian-bagian tanaman turi (a) batang, (b) daun, (c) bunga, (d) polong.....	6
2. Senyawa 1-4 dari akar turi putih (Hasan <i>et al.</i> , 2020).	8
3. Senyawa sesbagrandidflorain A (5) dan sesbagrandidflorain B (6) (Noviany <i>et al.</i> , 2021) serta sesbagrandidflora-C (7) dari kulit batang <i>S. grandilora</i> (Noviany <i>et al.</i> , 2020).....	9
4. Perubahan struktur setelah terdenaturasi.....	11
5. Ekstrak kasar (a) MeOH 100%, (b) EtOAc 100% dan (c) MeOH:EtOAc 50% kulit batang turi putih	28
6. Kromatogram Hasil LC-MS/MS Ekstrak (a) MeOH 100%, (b) EtOAc 100% dan (c) MeOH:EtOAc 50%	31
7. Kromatogram hasil COW kulit batang tumbuhan turi putih.....	32
8. Hasil analisis PCA (a) luas area (b) intensitas	33
9. Plot Skor OPLS-DA (a) luas area dan (b) intensitas dengan aktivitas antiinflamasi	34
10. Plot skor VIP (a) luas area dan (b) intensitas	35
11. Kromatogram ekstrak etil asetat 100% (a) di bawah sinar UV 366 nm dan (b) setelah disemprot serum sulfat.....	37
12. KCV ekstrak EtOAc 100% menggunakan eluen <i>n</i> -heksana/EtOAc bergradien kepolaran.....	38
13. Kromatogram KLT fraksi KCV di bawah sinar UV (a) 254 nm dan (b) 366 nm.....	38
14. Kromatogram KLT gabungan KCV di bawah sinar UV (a) 254 nm dan (b) 366 nm.....	39
15. Kromatogram KLT kristal fraksi A (NV81) (a) di bawah sinar UV 366 nm dan (b) setelah disemprot serum sulfat	40

16. Proses kromatografi kolom fraksi B	40
17. Kromatogram KLT subfraksi utama KC1-KC17 (a) di bawah sinar UV 254 nm dan (b) di bawah sinar UV 366 nm.....	41
18. Kromatogram KLT kristal KB4 (a) di bawah sinar UV 366 nm dan (b) setelah disemprot serium sulfat	41
19. Kromatografi Kolom Fraksi C	42
20. Kromatogram KLT subfraksi utama KC1-KC17 di bawah sinar UV (a) 254 nm dan (b) 366 nm.....	42
21. Kromatogram KLT kristal KC4 (a) di bawah sinar UV 366 nm dan (b) setelah disemprot serium sulfat	43
22. Kristal fraksi A (NV81), fraksi B (NV82) dan fraksi C (NV83)	43
23. Fragmentasi ion hasil LC-MS/MS dari Kristal NV81, NV82 dan NV83	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Penelitian Pendekatan Metabolomik.....	53
2. Bagan Penelitian Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi.....	54
3. Hasil Determinasi Tumbuhan Turi Putih	55
4. Pembuatan Larutan yang diperlukan pada Uji Antiinflamasi	56
5. Data % Inhibisi Kulit Batang Turi Putih.....	58
6. Data Absorbansi Kulit Batang Turi Putih	59
7. Perhitungan Nilai IC_{50} dan Grafik.....	61
8. Data senyawa <i>known</i> dari analisis LC-MS/MS.....	71
9. Data senyawa <i>Unknown</i> dari analisis LC-MS/MS.....	77
10. Nilai VIP, FDR dan <i>fold change</i> dari analisis OPLS-DA.....	82

I . PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kasus penyakit di Indonesia, yang melibatkan peradangan memiliki angka kejadian yang cukup tinggi. Secara nasional penyakit infeksi saluran pernafasan akut (25,50%), penyakit sendi (24,7%), dermatitis (6,8%), dan hepatitis (1,2%) memiliki gejala berupa demam, nyeri dan sesak nafas (Kementrian Kesehatan, 2018). Konsep hidup *back to nature* menjadi pilihan untuk pemeliharaan kesehatan dan pencegahan penyakit, khususnya peradangan atau inflamasi. Terlebih pemakaian obat tradisional yang berasal dari tumbuhan masih menjadi ciri khas kehidupan masyarakat Indonesia hingga kini.

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya dengan keanekaragaman flora. Kurang lebih 80% obat-obatan yang digunakan oleh masyarakat Indonesia berasal dari flora (Salni *et al.*, 2011). Keanekaragaman flora dikenal mengandung berbagai golongan senyawa kimia yang mempunyai efek fisiologis terhadap organisme lain, atau sering disebut sebagai senyawa bioaktif. Aktivitas senyawa bioaktif dapat digunakan sebagai acuan dalam pengendalian mutu suatu tumbuh-tumbuhan menjadi obat herbal. Herbal antiinflamasi yang terkandung dari suatu bahan alam diharapkan dapat menurunkan aktivitas peradangan di dalam tubuh akibat infeksi seperti demam, nyeri ataupun sesak nafas.

Salah satu jenis tumbuhan yang tumbuh subur di Indonesia adalah tumbuhan turi (*Sesbania grandiflora*). Studi fitokamakologi sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol dari tanaman turi yaitu steroid, tanin, flavonoid, karbohidrat, asam amino dan saponin (Avalaskar *et al.*, 2011). Umumnya tumbuhan turi dimanfaatkan untuk peluruh kencing (diuretika) mencairkan gumpalan darah, menghilangkan sakit, pencahar ringan oleh

masyarakat (Nista *et al.*, 2010). Banyaknya manfaat dari tumbuhan turi menjadi alasan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder lainnya dari tumbuhan turi.

Beberapa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu bahan alam akan memberikan efek farmakologis. Oleh karena itu, dalam penelitian ini diperlukan teknik analisis yang menunjukkan adanya korelasi antara perbedaan pelarut pengestrak tanaman yang digunakan dengan aktivitas biologis untuk mendapatkan aktivitas biologis yang konsisten berkontribusi pada keaktifannya serta pengenalan keragaman profil metabolit. Salah satu analisis dan evaluasi yang dapat dilakukan adalah dengan pendekatan metabolomik. Metabolomik merupakan pendekatan terbaru dalam analisis profil metabolit tanaman secara menyeluruh yang memungkinkan dapat mendeteksi metabolit dengan data yang berkualitas (Dunn dan Eilis, 2005).

Pada penelitian ini jaringan tumbuhan turi putih yang dipilih adalah kulit batang, karena belum banyak yang mengembangkan potensi aktivitas antiinflamasi dibandingkan jaringan lainnya. Senyawa fenolik hasil isolasi batang turi putih menunjukkan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi dengan menggunakan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Noviany *et al.*, 2018). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan dengan menggunakan kajian metabolomik diperoleh senyawa atau metabolit penciri yang berkontribusi *major* pada aktivitas antioksidan kulit batang tumbuhan turi putih serta didapatkan informasi bahwa perbandingan pelarut metanol dan etil asetat 25% adalah pelarut pengestrak antioksidan terbaik untuk isolasi senyawa. Kulit batang turi putih akan diekstraksi dengan tiga variasi konsentrasi pelarut yang berbeda. Variasi pelarut dilakukan untuk menentukan konsentrasi pelarut terbaik yang dapat mengekstrak senyawa metabolit. Aktivitas antiinflamasi pada kulit batang turi putih kemudian akan dikorelasikan dengan analisis hasil metabolit profil LC-MS/MS untuk mengetahui senyawa aktif yang berkontribusi signifikan terhadap aktivitas antiinflamasi.

Pendugaan hasil metabolit tanaman turi putih pada penelitian ini, dilakukan dengan cara mencocokkan nilai m/z yang terdeteksi dari tabel *mass array* dengan nilai massa senyawa metabolit genus *Sesbania*. Kemudian data tersebut dianalisis lebih lanjut dengan analisis PCA menggunakan *The Unscrambler X* dan OPLS-DA menggunakan *metaboanalyst*. Setelah mengetahui informasi dari variasi metabolit penciri dan mengetahui variasi konsentrasi pelarut pengekstrak terbaik, maka selanjutnya dilakukan isolasi senyawa bioaktif antiinflamasi. Berdasarkan latar belakang tersebut, serta belum banyaknya kajian metabolomik tentang senyawa aktif antiinflamasi pada turi putih sebagai parameter kendali mutu obat herbal, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian ini.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Menentukan nilai aktivitas antiinflamasi kulit batang tumbuhan turi putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) dari perbedaan konsentrasi pelarut pengekstrak menggunakan metode penghambatan denaturasi protein.
2. Menentukan pelarut pengekstrak terbaik yang berpotensi sebagai sumber antiinflamasi berdasarkan hasil spektrum LC-MS/MS menggunakan metabolomik.
3. Menentukan senyawa aktif yang berkontribusi dalam aktivitas antiinflamasi yang dihasilkan dari korelasi antara spektrum LC-MS/MS dan nilai aktivitas antiinflamasi menggunakan metabolomik.
4. Mengisolasi senyawa bioaktif antiinflamasi dari bagian kulit batang tanaman turi putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir).

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi tentang senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai metabolit penciri atau *variable important* yang berkontribusi *major* pada aktivitas antiinflamasi.
2. Memberikan informasi tentang kualitas tumbuhan turi putih berdasarkan keterikatan profil metabolit dengan perbedaan konsentrasi pelarut pengekstrak dan aktivitas antiinflamasi yang dapat digunakan dalam kontrol kualitas bahan baku obat herbal.

II . TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fabaceae

Famili *Fabaceae* merupakan famili dari tumbuhan berbunga (*Antophyta*) yang banyak dijumpai di sekitar lingkungan. *Fabaceae* terdiri atas 18.000 jenis yang tercakup dalam 650 marga. Famili *Fabaceae* dikelompokkan ke dalam 3 subfamili yaitu *Mimosoidae*, *Caesalpinioideae*, dan *Papilionoideae*.

Pengelompokkan ini didasarkan pada morfologi bunga khususnya pada bentuk kelopaknya dan adanya buah polong. *Caesalpinioideae* terdiri atas 171 marga dan 2.250 jenis. Sedangkan *Papilionoideae* merupakan subfamili terbesar, karena terdiri atas 13.800 jenis yang tercakup dalam 480 marga. Selain itu, subfamili ini juga memiliki area distribusi yang lebih luas dibandingkan dengan yang lain. Subfamili *Mimosoideae* terdiri atas 3.720 jenis yang tercakup dalam 72 marga dan terdistribusi di kawasan tropis dan subtropis (Bahera *et al.*, 2012).

2.2. Tumbuhan Turi (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir)

Tanaman turi (*Sesbania grandiflora* (L.) Poir) terdistribusi di berbagai negara diantaranya yakni Australia, India, Indonesia, Malaysia, Myanmar, dan Filipina. Tanaman ini mudah beradaptasi dengan lingkungan yang lembab maupun panas. Tanaman ini merupakan spesies dataran rendah yang tumbuh cepat ketika musim hujan serta dapat bertahan pada musim kemarau hingga sembilan bulan.

Secara taksonomi, tanaman turi dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Subkingdom : Viridiplantae
Infrakingdom : Streptophyta
Superdivisi : Embryophyta

Divisi : Magnoliophyta
Subdivisi : Spermatophytina
Kelas : Magnoliopsida
Superordo : Rosanae
Ordo : Fabales
Familia : Fabaceae
Genus : Sesbania
Spesies : *Sesbania grandiflora* (L.) Poir
(Bahera *et al.*, 2012).

Tanaman turi (*S. grandiflora*) memiliki ciri-ciri fisik secara umum berdasarkan jaringannya, diantaranya memiliki sedikit cabang dengan tinggi sekitar 8-15 m dan berdiameter 25-30 cm. Kulit luar batangnya berwarna abu-abu kehitaman, kasar, terdapat retakan vertikal yang panjang selebar 1-2 cm. Kulit kayu bila ditoreh akan mengeluarkan lendir berwarna kuning kemerahan. Daun pada tanaman turi ini memiliki ciri yaitu majemuk menyirip sepanjang 30 cm dengan daun berbentuk lonjong atau oval.

Sementara pada bagian bunga memiliki bentuk tandan, tumbuh pada ketiak daun. Kelopak bunga berbentuk bulan sabit dan mahkota bunga menggantung seperti lonceng. Berdasarkan varietasnya, mahkota bunga dibagi menjadi dua macam, yaitu berwarna merah dan berwarna putih. Selain jaringan diatas tumbuhan ini juga memiliki buah. Polongnya menggantung berbentuk ramping dan lurus dengan ujung meruncing. Ukuran panjang polong 30-50 cm dengan lebar 1-1,5 cm. Ketika masih muda, polong berwarna hijau, kemudian setelah tua berwarna kuning (Bahera *et al.*, 2012).



Gambar 1. Bagian-bagian tanaman turi (a) batang, (b) daun, (c) bunga, (d) polong

2.3. Efek Farmakologi Tumbuhan Turi (*S. grandiflora*)

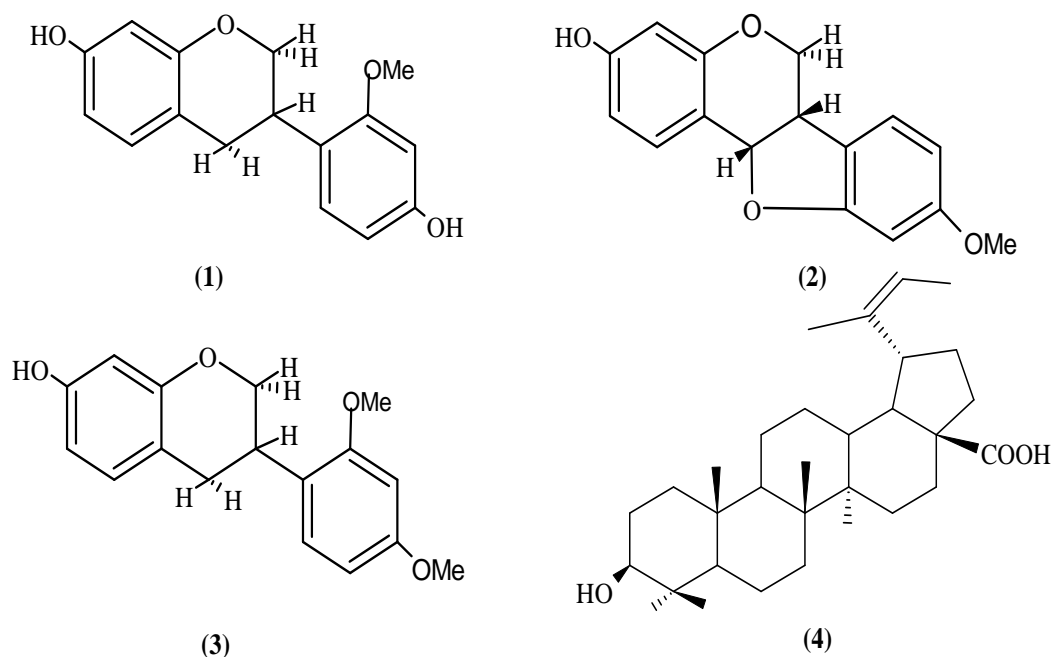
Tanaman turi memiliki kandungan senyawa kimia yang berbeda-beda antara bagian satu dengan yang lainnya. Pada daunnya terdapat senyawa-senyawa kimia yakni saponin, tanin, glikosida, peroksidase, vitamin A dan vitamin B. Selain itu, daunnya juga mengandung senyawa metabolit sekunder lainnya di antaranya yakni alkaloid, flavonoid, steroid, dan terpenoid. Pada bagian bunganya mengandung kalsium, zat besi, gula, vitamin A dan vitamin B. Famili *Fabaceae* ini juga mengandung metabolit sekunder berupa alkaloid, asam amino non-protein, isoflavonoid, kumarin, fenilpropanoid, antrakuinon, terpenoid dan glikosida sianogenik (Wink and Mohamed, 2003). Karena kandungan zat-zat tersebut, maka dilakukan skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terdapat dalam kulit batang turi putih.

Bunga tanaman turi dimanfaatkan sebagai pelembut kulit, pencahar dan penyejuk. Kulit batangnya berguna sebagai analgetik, antipiretik, pencahar dan astringen (pengelat). Sementara daunnya berkhasiat untuk antikoagulan, analgetik, pencahar ringan dan memiliki efek diuretik atau peluruh kencing (Hariana, 2013). Juga telah diujikan pada mencit, sehingga dapat disimpulkan daun tumbuhan turi memiliki potensi sebagai antioksidan (Ramesh *et al.*, 2010). Investigasi lainnya menyatakan turi memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antiseptik, analgesik, dan antioksidan (Shareef *et al.*, 2012).

2.4. Senyawa Metabolit Sekunder dari Hasil Isolasi Tumbuhan Turi Putih

Metabolit sekunder adalah jenis senyawa organik berukuran kecil yang diproduksi oleh organisme dalam bentuk yang berbeda. Metabolit ini memiliki aktivitas farmakologi dan biologi. Tumbuhan ini memiliki aktivitas antioksidan dan potensi antiinflamasi yang tinggi.

S. grandiflora (L.) dari mengandung banyak sterol, saponin dan tanin yang bertanggung jawab atas berbagai sifat farmakologisnya. Beberapa bagian berupa akar, kulit, daun, bunga, dan biji merupakan bagian yang dapat dimanfaatkan secara tradisional dan medis. Pada penelitian sebelumnya, berhasil diisolasi dari bagian batang tumbuhan turi. Beberapa senyawa lainnya juga berhasil diisolasi dari fraksi metanol dan aseton dari akar turi putih berupa *isovestitol* (1), *medicarpin* (2), *sativan* (3), *betulinic acid* (4) (Hasan *et al.*, 2012).



Gambar 2. Senyawa 1-4 dari akar turi putih (Hasan *et al.*, 2020).

Selain itu, berhasil diisolasi senyawa sesbagrandidflorain A (6-metoksi-2-(2',3'-dihidroksi-5'-metoksifenil)-1-benzofuran-3-karbaldhida) (5) dengan rumus molekul $C_{17}H_{14}O_6$ dan berat molekul 313,0709 m/z , sesbagrandidflorain B (6-hidroksi-2-(2',3'-dihidroksi-5'-metoksifenil)-1-benzofuran-3-karbaldhida) (6) dengan rumus molekul $C_{16}H_{12}O_6$ dan berat molekul 300,0561 m/z dari ekstrak etil asetat kulit batang *S. grandiflora* (Noviany *et al.*, 2021). Satu senyawa baru yang termasuk 2-aril benzofuran telah berhasil diisolasi dari ekstrak kulit batang tumbuhan turi putih pada fraksi etil asetat berupa sesbagrandidflorain C (7) dengan rumus molekul $C_{17}H_{14}O_6$ dan berat molekul 315,0876 m/z , serta senyawa tersebut memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker HeLa, HepG2, dan MCF-7 (Noviany *et al.*, 2020).

lokal ini tidak terlihat pada tempat peradangan jauh di dalam tubuh karena jaringan sudah mempunyai suhu 37°C.

2.5.3. Dolor (rasa sakit) dikarenakan pembengkakan jaringan mengakibatkan peningkatan tekanan lokal dan juga karena ada pengeluaran zat histamin dan zat kimia bioaktif lainnya.

2.6. Antiinflamasi

Antiinflamasi adalah agen atau obat yang bekerja melawan atau menekan proses peradangan (Dorland, 2002). Obat-obat inflamasi bertujuan menghilangkan gejala peradangan yang dapat berupa kemerahan, pembengkakan, demam dan nyeri. Berdasarkan mekanisme kerjanya, obat-obat antiinflamasi dibagi menjadi:

2.6.1. Golongan Steroid

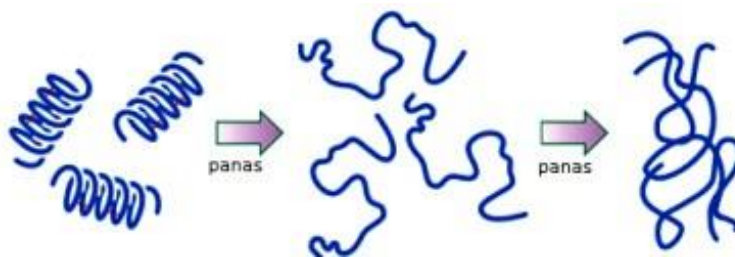
Pada golongan steroid digunakan untuk mencegah respon nyeri pada tubuh sehingga cocok untuk jenis trauma atau kerusakan lebih berat. Mekanisme kerja didasarkan pada penghambatan enzim phospholipase yang tidak akan membentuk asam arakidonat dengan begitu prostaglandin juga tidak akan terbentuk. Obat antiinflamasi steroid antara lain adalah kortison asetat, hidrokortison, prednison, deksametason, betametason dan sebagainya.

2.6.2. Golongan Non Steroid

Pada golongan non steroid sifatnya cocok untuk jenis luka dan trauma yang lebih ringan. Mekanisme kerja pada golongan non steroid fokus pada penghambatan *isoenzim cyclooxygenase-1 (COX-1)* dan *cyclooxygenase-2 (COX-2)*. Enzim tersebut ini berperan dalam proses pembentukan prostaglandin dan tromboksan dari asam arakidonat. Obat antiinflamasi nonsteroid antara lain asam asetil salisilat, natrium diklofenak, indometasin, ibuprofen, fenilbutason dan lain-lain (Tjay dan Rahardja, 2002).

2.7. Penentuan Aktivitas Antiinflamasi Menggunakan Metode Penghambatan Denaturasi Protein

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dari senyawa aktif dapat dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Pengujian tersebut dipilih dikarenakan denaturasi protein pada jaringan adalah salah satu penyebab inflamasi. Penghambatan denaturasi protein BSA sebagai aktivitas antiinflamasi dikarenakan adanya interaksi antara molekul sampel dengan tirosin, treonin dan lisin dari BSA (Williams *et al.*, 2008). Protein dalam BSA akan mengalami denaturasi pada saat dipanaskan. Hal ini yang menjadi penanda ketika albumin mengalami kerusakan pada saat diinduksi panas sehingga oleh tubuh dianggap sebagai bahan asing.



Gambar 4. Perubahan struktur setelah terdenaturasi

Pengujian secara *in vitro* pengaruh pemanasan terhadap anti-denaturasi BSA, dapat digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa antiinflamasi. Hal ini dikarenakan metode pengujian denaturasi protein merupakan metode yang layak dan sederhana untuk menilai potensial obat antiinflamasi. Penghambatan denaturasi protein diketahui dengan pengukuran serapan secara spektrofotometri UV-Vis. Presentase penghambatan denaturasi protein diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat dijadikan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat (Williams *et al.*, 2008). Nilai IC_{50} dihitung dengan membuat

persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan 5 inhibisi (Y) sehingga didapatkan nilai IC₅₀.

2.8. Metabolomik

Metabolomik adalah analisis komprehensif terhadap semua metabolit yang terkandung dalam makhluk hidup pada suatu waktu yang spesifik. Metabolomik merupakan salah satu cabang penelitian terkait “omik” yang difokuskan pada karakterisasi molekul metabolit dalam matriks biologis secara keseluruhan melalui identifikasi profil metabolit total dalam suatu organisme (Krastanov, 2010). Pendekatan metabolomik merupakan teknik analisis tingkat tinggi yang dapat mengidentifikasi dan mengkuantifikasi ratusan profil metabolit dalam tanaman, sehingga pendekatan metabolomik ini dapat mencakup berbagai hal yang mungkin dapat terkandung dalam sampel acuan untuk mengamati kualitas sampel tersebut. Keuntungan dari pendekatan metabolomik berupa pola pengenalan algoritma yang dapat dimanfaatkan untuk memberikan pengetahuan baru yang tidak diduga sebelumnya. Selain itu, pengaplikasian dari cara ini dapat digunakan dalam bidang kesehatan atau kendali mutu obat, industri pangan, mikrobiologi dan diagnostik.

Sejumlah data dan kuantitas dapat diklasifikasikan menjadi 3 bagian dalam kajian metabolomik yaitu berupa analisis metabolit bertarget, pemprofilan metabolit, dan sidik jari metabolit. Analisis metabolit bertarget didasarkan pada deteksi dan kuantifikasi sekelompok kecil metabolit maupun senyawa target tunggal. Profil metabolit diperoleh dengan deteksi, identifikasi, dan hipotesis kuantitatif sekelompok besar metabolit yang dikaitkan dengan jalur biosintesis yang spesifik. Sementara sidik jari metabolit merupakan pengukuran cepat yang dilakukan dengan analisis spektra dari komposisi total *biochemical fingerprint* untuk diskriminasi sampel yang berbeda tanpa harus melalui tahap identifikasi metabolit (Krastanov, 2010). Instrumentasi yang sering digunakan pada analisis metabolomik antara lain spektroskopi inframerah transformasi (FTIR), GC-MS, LC-MS, dan ¹H-NMR (Theodoridis *et al.*, 2012).

2.9. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Pada penelitian ini, instrumen LC-MS/MS akan digunakan dalam analisis metabolomik yang akan dikorelasikan dengan aktivitas antiinflamasi tanaman turi putih untuk prediksi senyawa aktif antiinflamasinya. Ekstrak yang dianalisis dari pelarut yang berbeda, lalu dilakukan profil metabolit menggunakan kromatografi cair-spektroskopi massa atau LC-MS/MS. LC-MS/MS merupakan salah satu alternatif pendekatan yang sangat berguna dalam menentukan profil suatu sampel tersebut. LC-MS/MS memiliki kemampuan dalam mengidentifikasi sampel yang kompleks, sehingga kelebihan tersebut dapat membedakan dan mendeteksi dengan kisaran yang luas, yang dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun analisis struktural, dengan sensitivitas mencapai ukuran pg/mL, sehingga analisis LC-MS/MS ini banyak digunakan pada bidang bioanalisis (Theodoridis *et al.*, 2012).

Selain itu, LC-MS/MS cocok dalam analisis senyawa yang tidak stabil pada suhu tinggi dan memiliki polaritas atau bobot molekul yang tinggi. Hasil yang diperoleh dari analisis LC-MS/MS adalah spektrum massa yang memberikan informasi terkait fragmentasi bobot molekuler yang spesifik untuk mengidentifikasi atau mengkonfirmasi senyawa yang diprediksi, struktur, identitas, kuantitas, dan sampel sehingga dapat meningkatkan kualitas hasil yang diperoleh pada analisis kuantitatif dan kualitatif. Penanganan data dapat dilakukan dengan otomatis melalui perangkat lunak yang digunakan pada penelitian ini adalah *Mzmine*. *MZmine* merupakan tahapan awal dalam emisi kromatogram LC-MS/MS yang mengolah kromatogram LC-MS/MS menjadi bentuk *mass array*. *Mass array* adalah matriks tiga dimensi yang mengandung informasi mengenai nilai m/z , waktu retensi, luas puncak, dan intensitas puncak (Theodoridis *et al.*, 2012).

2.10. Analisis Multivariat *Principle Component Analysis* (PCA)

Analisis multivariat merupakan salah satu teknik analisis kemometrik yang paling banyak digunakan untuk mengenali pola dari suatu data sehingga data dapat menggambarkan berdasarkan persamaan polanya. Analisis multivariat ini bertujuan untuk menganalisis matriks kompleks dan analisis multikomponen pada sistem yang sederhana. Data dimensi akan direduksi dan akan memberikan gambaran dalam pengelompokan data melalui *Principle Component Analysis* (PCA) sehingga visualisasi pengelompokan data dan evaluasi kesamaan antar kelompok menjadi lebih mudah. Selain itu, teknik analisis ini dapat menemukan alasan atau faktor di balik pola yang diamati melalui korelasi berdasarkan sifat kimia atau fisika dari sampel yang dianalisis. Dapat digunakan secara keseluruhan bahwa penggunaan analisis multivariat PCA adalah untuk mengklasifikasikan sampel ke grup yang umum, mendeteksi *outlier*, melakukan pemodelan data, serta menyeleksi variabel untuk klasifikasi maupun untuk pemodelan (Brerenton, 2003).

2.11. Analisis *Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis* (OPLS-DA)

Metode Analisis OPLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) digunakan untuk mendeteksi senyawa penting atau variabel penting pada suatu sampel, karena analisis ini merupakan metode yang paling relevan dalam memprediksi dan menginterpretasikan suatu data. Plot skor OPLS-DA menjelaskan pengelompokan yang signifikan ketika terdapat kelompok-kelompok yang dekat, distribusi oleh variabel dan membentuk pola kesamaan dalam kelompok itu sendiri.

Pada analisis OPLS-DA terdapat *Variable Importance in the Projection* (VIP) yang dapat menginformasikan metabolit yang dominan berdasarkan hasil metabolit yang diperoleh dari identifikasi senyawa dan variabel respon. Parameter VIP semakin banyak digunakan sebagai interpretasi model yang lebih ringkas

yang memuat bobot molekul. Nilai VIP yang lebih besar dari atau mendekati 1 dianggap berpengaruh dalam menjelaskan klasifikasi dan memprediksi senyawa yang berperan aktif (Uncu and Ozen, 2019).

2.12. Isolasi Senyawa Bioaktif Antiinflamasi Turi Putih

Isolasi merupakan suatu proses pemisahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa aktif atau komponen tertentu dari komponen lain yang tidak diharapkan. Untuk mengisolasi suatu senyawa yang terdapat pada tumbuhan, pemisahan dan pemurnian yang terutama dilakukan adalah dengan menggunakan teknik ekstraksi dan dilanjutkan dengan teknik kromatografi. Teknik ekstraksi yang biasa digunakan untuk isolasi senyawa bahan alam diantaranya adalah maserasi, perkolasi dan sokletasi. Sedangkan untuk teknik kromatografi yang biasa digunakan untuk isolasi senyawa bahan alam adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan Kromatografi Kolom (KK). Pemilihan metode yang akan digunakan didasarkan pada penelitian-penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya.

2.12.1. Ekstraksi

Ekstraksi ialah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari bahan yang tidak larut dengan menggunakan pelarut cair. Ekstraksi dapat dibedakan menjadi 2 jenis berdasarkan fase yang terlibat, yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi padat-cair yaitu maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi padat-cair untuk mengekstrak jaringan tumbuhan yang belum diketahui komponen senyawanya, yang kemungkinan bersifat tidak tahan terhadap panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Prinsip dari metode maserasi didasarkan pada prinsip kelarutan *like dissolved like*, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar.

2.12.2. Kromatografi

Kromatografi didasarkan pada prinsip ketika molekul-molekul dalam campuran diterapkan ke permukaan atau ke dalam padatan, dan fase diam fluida (fase stabil) terpisah satu sama lain sambil bergerak dengan bantuan fase gerak. Faktor-faktor yang efektif pada proses pemisahan ini meliputi karakteristik molekuler yang terkait dengan adsorpsi (cair-padatan), partisi (cair-padatan), dan afinitas atau perbedaan antara berat molekulnya. Perbedaan-perbedaan ini, beberapa komponen campuran tetap lebih lama dalam fase diam, dan mereka bergerak perlahan dalam sistem kromatografi, sementara yang lain berlalu dengan cepat ke fase gerak, dan membuat sistem lebih cepat (Harris, 2004).

2.12.2.1 Kromatografi Kolom (KK)

Pada kromatografi kolom, fase diam yang digunakan biasanya berupa silika gel, poliamida atau selulosa. Fase gerak yang digunakan biasanya berupa dimulai dari pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap. Pelarut yang digunakan dapat berupa pelarut tunggal maupun kombinasi dari dua pelarut yang berbeda kepolarannya berdasarkan perbandingan tertentu. Hasil yang diperoleh dari kolom kromatografi adalah berbagai fraksi ketika fraksi tersebut ditampung untuk selanjutnya dimonitor menggunakan kromatografi lapis tipis. Fraksi dengan pola kromatogram yang sama digabung dan diuapkan agar pelarutnya menguap (Hajnos *et al.*, 2011).

2.12.2.2 Kromatografi Vakum Cair (KCV)

Kromatografi cair vakum merupakan salah satu teknik kromatografi vakum khusus yang umumnya menggunakan adsorben berupa silika gel. Kromatografi cair vakum memiliki kelebihan apabila dibandingkan dengan kromatografi kolom yaitu teknik ini lebih efisien terhadap waktu karena proses elusinya berjalan secara cepat. Proses elusi ini dibantu dengan memvakumkan kolom. Kromatografi cair vakum juga dapat memisahkan sampel dalam jumlah yang

lebih banyak. Urutan eluen yang digunakan dalam kromatografi cair vakum dimulai dari eluen dengan tingkat kepolaran yang rendah.

2.12.2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen di antara dua fase (fase gerak/eluen dan fase diam/adsorben) yang memiliki kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Kristianti (2008) menyatakan bahwa KLT banyak digunakan karena proses analisis yang mudah dan cepat. KLT digunakan untuk melihat pola pemisahan yang di hasilkan suatu senyawa dengan fase gerak berupa kombinasi dari dua pelarut (eluen). Prinsip KLT adalah adsorpsi dan partisi ketika adsorpsi adalah penyerapan pada permukaan, sedangkan partisi adalah penyebaran atau kemampuan suatu zat yang ada dalam larutan untuk berpisah kedalam pelarut yang digunakan. Kecepatan gerak senyawa-senyawa ke atas pada lempengan tergantung.

Hasil yang didapat kemudian diamati dengan menghitung harga perbandingan jarak pergerakan komponen-komponen yang dipisahkan dengan jarak pergerakan pelarut yang dikenal dengan *Retardation factor* (R_f). Senyawa yang terpisah dapat diidentifikasi dengan menghitung harga R_f yaitu:

$$R_f = \frac{\text{Jarak Perjalanan Suatu Senyawa}}{\text{Jarak Perjalanan Suatu Fasa Gerak}}$$

Harga R_f ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, kandungan air, ketebalan), jumlah bahan yang ditotolkan pada plat dan suhu. KLT mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya: waktu yang dibutuhkan tidak lama (2–5 menit) dan sampel yang dipakai hanya sedikit sekali (2–20 μg).

2.13 Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat yang dapat melakukan pengukuran interaksi antara radiasi elektromagnetik pada panjang gelombang tertentu dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Spektroskopi UV memiliki panjang gelombang dengan kisaran sinar 200-400 nm, sementara sinar tampak memiliki panjang gelombang dengan kisaran sinar 400-900 nm. Umumnya spektroskopi ini terbagi menjadi dua instrumen yaitu *single beam* dan *double beam*. Instrumen *single beam* digunakan untuk mengukur absorbansi suatu senyawa pada panjang gelombang tunggal dengan panjang gelombang paling rendah adalah 190-210 nm dan panjang gelombang paling tinggi adalah 800-1000 nm. Sedangkan pada instrumen *double beam* panjang gelombang yang digunakan 190-750 nm. Sinar ultraviolet dan sinar tampak adalah suatu energi yang ketika mengenai elektron-elektron yang terkandung dalam suatu sampel maka akan menyebabkan terjadinya eksitasi elektron dari keadaan dasar ke keadaan yang lebih tinggi (Suhartati, 2017). Serapan sampel dapat dilakukan dengan perhitungan Lambert-Beer sebagai berikut:

$$T = I_t/I_0 = I_0 - \epsilon.c.b$$

$$A = \log I/T = \epsilon.c.b \text{ atau } \epsilon = \frac{A}{b.c}$$

Keterangan :

A = Absorbansi

a = Daya Serap

b = Tebal sel (cm)

c = Kadar (g/L)

ϵ = Absorbtivitas molar (mol.cm.L)

I_0 = Intensitas sinar datang

I = Intensitas sinar yang datang diteruskan

Senyawa yang dapat dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis adalah senyawa yang memiliki gugus kromofor, yaitu gugus dengan rangkap terkonjugasi. Gugus kromofor akan mengabsorpsi radiasi sinar UV dan Vis jika dilihat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (ausokrom). Gugus ausokrom yaitu gugus yang

memiliki elektron non-bonding dan tidak menyerap radiasi UV jauh contohnya -OH, -NH, -NO, dan -X. Beberapa faktor yang mempengaruhi serapan spektrum di antaranya adalah jenis pelarut (polar dan non-polar), larutan pH, kadar larutan, ketika jika konsentrasi tinggi akan menyebabkan polimerisasi yang mengakibatkan perubahan harga $l_0 < I$, dan jika digunakan kuvet dengan tebal yang berbeda akan memberikan spektrum serapan yang berbeda (Harmita, 2006).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei hingga Desember 2022, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis spektroskopi yang digunakan meliputi spektrofotometer ultraviolet-tampak (UV-Vis) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Analisis LC-MS/MS dilakukan di Laboratorium Riset Unggulan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas dengan berbagai macam dan ukuran, seperangkat alat destilasi, evaporator putar, oven, neraca analitik, lampu UV 254 nm dan 366 nm, satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV), satu set alat Kromatografi Kolom (KK), spektrofotometer ultraviolet-tampak (UV-Vis) *Agilent Carry 50*, *Vanquish Flex UHPLC-Q Exactive Plus Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometer*, perangkat keras komputer, perangkat lunak *The Unscrambler X* versi 10.4 dan *website metaboanalyst*.

Bahan utama yang digunakan adalah kulit batang tumbuhan turi putih yang didapat dari Jalan Tirtayasa Desa Way Huwi, Kecamatan Jati Agung, Kabupaten Lampung Selatan pada hari Minggu tanggal 04 April 2021. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, etil asetat, *n*-heksana, aseton, akuades, diklorometana, silika gel Merck 60, silika gel GF₂₅₄ (35-70 Mesh), plat KLT, kertas saring,

membran filter Polytetrafluoroethylene (PTFE) 0,22 μm , asam format, asetonitril, media uji *Bovine Serum Albumin* (BSA), NaCl, *Tris Base*.

3.3. Prosedur Kerja Penelitian

3.3.1. Persiapan Sampel

Determinasi tumbuhan turi putih dilakukan di Herbarium Bogoriensis bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat. Kulit batang turi dibersihkan dengan air dan diiris kecil-kecil, lalu dikeringkan dengan dijemur di bawah panas sinar matahari sampai kering. Kulit batang yang telah kering lalu digiling hingga menjadi serbuk halus.

3.3.2. Preparasi untuk Uji Antiinflamasi dan Analisis LC-MS/MS

Pada penelitian ini sampel kulit batang turi putih diekstrak dengan 3 variasi pelarut yaitu metanol 100%, metanol:etil asetat 50%, dan etil asetat 100%. Pada penelitian ini, serbuk halus kulit batang tanaman turi putih yang diperoleh berat sebesar ± 750 gr. Kemudian, dari total berat sampel tersebut masing-masing ditimbang seberat 50 g sebanyak 5 kali untuk diekstrak dalam 3 variasi pelarut. Sampel tersebut dimaserasi dengan metanol 100%, metanol:etil asetat 50%, dan etil asetat 100% dengan perbandingan 1:4 selama 1x24 jam. Hasil maserasi disaring dengan kertas saring, lalu filtrat hasil maserasi tersebut selanjutnya dipekatkan dengan penguap putar vakum atau *rotary evaporator* dengan kecepatan 120 *rpm* pada suhu 40°C. Ekstrak pekat yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas antiinflamasi dan analisis LC-MS/MS.

3.3.3. Uji Aktivitas Antiinflamasi dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein

3.3.3.1. Pembuatan Larutan *Tris Buffer Saline* (TBS)

Sebanyak 1,21 gram *tris base* dan 8,7 gram NaCl ditambahkan aquades hingga 900 mL. Disesuaikan pH dengan asam asetat glasial sampai pH 6,2-6,5 (pH patologis) kemudian ditambahkan aquadest sampai 1000 mL dalam labu ukur 1000 mL (Mohan, 2003).

3.3.3.2. Pembuatan 0,2% *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Sebanyak 0,2 gram *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian ditambahkan dengan larutan *Tris Buffer Saline* (TBS) hingga volume 100 mL (William *et al.*, 2008).

3.3.3.3. Pembuatan Larutan Uji

Sebanyak 200 mg ekstrak kulit batang turi putih masing-masing dilarutkan dalam pelarut metanol 100%, metanol:etil asetat 50%, dan etil asetat 100% di dalam labu ukur 10 mL, kemudian dicukupkan sampai volume 10 mL, sehingga didapatkan konsentrasi 20.000 ppm sebagai larutan induk. Larutan dengan konsentrasi 20.000 ppm dibuat seri konsentrasi, sehingga menjadi larutan uji dengan konsentrasi 10.000, 8000, 6000, 4000 dan 2000 ppm untuk setiap ekstrak.

3.3.3.4. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Sebanyak 50 μ L pelarut metanol 100%, 50 μ L metanol:etil asetat 50%, dan 50 μ L etil asetat 100% ditambahkan larutan 0,2% BSA ke labu ukur hingga volume mencapai 5 mL.

3.3.3.5. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Sebanyak 200 mg natrium diklofenak kemudian dilarutkan dengan metanol 100%, metanol:etil asetat 50%, dan etil asetat 100% ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan sampai 10 mL, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 20.000 ppm yang dijadikan sebagai larutan induk. Dari larutan induk 20.000 ppm ini, selanjutnya dibuat seri konsentrasi larutan kontrol positif menjadi 10.000, 8000, 6000, 4000 dan 2000 ppm.

3.3.3.6. Pengukuran Aktivitas Antiinflamasi

Diambil sebanyak 50 μ L dari setiap konsentrasi larutan (larutan uji, kontrol positif dan kontrol negatif), kemudian ditambahkan larutan 0,2% BSA hingga volume mencapai 5 mL. Dari campuran tersebut didapatkan konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20 ppm untuk setiap konsentrasi larutan uji dan kontrol positif. Selanjutnya larutan diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 72°C, lalu didiamkan selama 25 menit pada suhu 23°C. Setelah dingin, larutan di vortex dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 660 nanometer.

3.3.4. Identifikasi Metabolit dan Analisis Multivariat berbasis LC-MS/MS

Ekstrak sampel seberat 0,1 g ditimbang lalu dilarutkan dalam 4 mL metanol. Ekstrak terlarut kemudian disaring dengan membran penyaring PTFE 0,22 μ m. Sebanyak 2,0 μ L filtrat sampel diinjeksikan ke dalam instrument LC-MS/MS. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vanquish Flex UHPLC-Q Exactive Plus Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometer*. Kolom yang digunakan adalah Accucore C₁₈ dengan dimensi (10 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m). Fase gerak yang digunakan berupa 0,1% asam format dalam air (A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (B) menggunakan metode elusi 0-25 menit, 25-30 menit dan 30-40 menit. Laju alir yang digunakan sebesar 0,2 mL/menit.

Spektrum data yang diperoleh dari analisis LC-MS/MS kemudian dikorelasikan dengan data yang diperoleh dari hasil uji antiinflamasi yang telah dilakukan. Pendugaan hasil metabolit dilakukan dengan membandingkan nilai massa akurat puncak terdeteksi hasil *mass array* dengan nilai akurat senyawa. Data LC-MS/MS dari ekstrak kulit batang berupa *mass array* kemudian dilakukan analisis multivariat dengan teknik PCA. Analisis multivariat dengan metode PCA dilakukan untuk melihat pengelompokan metabolit kulit batang turi putih berdasarkan perbedaan pelarut pengekstrak tersebut (Rafi, 2013).

3.3.5. Analisis *Orthogonal Partial Least Squares Regression* – Discriminant Analysis (OPLS-DA)

Identifikasi senyawa yang berkontribusi signifikan atau *important variable* pada sampel kulit batang turi putih dilakukan dengan membuat pemodelan dari hasil analisis OPLS-DA melalui program *metaboanalyst*. Metode analisis yang digunakan untuk pembentukan model korelasi antara aktivitas antiinflamasi dengan analisis data hasil LC-MS/MS. Model OPLS-DA dilakukan dengan dua set data, yaitu luas area atau intensitas sebagai variabel bebas (X) dan nilai IC₅₀ sebagai variabel respon (Y). Tujuan akhir pada proses ini adalah untuk mengidentifikasi *important variable* dari sampel penelitian yang menjadi *biomarker* penyebab antiinflamasi serta dapat memberi informasi terkait pelarut antiinflamasi terbaik yang akan menjadi fokus penelitian untuk tahap isolasi senyawa bioaktif antiinflamasi (Theodoridis *et al.*, 2012).

3.3.6. Isolasi Senyawa Bioaktif

3.3.6.1. Ekstraksi

Serbuk halus kulit batang tanaman turi putih sebanyak 1000 gram, diekstraksi melalui proses maserasi dengan menggunakan pelarut yang paling baik dari hasil analisis multivariat yang diperoleh. Proses maserasi dilakukan selama 1x24 jam

sebanyak 3 kali lipat. Ekstrak hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring, lalu maserasi yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh, lalu ditimbang untuk mengetahui berat sampel tersebut.

3.3.6.2. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak pekat yang diperoleh dari hasil evaporasi kemudian difraksinasi melalui proses KCV dengan tujuan untuk memisahkan ekstrak sampel dalam jumlah yang banyak. Prinsip metode KCV ini adalah pendistribusian partikel pada fasa diam. Pada penelitian ini, fasa diam yang digunakan adalah silika gel halus dengan jumlah sebanyak 10 kali berat sampel. Dalam prosesnya, terlebih dahulu silika gel halus dikemas kering ke dalam kolom dengan keadaan vakum menggunakan alat vakum hingga bisa dipastikan silika halus tersebut padat dan tidak ada rongga yang terbentuk. Kemudian eluen yang memiliki kepolaran terendah, dimasukkan ke permukaan silika halus untuk membasahi silika agar padat kerapatannya, lalu dihisap menggunakan alat vakum kembali.

Proses selanjutnya adalah menyiapkan sampel untuk difraksinasi. Ekstrak pekat dilarutkan dalam aseton kemudian diimpregnasikan dalam silika gel kasar yang berjumlah sebanyak 2 kali berat sampel, kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang telah berisi fasa diam. Setelah itu kolom siap digunakan, maka dilakukan proses pengelusian menggunakan eluen etil asetat/*n*-heksana. Kolom dihisap dengan vakum sampai kering pada setiap penambahan eluen (tiap kali elusi dilakukan). Kemudian fraksi-fraksi yang diperoleh dikumpulkan berdasarkan pola pemisahan setelah dilakukan pemantauan menggunakan metode KLT (Pratiwi dan Ersan, 2013).

3.3.6.3. Kromatografi Lapis Tipis

Metode KLT dilakukan untuk memonitoring fraksi-fraksi yang diperoleh dari proses KCV dan kromatografi kolom untuk mengidentifikasi senyawa melalui pola pemisahannya dan noda yang dihasilkan. Metode KLT dilakukan dengan sistem campuran eluen menggunakan kombinasi pelarut yang sesuai yaitu berupa *n*-heksana, etil asetat, metanol dan diklorometana. Dalam prosesnya, fraksi-fraksi dari KCV di totolkan pada plat KLT dan dielusi dengan kombinasi eluen yang sesuai, bercak atau noda yang terlihat di gunakan untuk melihat pola pemisahan dan untuk mengidentifikasi senyawa dilihat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Wulandari, 2011).

Noda pada plat KLT dapat ditampakan pada kromatogram dengan cara disemprot dengan menggunakan reagen yang sesuai, dan biasanya menggunakan serum sulfat. Nilai R_f dari setiap noda yang terlihat akan di hitung dan di catat, lalu untuk setiap fraksi yang memiliki pola pemisahan dengan R_f yang sama pada kromatogram disatukan dan dipekatkan, sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan yang akan digunakan untuk fraksinasi lebih lanjut yaitu fraksinasi menggunakan kromatografi kolom (KK).

3.3.6.4. Kromatografi Kolom (KK)

Setelah diperoleh fraksi-fraksi dengan pengelompokan lebih sedikit, tahapan fraksinasi selanjutnya dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Dalam prosesnya, adsorben silika gel Merck 60 (35-70 Mesh) di larutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusian. Campuran tersebut diaduk hingga terbentuk suatu *slurry*. *Slurry* dari silika gel dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kolom, fasa diam diatur hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya sampel yang telah diimpregnasi pada silika gel ke dalam kolom yang berisi fasa diam.

3.3.6.5. Analisis LC-MS/MS

Kristal yang terbentuk dari hasil kromatografi kolom seberat 5 mg ditimbang lalu dilarutkan dalam 4 mL metanol. Kristal terlarut kemudian disaring dengan PTFE 0,22 μm . Sebanyak 2,0 μL filtrat sampel diinjeksikan ke dalam instrument LC-MS/MS. Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vanquish Flex UHPLC-Q Exactive Plus Orbitrap-High Resolution Mass Spectrometer*. Kolom yang digunakan adalah Accucore C₁₈ dengan dimensi (10 mm x 2,1 mm, 2,6 μm). Fase gerak yang digunakan berupa 0,1% asam format dalam air (A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (B). Spektrum data kristal yang diperoleh kemudian dicocokkan dengan *database* senyawa yang berhasil diidentifikasi dari ekstrak kasar kulit batang tumbuhan turi putih yang juga menggunakan analisis LC-MS/MS.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Berdasarkan uji antiinflamasi, nilai rata-rata IC_{50} yang diperoleh dari masing-masing variasi pelarut pengekstrak kulit batang tumbuhan turi putih berupa metanol 100% sebesar 135,47 $\mu\text{g/mL}$, etil asetat sebesar 100% sebesar 117,54 $\mu\text{g/mL}$ dan metanol:etil asetat 50% sebesar 216,17 $\mu\text{g/mL}$.
2. Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari masing-masing variasi pelarut pengekstrak, yaitu ekstrak metanol 100%, etil asetat 100% dan metanol:etil asetat 50% termasuk tingkat antiinflamasi dalam kategori sedang.
3. Analisis PCA dengan data luas area berhasil mengelompokkan total komponen sebesar 83% ekstrak kulit batang tumbuhan turi putih secara baik berdasarkan variasi pengekstrak.
4. Berdasarkan analisis OPLS-DA diperoleh informasi variasi pelarut pengekstrak terbaik yaitu etil asetat 100%.
5. Senyawa penciri atau *variabel important* yang berhasil diisolasi dari ekstrak etil asetat 100% kulit batang tumbuhan turi putih berupa kristal berwarna kuning (NV28) yang diidentifikasi sebagai senyawa sesbagrandidflorain C dan kristal berwarna kuning (NV29) yang juga diidentifikasi sebagai senyawa sesbagrandidflorain B.
6. Berdasarkan isolasi senyawa diperoleh kristal murni NV28 berwarna kuning sebanyak 7,2 mg, kristal murni NV29 berwarna kuning sebanyak 5 mg dan kristal jarum murni NV30 berwarna putih sebanyak 6,4 mg.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, didapatkan saran untuk penelitian selanjutnya yaitu :

1. Perlu dilakukan penambahan jumlah serbuk kulit batang turi putih pada proses isolasi agar diperoleh senyawa murni yang lebih banyak.
2. Perlu dilakukan analisis spektrofotometer FTIR dan NMR untuk mengidentifikasi struktur senyawa murni yang diperoleh secara lengkap.
3. Perlu dilakukannya isolasi senyawa bioaktif lainnya selain antiinflamasi menggunakan metabolomik, seperti antikanker dan antidiabetes.

DAFTAR PUSTAKA

- Abate, M. and Abel, S.K. 2005. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy 21st edition*. Lippincot William and Wilkins. Phildelphia.
- Aditya, M. R. 2015. Potensi Antiinflamasi Jus Buah Mangga (*Garcinia mangostana*) Terhadap Denaturasi Protein In Vitro. *Jurnal Berkala Kedokteran*. 149-156.
- Avalaskar, A.N., Itankar, P. R., Joshi, V. S., Agrawal, M., Vyas, J. 2011. Phytochemical and TLC Studies of Ethanolic Extract of *Sesbania grandiflora* (Fabaceae). *International J. of Pharm. Tech. Res.* 3 (3): 1346-1349.
- Bahera, M., Karki, R., and Shekar, C. 2012. Prelimiary Phytochemical Analysis of Leaf and Bark Methanolic Extract of *Sesbania grandiflora*. *The J. of Phytopharmacology*. 1 (2). 10-20.
- Brerenton, R. G. 2003. *Chemometrics: Data Analysis for The Laboratory and Chemical Plant*. John Willey & Sons. England.
- Dunn, W. B. dan Eilis, D. I. 2005. Metabolomik: Platform dan Metodologi Analitik Saat Ini. *Trends Analyt Chem.* 24: 285–294.
- Dorland, W.A.N. 2002. Kamus Kedokteran Dorland Edisi 29. EGC. Jakarta.
- Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., Heyden, V. Y., 2018. A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *J. Food Control*. 93. 165–182.
- Hajnos, M. W., Waksmundzka, dan Sherma, J. 2011. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton.
- Hambal, M., Darmawi., Nurmayasari., Balqis, U., Ferasyi, T. R. dan Aisyah, S. 2016. Konsentrasi Protein Antigen Ekskretori/Sekretori dan Somatik Pada *Fasciola gigantica* dan *Eurytrema pancreaticum*. *J. Med. Vet.* 10 (2). 128-130.
- Hariana, A. H. 2013. *262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Penerbit Swadaya. Jakarta.
- Harmita. 2006. *Analisis Fisikokimia*. Universitas Indonesia. Depok.

- Harris, D. 2004. *Exploring Chemical Analysis 3rd ed.* Freeman & Co. New York.
- Hasan, N., Osman, H., Mohammad, S., Chong, W. K. 2012. The Chemical Components of *Sesbania grandiflora* Root and Their Antituberculosis Activity. *Pharmaceuticals*. 5 : 882–889.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. PT. Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Kementrian Kesehatan. 2018. *Penyakit-penyakit Disertai Inflamasi*.
www.depkes.go.id. diakses pada tanggal 30 April 2022 pukul 10.00 WIB
- Krastanov, A. 2010. Metabolomik-the state of art. *Biotechnol & Biotechnol*. 24: 1537–1543.
- Kristianti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Universitas Airlangga Press. Surabaya.
- Markham, K. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Minarti., Ruga, R., dan Marliana, E. 2021. Aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol daun pare hutan (*Momordica balsamina* Linn.) dalam menghambat denaturasi protein. Prosiding seminar nasional kimia 2021. *Kimia FMIPA UNMUL*. 103-107.
- Mycek, J. Mary, Richard A. dan Harvey, P. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. II. Widya Medika. Jakarta.
- Mohan. 2003. *Buffer: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. Calbiochem. Germany.
- Nista, D., Hesti, N., dan Sri, H. 2010. *Keunggulan Turi sebagai Pakan Ternak*. BPTU Sembawa. Palembang.
- Noviany, N., Nurhidayat, A., Hadi, S., Suhartati, T., Aziz, M., Purwitasari, N., and Subasman, I. 2018. Sesbgrandiflorain A and B : isolation of two new 2-arylbenzofurans from the stem bark of *Sesbania grandiflora*. *Nat. Prod. Res.* 32 (21): 2558-2564.
- Noviany, N., Samadi. A., Yuliyani, N., Hadi, S., Aziz, M., Purwitasari, N., Mohamad, S., Ismail. N. N., Gablec K. P., and Mahmud, T. 2020. Structure Characterization and Biological Activity of 2-arylbenzofurans from an Indonesia Plant *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Phytochem. Lett.* 35 : 211-215.
- Pratiwi, A. dan Ersan, T. 2013. Uji Kemurnian Dua Senyawa dari Ekstrak Metanol Kayu Batang *Garcinia cylindrocarpa*. *J. Sains dan Seni*. 2(1) : 1-4.

- Rafi, M. 2013. Quality Control Methods for Some *Zingiberaceous* Plant From Indonesia using Liquid Chromatography Combined with Chemometrics. [Disertasi]. Gifu University.
- Ramesh, T., Sureka, C., Bhuvana, S., and Hazeena, B. V. 2010. *Sesbania grandiflora* Diminishes Oxidative Stress and Ameliorates Antioxidant Capacity in Liver and Kidney of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *J. Phys. Pharm.* 61(4):467-472.
- Salni., H. Marisa, dan R. W. M. 2011. Isolasi Senyawa Antibakteri dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum Benth*) dan Penentuan Nilai KHM-nya. *J. Penelit. Sains.* 14: 1–2.
- Shareef, H., Rizwani, G. H., Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., and Zahid, H. 2012. Tocopherol and Phytosterol Profile of *Sesbania grandiflora* (Linn.) Seed Oil. *J. Med. Plants Res.* 6(18): 3478–3481.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. CV Anugrah Utama Raharja Anggota IKAPI. Bandar Lampung.
- Syamsudin, S., Alimuddin, A. H., dan Sitorus, B. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Fenolik Dari Daun Putat (*Planchonia valida* Blume). *Indonesia J. Pure and Appl. Chem.* 5 (2). 85-98.
- Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., dan Wilson, I. D. 2012. Kromatografi Cair-Spektrometri Massa Berbasis Profil Metabolit Global: Tinjauan. *Anal. Chim. Acta.* 711: 7–16.
- Thevenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., Junot, C. 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statical Analyses. *J. of Proteom. Res.* 1-14.
- Tjay, T. H. dan Raharja. 2002. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya Edisi V*. PT. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia. Jakarta.
- Uncu, O., and Ozen, B. 2019. A comparative study of mid-infrared, UV-Visible and fluorescence spectroscopy in combination with chemometrics for the detection of adulteration of fresh olive oils with old olive oils. *Food Control.* 105. 209-218.
- Williams, L. A. D., Connar, O., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whitaker, J. A., Conrad, J., Vogler, B., Rosner, H and Kraus, W. 2008. The in vitro Anti-denaturation Effects Induced by Natural Products and Non-steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is

Proposed as a Screening Assay for the Detection of Anti-inflammatory Compounds, without the use of Animals, in the Early Stages of the Drug Discovery Process. *J. Med.* 57(4): 327–330.

Wink, M., and Mohamed, G. I. A. 2003. Evaluation of Chemical Defents Traits in The Leguminoseae: Mepping of Distribution Patterns of Secondary Metabolits on a MolecularPhylogeny Inferred from Nucleotide Sequances of The *rbcl* Gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31(8): 897–917.

Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. PT. Taman Kampus Persindo. Jember.