

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
DARI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack)
SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

(Skripsi)

Oleh

RISTA ANGGI PRAMUDIA



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

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS FROM SUNGKAI LEAVES (*Peronema canescens* Jack) AND THE ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST

By

Rista Anggi Pramudia

Sungkai plant is a species of the Verbenaceae family which has the Latin name *Peronema canescens* Jack which is used for traditional medicine because it has anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, antioxidant and antimalarial activities. The purpose of this study was to examine the antioxidant activity of the ethyl acetate fraction from Sungkai leaves using the DPPH method and to isolate and identify secondary metabolites from Sungkai leaves. The stages of the research carried out included sample preparation, sample extraction using the maceration method, fractionation using the vacuum liquid chromatography method and column chromatography, testing the antioxidant activity using UV-Vis spectrophotometer, purification analysis using the thin layer chromatography method, for the appearance of compounds by ¹H-NMR spectrophotometer. The results showed that of the 5 fractions namely FEA, FEB, FEC, FED, and FEE vacuum liquid chromatography results had antioxidant activities of 2,055 ppm, 0,848 ppm, 3,277 ppm, 2,370 ppm and 0,689 ppm respectively. Two compounds that were successfully isolated from the FEB fraction were coded NV31 and NV32. Compound NV31 has physical properties of white needle crystals of 3 mg while compound NV32 has physical properties of yellow needle crystals of 3.6 mg. The NV31 compound is a β -sitosterol compound from the steroid group, which has been reported by Baskar *et al.*, (2010), has antioxidant activity with an IC₅₀ value of 389.5 μ M using the DPPH method. As for NV32, it is a mixture of steroid and triterpenoid compounds, one of which has similarities to the peronemin B1 compound. Kitagawa *et al.* (1994) reported that it was isolated from sungkai leaves and has antimalarial activity *in vitro* against *Plasmodium falciparum* at a dose of 118 μ M. (43 μ g/mL) and was stated to inhibit the growth of plasmodium.

Keywords: *Peronema canescens*, β -sitosterol, Peronemin B1, Antioxidant.

ABSTRAK

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack) SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

Oleh

Rista Anggi Pramudia

Tanaman sungkai merupakan salah satu spesies dari famili Verbenaceae yang memiliki nama latin *Peronema canescens* Jack yang digunakan untuk obat tradisional karena memiliki aktivitas antiinflamasi, antibakteri, antivirus, antioksidan, dan antimalaria. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk menguji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat dari daun sungkai menggunakan metode DPPH serta mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari daun sungkai. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi persiapan sampel, ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi, fraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom, pengujian aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, analisis kemurnian menggunakan metode kromatografi lapis tipis, untuk identifikasi senyawa dengan spektrofotometer ¹H-NMR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari ke-5 fraksi yakni FEA, FEB, FEC, FED, dan FEE hasil kromatografi cair vakum memiliki aktivitas antioksidan masing-masing sebesar 2,055 ppm, 0,848 ppm, 3,277 ppm, 2,370 ppm dan 0,689 ppm. Dua senyawa yang telah berhasil diisolasi dari fraksi FEB diberi kode NV31 dan NV32. Senyawa NV31 memiliki sifat fisik kristal jarum berwarna putih sebanyak 3 mg sedangkan senyawa NV32 memiliki sifat fisik kristal jarum berwarna kuning sebanyak 3,6 mg. Untuk senyawa NV31 adalah senyawa β -sitosterol dari golongan steroid, yang telah dilaporkan oleh Baskar *et al.*, (2010), memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 389,5 μ M menggunakan metode DPPH. Sedangkan untuk NV32 merupakan campuran senyawa dari senyawa steroid dan triterpenoid yang salah satu senyawanya memiliki kemiripan dengan senyawa peronemin B1 telah dilaporkan oleh Kitagawa *et al.*, (1994) diisolasi dari daun sungkai dan memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* dengan dosis 118 μ M (43 μ g/mL) dan dinyatakan dapat menghambat pertumbuhan plasmodium.

Kata Kunci: *Peronema canescens*, β -sitosterol, Peronemin B1, Antioksidan.

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
DARI DAUN SUNGKAI (*Peronema canescens* Jack)
SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

Oleh
Rista Anggi Pramudia

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 Penelitian : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
METABOLIT SEKUNDER DARI DAUN SUNGKAI
(*Peronema canescens* Jack) SERTA UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN**

Nama : Rista Anggi Pramudia


NPM : 1817011013


Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




1. Komisi Pembimbing


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


Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.
NIP. 197104151995121001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, Ph. D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

: **Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.**



Sekretaris

: **Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.**



Anggota

: **Diky Hidayat, S.Si., M.Sc.**

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 05 Juni 2023

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rista Anggi Pramudia

NPM : 1817011013

Jurusan : Kimia

Judul Skripsi : Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Daun
Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Serta Uji Aktivitas
Antioksidan

Menyatakan bahwa skripsi ini merupakan hasil dari penelitian yang dikerjakan oleh saya pribadi. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa skripsi ini merupakan hasil salinan atau dikerjakan oleh orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi-sanksi akademik yang berlaku.

Bandar Lampung, 10 Juni 2023
Yang menyatakan



Rista Anggi Pramudia
NPM. 1817011013

RIWAYAT HIDUP



Rista Anggi Pramudia lahir di Belitang, Kecamatan Belitang, Kabupaten OKU Timur, Sumatera Selatan pada tanggal 27 Agustus 2000 sebagai anak pertama dari 2 bersaudara, putri bapak Sutino dan ibu Sri Rohani. Penulis menyelesaikan pendidikan di TK Al-Ma'arif pada tahun 2006, Sekolah Dasar di SDN Ganjar Agung tahun 2006-2012, kemudian penulis menyelesaikan pendidikan sekolah menengah pertama di SMP PGRI Sumber Agung pada tahun 2015, dan menyelesaikan pendidikan sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Buay Madang tahun 2015-2018. Selanjutnya pada tahun 2018 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah mengikuti organisasi Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) yaitu sebagai anggota bidang SPIK (Sains dan Penalaran Ilmu Kimia) periode 2019-2020, anggota bidang kesekretariatan di Natural periode 2019-2020, anggota HUMAS (Hubungan Masyarakat) UKMD di IKAM OKUT (Ikatan Mahasiswa OKU Timur) periode 2019-2020, sekretaris bidang I MC (Media Center) di IKAM OKUT periode 2020-2021, sekretaris umum di IKAM OKUT periode 2021-2022, dan dewan pembina di IKAM OKUT periode 2022-2023. Penulis juga pernah menjadi narasumber pada pelatihan kesekretariatan IKAM OKUT pada tahun 2021, menjadi asisten praktikum Kimia Organik Jurusan Biologi, praktikum Kimia Organik II Jurusan Kimia, Praktikum Kimia Organik III Jurusan Kimia, dan Praktikum Kimia Organik I Jurusan Kimia FMIPA.

MOTTO

**“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sebelum mereka mengubah keadaan diri mereka sendiri.”
(Q.S. Ar Rad : 11)**

**"Perjalanan seribu mil dimulai dengan satu langkah."
(Lao Tzu)**

**“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.
Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan.”
(Q.S. Al-Insyirah : 5-6)**

**"Ketakutan adalah penjara bernama kegagalan. Taklukan rasa takut karena sukses adalah hak pemberani."
(Jefri Al Buchori)**

**“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”
(Q.S. Al Baqarah : 286)**

**“Sekecil apapun pergerakan yang kamu lakukan, pasti akan mampu merubah segala hal.”
(Rista Anggi Pramudia)**

SANWACANA

Alhamdulillah rabbil 'alamin. Puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala nikmat dan karunia-Nya yang tak terhingga serta kasih sayang yang selalu diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Sungkai (*Peronema canescen* Jack) Serta Uji Aktivitas Antioksidan”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Tentunya selama penulisan dan pelaksanaan skripsi ini tak terhitung berapa banyak kesulitan yang menghadang, namun semua itu dapat dilalui berkat pertolongan dari Allah dan tentunya dari doa tiada henti yang selalu diucapkan oleh orang tua penulis. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orangtua tercintaku, bapak Sutino dan ibu Sri Rohani, atas seluruh doa, kasih sayang, dukungan dan motivasi kepada penulis serta semua pengorbanan yang sudah diberikan kepada penulis, semoga Allah selalu memberikan kesehatan, kemudahan, kelancaran, perlindungan di setiap langkahnya, *Aamiin Yaa Robbal Alamiin.*
2. Ibu Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si., selaku pembimbing akademik dan pembimbing I yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, keikhlasan, memberikan arahan, dan motivasi sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah membalas kebaikan beliau dengan kebaikan, diberikan kesehatan, kelancaran setiap langkahnya serta keberkahan yang tak terhingga.
3. Bapak Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Si., selaku pembimbing II yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan sehingga skripsi penulis dapat terselesaikan dengan baik. Semoga Allah membalas kebaikannya.

4. Bapak Diky Hidayat, S.Si., M.Si., selaku pembahas dalam penelitian yang telah memberikan nasihat, bimbingan dengan kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga Allah membalasnya dengan kebaikan.
5. Bapak Ibu dosen jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu dan ilmu yang diberikan selama penulis menjalani perkuliahan. Semoga Allah melimpahkan keberkahan yang tak terhitung kepada Bapak dan Ibu.
6. Adikku tercantik Ervika Arum Dwiningtyas yang selalu memberikan kasih sayang, motivasi, semangat serta dukungannya kepada penulis. Semoga Allah memberikan kesehatan, kemudahan disetiap langkahnya, dan lulus tepat waktu.
7. Keluarga besar Markam dan keluarga besar Setu yang telah memberikan motivasi, semangat serta dukungannya kepada penulis.
8. Kepada pemilik NRP 21190042610600 yang telah memberikan motivasi, semangat, dukungan, bantuan, pendengar, pengingat, kasih sayang kepada penulis. Semoga Allah selalu memberikan kesehatan, kemudahan dan kelancaran setiap langkahnya.
9. Kedua orangtuaku, bapak Amir Mahmud dan ibu Sri Wahyuni, mbak Yunita Amriana, mas Muhammad Ridho, sicantik Hafsha, dan mbak widya terimakasih telah memberikan motivasi, semangat, dukungan kepada penulis, semoga Allah selalu melindungi dan memberikan kemudahan setiap langkahnya.
10. Teman-teman seper bimbingan Ofriani Fatrika, Wulandari Agustin, dan Reni Yulian Dani terimakasih atas bantuan, motivasi, dan kerjasamanya yang telah diberikan kepada penulis selama ini.
11. *Noviany's Research Group*, kak Arif, kak Hanif, mbak Azizah, mbak Aulia Gadis, mbak Uswatun, mbak Dita, mbak Feni, Ofri, Age, Reni, Jihan, Sayidah, Havier, dan Devi terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.
12. Rekan-rekan peneliti di Laboratorium Organik, mbak Kartika, mbak Rinda, kak Jeremia, mbak Rami, kak Kadek, Kania, Rizki Hadiwijaya,

Ara, Andika, Ramah Nia, Armidla, Farah, Akmal, semoga Allah selalu memudahkan segala urusannya.

13. Teman-teman kosanku Widya Hadi, Ramah Nia Faliha, dan Raisati Hikmah yang selalu menjadi pendengar, semangat, dan motivasi kepada penulis.
14. Teman-teman Organisasi UKMD IKAM OKUT yang selalu memberikan semangat dan motivasi kepada penulis.
15. Teman-teman seperjuangan *Chemistry* 2018 terimakasih atas kebersamaanya selama menempuh studi di jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
16. Almamaterku tercinta Universitas Lampung.
17. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa dukungan moril maupun materi.

Semoga segala kebaikan dan pertolongan yang diberikan kepada penulis dapat dibalas oleh Allah SWT dengan limpahan nikmat dan pahala. Penulis sangat menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis secara pribadi maupun bagi pembaca. *Aamin Ya Robbal Alamin.*

Bandar Lampung, 10 Juni 2023

Rista Anggi Pramudia

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Verbenaceae.....	5
2.2. Tanaman Sungkai.....	5
2.3. Efek Farmakologi.....	7
2.4. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder.....	8
2.4.1.Fenolik	9
2.4.2.Terpenoid	10
2.5. Metabolit Sekunder Hasil Isolasi dari Tanaman Sungkai	10
2.6. Metabolit Sekunder	13
2.6.1 Isolasi.....	13
2.6.2.Ekstraksi.....	13
2.6.3.Kromatografi	14
2.7. Karakterisasi Senyawa Murni	17
2.7.1.Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis).....	17
2.7.2.Spektrofotometer <i>Infra Red</i> (IR).....	18
2.7.3.Spektrofotometer <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR)	19
2.8. Radikal Bebas	20
2.9. Antioksidan.....	21
2.9.1.Klasifikasi Antioksidan.....	22
2.9.2.Mekanisme Kerja Antioksidan.....	23
2.9.3.Metode Pengujian Antioksidan	24

III. METODE PENELITIAN	28
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	28
3.2. Alat dan Bahan.....	28
3.2.1. Alat-alat yang digunakan	28
3.2.2. Bahan-bahan yang digunakan	28
3.3. Prosedur Penelitian.....	29
3.3.1. Persiapan Sampel.....	29
3.3.2. Ekstraksi dengan berbagai pelarut.....	29
3.3.3. Kromatografi Cair Vakum (KCV).....	30
3.3.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	30
3.3.5. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	31
3.3.6. Kromatografi Kolom (KK)	32
3.3.7. Analisis Kemurnian	33
3.3.8. Spektrofotometer Resonansi Magnetik Nuklir (NMR)	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1. Ekstraksi	34
4.2. Kromatografi Cair Vakum (KCV)	35
4.3. Hasil Uji Antioksidan Fraksi KCV	36
4.4. Kromatografi Kolom	38
4.5. Karakterisasi dengan Spektrofotometer ¹ H-NMR	43
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1. Kesimpulan	34
5.2. Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Letak Pergeseran Kimia dalam Spektra $^1\text{H-NMR}$	19
Tabel 2. Letak Pergeseran Kimia dalam Spektra $^{13}\text{C-NMR}$	20
Tabel 3. Fraksi gabungan hasil KCV	35
Tabel 4. Massa fraksi gabungan FEE	39
Tabel 5. Massa fraksi sub fraksi hasil fraksinasi FEB	42
Tabel 6. Perbandingan Data Pergeseran Kimia $^1\text{H-NMR}$ Senyawa NV31 dengan β -sitosterol dalam pelarut CDCl_3	45
Tabel 7. Perbandingan Data Pergeseran Kimia $^1\text{H-NMR}$ Senyawa NV32 dan Peronemin B1.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Tanaman Sungkai a) pohon sungkai; b) batang sungkai; c) daun sungkai	7
Gambar 2. Struktur senyawa <i>1,1'-binaphthalene-2,2'-diol</i> (1), serta senyawa <i>Sesbgrandiflora</i> A-C (2-4) hasil isolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang tanaman turi.....	9
Gambar 3. Struktur senyawa asam betulinat (5) dan stigmasterol (6) dari daun sungkai	11
Gambar 4. Struktur Apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) (7)	11
Gambar 5. Struktur senyawa diterpen yang telah diisolasi dari ekstrak etil asetat daun sungkai (8-14).....	12
Gambar 6. Reaksi reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan	25
Gambar 7. Reaksi peredaman radikal bebas oleh vitamin C.....	26
Gambar 8. KLT fraksi hasil KCV (a) pada UV 254 nm dan (b) pada UV 366 nm	35
Gambar 9. KLT 5 fraksi gabungan (a) pada UV 254 nm dan (b) pada UV 366 nm	36
Gambar 10. Kurva regresi linier FEA (a); FEB (b); FEC (c); FED (d); FEE (e); kontrol positif (f).	37
Gambar 11. Kromatografi Kolom FEE.....	38
Gambar 12. Hasil KLT 10 Fraksi, (a) pada UV 254 nm dan (b) pada UV 366 nm	39
Gambar 13. Kromatogram hasil KLT FEE2 pada UV 366 nm.....	40
Gambar 14. Kromatogram KLT FEB pada UV 254 nm.....	40
Gambar 15. Senyawa NV31	41

Gambar 16. Hasil KLT senyawa NV31 dengan fase gerak (a) <i>n</i> -heksana:etil asetat (8,5:1,5); (b) <i>n</i> -heksana:aseton (9:1); (c) dan <i>n</i> -heksana:DCM (6:4) setelah disemprot dengan serum sulfat	41
Gambar 17. Kromatogram sub fraksi hasil fraksinasi FEB (λ_{UV} :254 nm)	42
Gambar 18. Senyawa NV32	42
Gambar 19. Kromatogram KLT senyawa NV32 dengan variasi fase gerak (a) <i>n</i> -heksana:etil asetat (9:1); (b) <i>n</i> -heksana:DCM (6:4); (c) dan kloroform:aseton (9,5:0,5) setelah disemprot dengan serum sulfat ..	43
Gambar 20. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa NV31	44
Gambar 21. Senyawa β -sitosterol.	45
Gambar 22. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa NV32	46
Gambar 23. Struktur senyawa peronemin B1.	48

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dalam kehidupan sehari-hari diabetes melitus, kelainan neurodegeneratif (penyakit parkinson, penyakit alzheimer dan *multiple sclerosis*), penyakit kardiovaskular (aterosklerosis dan hipertensi) (Simanjuntak dan Zulham, 2020), peradangan (Simanjuntak, 2012), dan lainnya yang berbahaya hingga mematikan disebabkan oleh keadaan stres oksidatif. Keadaan stres oksidatif yang terjadi akibat radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif tingkat sel, jaringan hingga organ tubuh yang akan mempercepat proses penuaan dan munculnya penyakit.

Salah satu cara dalam menghambat kerusakan-kerusakan keadaan stres oksidatif dengan senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan inhibitor proses oksidasi, bahkan pada konsentrasi yang relatif kecil (Andarina dan Djauhari, 2017). Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif (Werdhasari, 2014). Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga yaitu antioksidan endogen (enzim antioksidan) yang sudah diproduksi di dalam tubuh manusia, antioksidan alami yang diperoleh dari bahan-bahan alam, dan antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan (Parwata, 2016).

Senyawa antioksidan sangat diperlukan oleh tubuh yakni untuk memperbaiki kerusakan sel yang berlebihan akibat radikal bebas (Zulaikhah, 2017), menjaga kesuburan (Simanjuntak, 2012), antipenuaan, perlindungan dari UV, kekebalan tubuh, serta perlindungan dari ROS (*Reactive Oxygen Species*) akibat stress

oksidatif (Haerani dkk., 2018). Keadaan stres oksidatif yang terjadi akibat radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif tingkat sel, jaringan hingga organ tubuh yang akan mempercepat proses penuaan dan munculnya penyakit. Mekanisme kerja antioksidan yang berhubungan pada beberapa penyakit tersebut yang dapat menimbulkan berbagai masalah kesehatan antara lain: (1) Efek antiaterosklerosis, (2) Antiinflamasi, (3) Efek antitrombogenik, (4) Efek antiosteoporosis, dan (5) Efek antitumor (Simanjuntak, 2012).

Studi epidemiologi menunjukkan bahwa adanya peningkatan konsumsi antioksidan alami yang terdapat dalam buah, sayur, bunga dan bagian-bagian lain dari tumbuhan dapat mencegah penyakit-penyakit akibat stres oksidatif.

Antioksidan alami dapat diperoleh dari tanaman, seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E dan senyawa fenolik (flavonoid) (Parwata, 2016). Antioksidan sintetis sudah banyak digunakan di masyarakat baik pada minuman maupun makanan kemasan yang dijual di pasaran. Suplementasi antioksidan sekarang diakui sebagai sarana penting untuk meningkatkan perlindungan radikal bebas (Sehwag *and* Das, 2013). Menurut hasil penelitian Amarowicz *et al.*, (2000) menyatakan bahwa penggunaan bahan sintetis dapat meningkatkan risiko penyakit kanker.

The World Health Organization (WHO) telah merekomendasikan pengobatan tradisional, *back to nature* dengan memanfaatkan potensi bahan alam, yang memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan penggunaan obat sintetis, karena pengobatan secara tradisional menggunakan tumbuhan, mikroba, dan sumber lainnya, hampir tidak ada efek negatif yang ditimbulkan (Latief *et al.*, 2021). Kemampuan bahan alam sebagai bahan pengobatan dari senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya, menjadikan sebagai salah satu sumber alternatif untuk menyembuhkan penyakit tertentu.

Metabolit sekunder adalah produk yang dihasilkan dari proses metabolisme sekunder (Silalahi, 2013). Golongan senyawa metabolit sekunder diantaranya yaitu golongan senyawa fenolik, flavonoid, saponin, minyak atsiri, tanin, alkaloid, dan steroid. Sumber antioksidan yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa flavonoid, triterpenoid, dan steroid (Hardiningtyas dkk., 2014).

Salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa fenolik (flavonoid), triterpenoid, dan steroid adalah tanaman sungkai yang banyak ditemukan di Indonesia yaitu di pulau Sumatera, Kalimantan, Kepulauan Riau, sebagian Jawa dan Sulawesi (Ningsih dan Ibrahim, 2013). Berdasarkan penelitian Ramadenti *et al.*, (2017) dilaporkan beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun sungkai yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan fenolik.

Pindan dkk., (2021), melakukan penelitian pada beberapa fraksi daun sungkai yakni, ekstrak kasar, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa yang mana memiliki nilai IC_{50} masing-masing sebesar 29,549 ppm, 607,475 ppm, 12,986 ppm dan 15,766 ppm.

Berdasarkan pemaparan informasi diatas, bahwa tanaman sungkai pada bagian daun berpotensi sebagai antioksidan sehingga mendorong penulis untuk melakukan penelitian lebih lanjut. Oleh karena itu, maka dalam penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH serta isolasi senyawa metabolit sekunder dari daun sungkai dari fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menguji aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat daun sungkai (*P. canescens* Jack) dengan menggunakan metode DPPH.
2. Mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari daun sungkai (*P. canescens* Jack).

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan metabolit sekunder dari daun sungkai (*P. canescens* Jack) serta dapat digunakan sebagai *database* tambahan sumber alami tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Verbenaceae

Famili Verbenaceae dari sekitar 99 genera dan 3151 spesies tersebar terutama di daerah tropis dan subtropis. Di Bangladesh, famili ini diwakili oleh 19 genera dan 68 spesies. Sekitar 22 genera dan lebih dari 30 spesies telah dilaporkan dari India. Beberapa genera famili Verbenaceae di antaranya adalah Clerodendrum (400, kemuliaan-bower), Verbena (250, vervain), Vitex (250, pohon suci), Lippia (220, buah kodok), Lantana (150), Callicarpa (140, *beauty-berry*), Stachytarpheta (100) dan Tectona (3, jati) dari berbagai belahan bumi (Roy *et al.*, 2016).

Verbenaceae merupakan salah satu famili dari ordo Lamiales. Famili ini juga bisa dikenal sebagai Verbena atau Vervain, memiliki tipe daun tunggal. Verbenaceae merupakan famili yang habitatnya berupa herba dan perdu. Salah satu spesies dari Verbenaceae adalah *P. canescens* (Heywood *et al.*, 2007).

2.2. Tanaman Sungkai

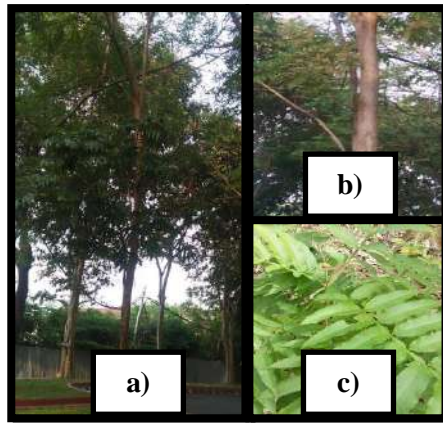
Secara alami tanaman sungkai terdapat di Pulau Kalimantan, Sumatera, Kepulauan Riau dan Jawa Barat. Sungkai yang terdapat di Jawa Barat berasal dari Lampung, kemudian tumbuh secara alami (Wilarso, 2000). Tanaman sungkai sering disebut sebagai jati sabrang, ki sabrang, kurus sungkai, atau sekai (Yani dkk., 2013).

Menurut Plantamor (2022), klasifikasi tanaman sungkai sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheobionta
Super divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Subkelas : Asteridae
Ordo : Lamiales
Famili : Verbenaceae
Genus : *Peronema*
Spesies : *Peronema canescens* Jack.

Tanaman sungkai termasuk ke dalam tanaman kayu-kayuan yang diameternya mencapai 60 cm yang mampu tumbuh hingga setinggi 20-30 m dan memiliki batang bebas cabang sekitar 15 m. Batang sungkai berwarna abu-abu atau sawo matang dengan bentuk yang lurus berlekuk kecil, beralur dangkal terkelupas kecil dan tipis. Penampang kulit luar batangnya memiliki warna kekuningan, merah muda, hingga coklat. Daun bersirip ganjil dan majemuk yang terletak berpasangan atau berselang serta lancip pada ujung daunnya (Fransisca dkk., 2020). Bunga sungkai berbentuk malai di ujung atau ketiak daun atas, ukurannya besar dan bercabang-cabang dengan panjang sekitar 20-60 cm. Pada umumnya buah akan muncul setelah dua bulan musim bunga. Buah sungkai berupa buah batu beruang empat, kering, bulat, kecil dan berbiji banyak. Namun biji sungkai sulit dikecambahkan (Wilarso, 2000). Perakarannya menyebar dangkal dan tidak tahan terhadap kekurangan zat asam lebih dari sepuluh hari.

Tanaman sungkai dapat tumbuh dengan baik pada ketinggian 0-600 meter di atas permukaan laut pada cuaca tropis dengan rata-rata curah hujan tahunan 2100-2700 mm. Penanaman pohon sungkai memerlukan tanah dengan kandungan unsur hara yang baik dan tidak dianjurkan dilakukan pada tanah yang terbentuk antara batuan kapur pasir yang bercampur dengan tanah liat, yang kadar airnya rendah atau dikenal dengan tanah mergel, karena tanaman akan menjadi layu dan kering (Fransisca dkk., 2020).



Gambar 1. Tanaman Sungkai **a)** pohon sungkai; **b)** batang sungkai; **c)** daun sungkai

2.3. Efek Farmakologi

Daun muda tanaman sungkai dari suku Verbenaceae, secara tradisional sering digunakan sebagai obat pilek, obat cacingan (*ringworms*), pencegah sakit gigi dengan cara berkumur, campuran rempah di air mandi bagi wanita yang baru saja melahirkan dan sebagai penurun panas (Fransisca dkk., 2020). Serta hasil penelitian dari Yani dkk., (2013) menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun muda sungkai berpotensi dalam meningkatkan kesehatan (imunitas). Ekstrak etanol daun sungkai dengan dosis 350 mg/kg berat badan mencit memberikan aktivitas paling efektif sebagai antidiabetis, yang dapat menurunkan kadar gula darah mencit diabetes setelah mengurangi volume urin, minum setiap hari, dan berat badan pada tikus diabetes (Latief *et al.*, 2021).

Ekstrak, fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi metanol kulit batang tanaman sungkai tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* sedangkan ekstrak daun sungkai, fraksi etil asetat, fraksi metanol memiliki Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *S. aureus* berturut-turut, 1024 µg/mL dan 512 µg/mL, sedangkan terhadap *E. coli*, ekstrak dan fraksi memiliki KHM dan KBM 512 µg/mL

(Kusriani dkk., 2015). Dari hasil pengamatan dilaporkan bahwa fraksi etil asetat daun sungkai dapat menghambat pertumbuhan parasitemia pada darah *Mus musculus* sebesar 50,89%, lebih besar persentase penghambatannya dibandingkan terhadap kelompok kontrol positif dan negatif (Ramadenti *et al.*, 2017).

Hasil penelitian dari Latief *et al.*, (2021) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sungkai dengan konsentrasi 15% memiliki aktivitas antiinflamasi mencapai 50% inhibisi. Khasanah (2021), telah berhasil mengisolasi senyawa dengan kode NV21 diperkirakan sebagai flavonoid jenis flavon dari daun sungkai yang berpotensi sebagai inhibitor enzim SARS-CoV-2 Mpro secara *in silico* yang ditunjukkan dengan nilai energi ikatan ligan uji bernilai negatif menggunakan *software Autodock* yaitu *Autodock 4* dan *Autodock vina*.

2.4. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder

Salah satu 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 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).

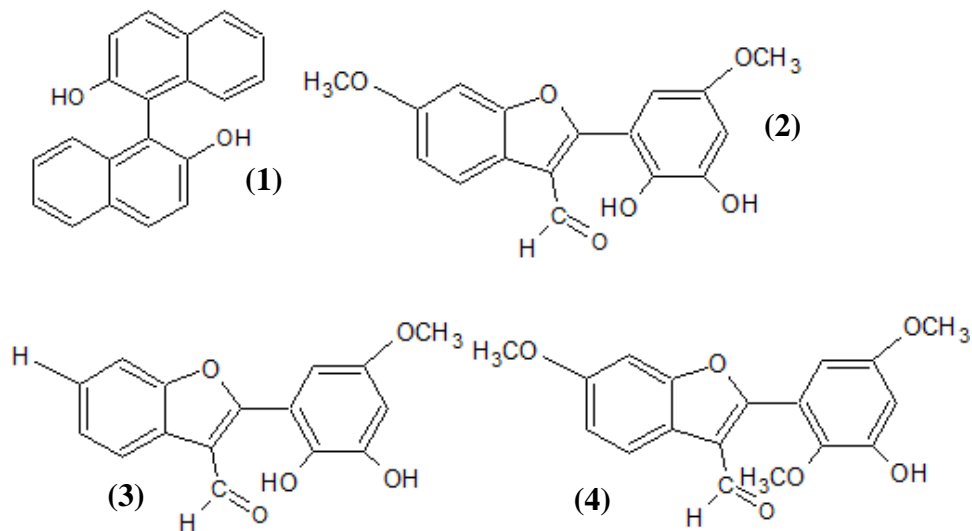
Metabolit ini memiliki aktivitas farmakologi dan biologi. Adapun metabolit sekunder memiliki ciri-ciri yakni: tidak terlibat langsung dalam metabolisme dasar, tidak esensial, berperan di dalam pertahanan terhadap musuh, senyawa organik dengan berat molekul 50-1500 dalton, dan dapat dimanfaatkan sebagai obat, parfum dan lain sebagainya (Saifudin, 2014). Secara garis besar senyawa metabolit sekunder dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu senyawa fenolik dan non-fenolik. Senyawa fenolik dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu fenol sederhana dan asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid, dan tanin (Julianto, 2019). Sedangkan yang termasuk senyawa non-fenolik adalah kelompok terpenoid.

Kelompok terpenoid ini ditemukan dalam berbagai variasi misalnya diterpen dan triterpen glikosida yang disebut saponin.

2.4.1. Fenolik

Senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman dengan karakteristik memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi (OH). Yang mana senyawa ini memiliki sifat dan ciri yang khas yakni, cenderung mudah larut dalam pelarut polar; bila murni, tak berwarna; jika terkena udara akan teroksidasi menimbulkan warna gelap; membentuk kompleks dengan protein; sangat peka terhadap oksidasi enzim; mudah teroksidasi oleh basa kuat; dan menyerap sinar UV-Vis (Julianto, 2019).

Senyawa-senyawa yang berhasil diisolasi dari akar dan kulit batang tanaman turi diantaranya, senyawa *1,1'-binaphthalene-2,2'-diol* (**1**) (Hasan *et al.*, 2012), serta senyawa *Sesbagrandidiflora* A-C (**2-4**) hasil isolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang tanaman turi (Noviany *et al.*, 2020).



Gambar 2. Struktur senyawa *1,1'-binaphthalene-2,2'-diol* (**1**), serta senyawa *Sesbagrandidiflora* A-C (**2-4**) hasil isolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang tanaman turi

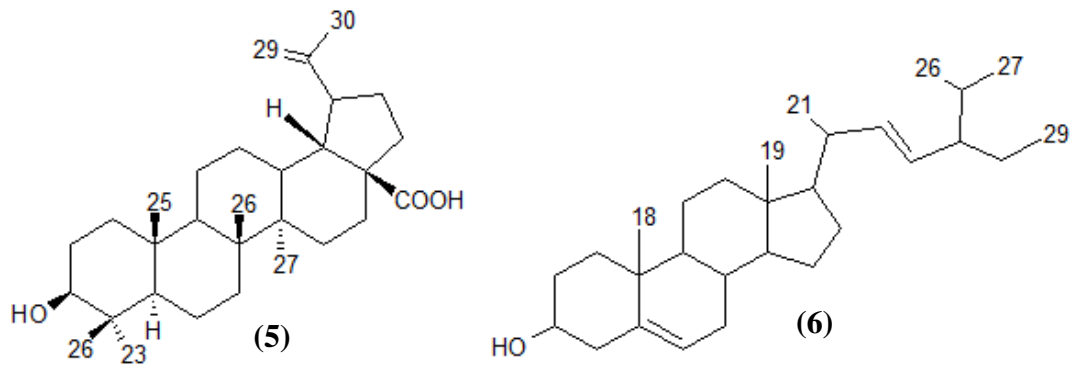
2.4.2. Terpenoid

Terpena merupakan komponen utama dalam minyak turpentine. Nama “terpena” berasal dari kata turpentine (terpentine). Terpena dapat mengandung dua, tiga atau lebih satuan isoprena. Molekul-molekulnya dapat berupa rantai terbuka atau siklik, dapat mengandung ikatan rangkap, gugus hidroksil, gugus karbonil, atau gugus fungsional lain, struktur mirip terpena yang mengandung unsur-unsur lain disamping C dan H disebut terpenoid (Fessenden dan Fessenden, 1982). Sebagian besar terpenoid tidak berwarna, cairan yang memiliki bau, memiliki berat jenis yang lebih ringan daripada air, mudah menguap dengan adanya uap air panas. Sedikit diantaranya berwujud padat seperti *camphor*. Seluruh senyawa terpenoid dapat larut dalam pelarut organik dan biasanya tidak larut dalam air. Kebanyakan terpenoid bersifat optik aktif (Julianto, 2019).

2.5. Metabolit Sekunder Hasil Isolasi dari Tanaman Sungkai

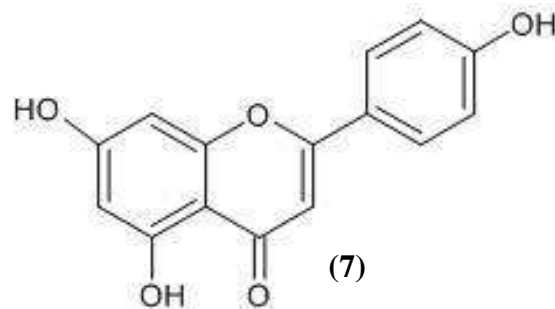
Berdasarkan uji fitokimia daun sungkai yang dilakukan oleh Astuti (2021), bahwa pada ekstrak kasar metanol menunjukkan adanya kandungan saponin, fenol, steroid, dan flavonoid. Hasil uji fitokimia pada fraksi *n*-heksana hanya terdapat kandungan saponin dan steroid. Pada fraksi etil asetat mengandung saponin, steroid, dan flavonoid. Sedangkan pada fraksi metanol-air menunjukkan adanya saponin, fenol, alkaloid, dan flavonoid.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Muharni *et al.*, (2021), telah berhasil mengisolasi senyawa golongan terpenoid dan steroid dari daun sungkai yakni asam betulinat (**5**) dan stigmasterol (**6**). Kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antikolesterol dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 60,53 $\mu\text{g/mL}$ dan 222,32 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai antikolesterol standar senyawa simvastatin memiliki IC_{50} sebesar 24,68 $\mu\text{g/mL}$.



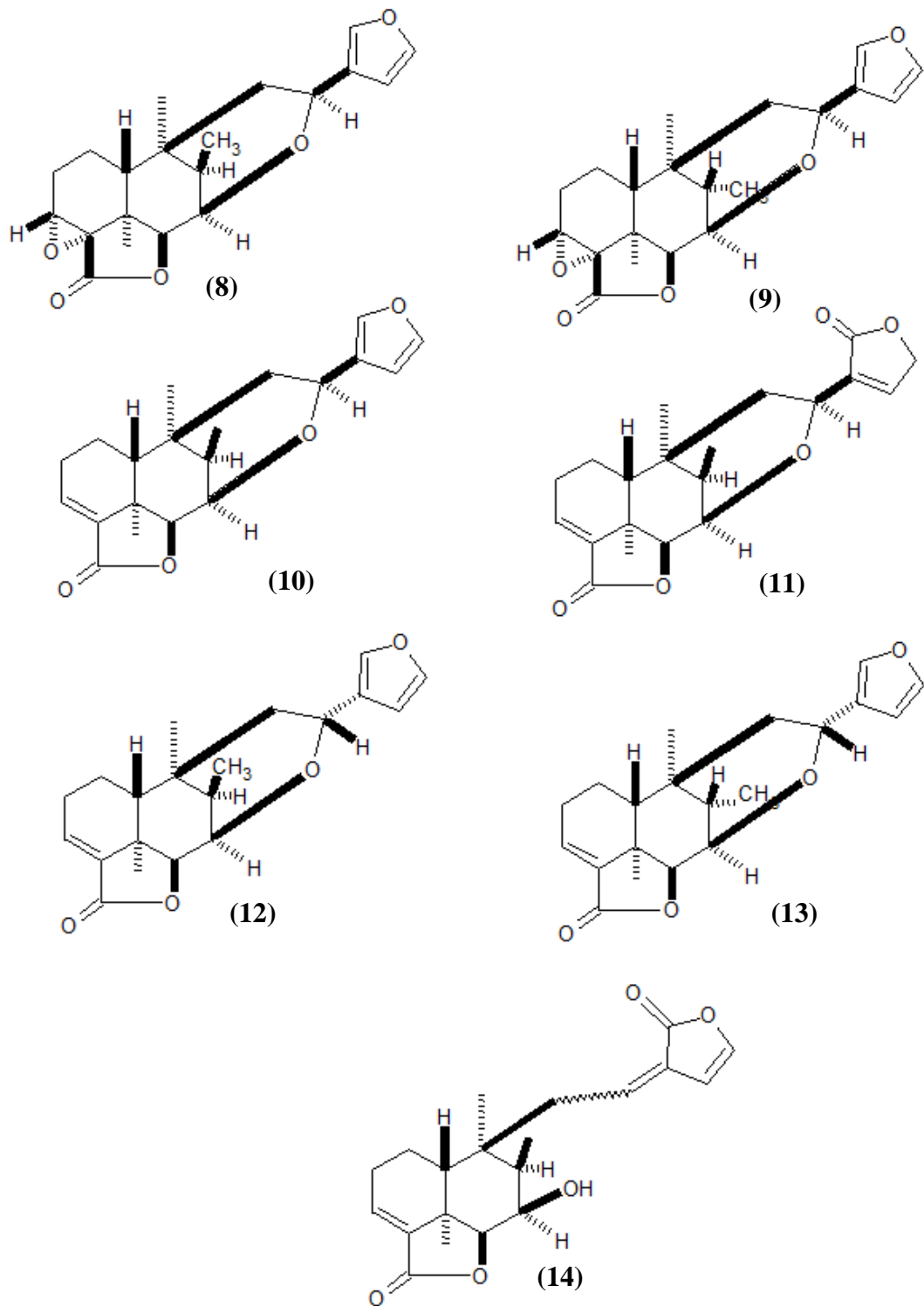
Gambar 3. Struktur senyawa asam betulinat (5) dan stigmasterol (6) dari daun sungkai

Baru-baru ini Ardhica (2022), telah berhasil mengisolasi senyawa apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) (Gambar 4), dengan rumus molekul $C_{15}H_{10}O_5$ yang merupakan golongan senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat daun sungkai.



Gambar 4. Struktur Apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) (7)

Senyawa diterpenoid tipe clerodane dari ekstrak etil asetat daun sungkai telah berhasil diisolasi oleh Kitagawa *et al.*, (1994) yang diberi nama peronemin B2 (8), A2 (9), B1 (10), C1 (11), B3 (12), A3 (13), D1 (14). Masing-masing struktur senyawanya dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur senyawa diterpen yang telah diisolasi dari ekstrak etil asetat daun sungkai (8-14)

2.6. Metabolit Sekunder

2.6.1. Isolasi

Isolasi adalah cara pemisahan komponen-komponen kimia yang terdapat dalam suatu bahan alam, baik dalam skala laboratorium maupun industri. Metode pemisahan bertujuan untuk mendapatkan zat murni atau beberapa zat murni dari suatu campuran, sering disebut sebagai pemurnian dan juga untuk mengetahui keberadaan suatu zat dalam suatu sampel yang dianalisis laboratorium. Isolasi senyawa bahan alam terdiri dari ekstraksi, fraksinasi, pemurnian dan identifikasi (Harborne, 1987).

2.6.2. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu metode pemisahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa aktif atau komponen tertentu dari komponen lain yang tidak diinginkan berdasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang diinginkan terdapat dalam simplisia (Fitria, 2021). Proses pengestraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi laju ekstraksi adalah tipe persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, suhu pelarut, dan tipe pelarut (Hambali dkk., 2014).

Metode ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan cara dingin dan panas. Ekstraksi dengan cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, sedangkan ekstraksi dengan cara panas yaitu refluks, sokletasi, digesti, infusa, dan dekokta. Selain

metode tersebut, terdapat juga metode ekstraksi modern diantaranya *Supercritical Fluid Extraction (SFE)*, *Pressurized Liquid Extraction (PLE)*, dan *Microwave Assisted Extraction (MAE)*. Metode ekstraksi yang dilakukan tergantung pada beberapa faktor antara lain tujuan ekstraksi, skala ekstraksi, sifat komponen yang akan diekstrak, dan sifat pelarut yang akan digunakan (Fitria, 2021).

2.6.3. Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal. Sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Atun, 2014).

Berdasarkan sifat instrumen yang digunakan, metode analisis kromatografi terdiri dari 2 macam yaitu konvensional dan modern. Kromatografi modern adalah teknik pemisahan komponen zat atau zat aktif dari suatu senyawa yang memiliki berat molekul tinggi dengan menggunakan instrumen canggih. Alat yang digunakan diantaranya adalah HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectro*). Kromatografi konvensional merupakan teknik pemisahan yang dilakukan dengan cara menggunakan instrumen yang sederhana, diantaranya kromatografi kertas, kromatografi kolom, dan kromatografi lapis tipis (Nurdiani, 2018).

a) Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum (KCV) merupakan salah satu metode fraksinasi yaitu dengan memisahkan *crude extract* menjadi fraksi-fraksinya yang lebih sederhana. Pemisahan tersebut memanfaatkan kolom yang berisi fase diam dan aliran fase

geraknya dibantu dengan pompa vakum. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel atau aluminium oksida (Ghisalberti, 2008). Kromatografi cair vakum (KCV) bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam ekstrak. Sampel tersebut bermigrasi terhadap fase diam dan fase gerak dengan cepat karena berada dalam suasana vakum. Prinsip kerja kromatografi cair vakum yaitu partisi dan adsorpsi komponen senyawa yang pemisahannya dibantu dengan tekanan dari alat vakum (Mutmainnah *et al.*, 2017).

b) Kromatografi Kolom (KK)

Pada dasarnya kromatografi kolom adalah pemisahan komponen-komponen dalam sampel dengan cara mengalirkan sampel melewati suatu kolom. Sampel dalam hal ini dibawa oleh *carrier* atau fase gerak (*mobile phase*). Sedangkan kolom berisi suatu bahan yang disebut fase diam (*stationary phase*) yang berfungsi memisahkan komponen-komponen sampel. Prinsip pemisahan kromatografi adsorpsi adalah kompetisi antara zat terlarut (sampel) dan fase gerak dengan permukaan fase diam. Kekuatan adsorpsi terutama tergantung sifat gugus fungsionalnya, dimana gugus-gugus fungsional ini menentukan tingkat kepolaran. Proses adsorpsi dipengaruhi oleh kekuatan ikatan antara *solution* dan adsorben dan kekuatan untuk memisahkan *solution* dari adsorben (Wati, 2014). Kromatografi kolom terbagi dalam kromatografi kolom terbuka (konvensional) dan kromatografi kolom tertutup.

Keuntungan pemisahan dengan metode kromatografi kolom sebagai berikut:

- 1) Dapat digunakan untuk sampel atau konstituen yang sangat kecil.
- 2) Cukup selektif terutama untuk senyawa-senyawa organik multi komponen.
- 3) Proses pemisahan dilakukan dalam waktu yang relatif singkat.
- 4) Seringkali murah dan sederhana karena umumnya tidak memerlukan alat yang mahal dan rumit (Nurdiani, 2018).

c) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis ini termasuk kromatografi planar (Nurdiani, 2018). Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu teknik pemisahan komponen-komponen campuran suatu senyawa yang melibatkan partisi suatu senyawa di antara padatan penyerap (adsorben, fase diam) yang dilapiskan pada plat kaca atau alumunium dengan suatu pelarut (fase gerak) yang mengalir melewati adsorben (padatan penyerap). Pengaliran pelarut dikenal sebagai proses pengembangan oleh pelarut (elusi). KLT mempunyai peranan penting dalam pemisahan senyawa organik maupun senyawa anorganik, karena relatif sederhana dan kecepatan analisisnya (Atun, 2014). KLT adalah analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. KLT dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofobik seperti lipida-lipida dan hidrokarbon yang sukar dikerjakan dengan kromatografi kertas (Nurdiani, 2018).

Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan *aliquot* kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun 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. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok. Pada umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT menggunakan fase diam yang diimpregnasi indikator fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm (Wulandari, 2011).

Sifat-sifat pelarut pengembang juga merupakan faktor dominan dalam penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Umumnya kemampuan suatu pelarut pengembang untuk menggerakkan senyawa pada suatu adsorben berhubungan dengan polaritas pelarut. Kemampuan ini disebut kekuatan elusi dan urutan kekuatan elusi beberapa pelarut yaitu air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksan > petroleum eter (Atun, 2014).

2.7. Karakterisasi Senyawa Murni

Pada penelitian ini, karakterisasi senyawa murni dilakukan secara spektrofotometer dengan tujuan untuk menentukan struktur dari senyawa hasil isolasi. Teknik spektrofotometer yang didasarkan pada radiasi elektromagnetik. Radiasi elektromagnetik adalah energi yang dipancarkan menembus ruang dalam bentuk gelombang-gelombang. Ada beberapa tipe radiasi elektromagnetik seperti gelombang radio, ultraviolet, inframerah, nampak, dan lain-lain (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Adapun metode spektrofotometer yang akan digunakan pada penelitian ini adalah spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-Vis), spektrofotometer *Infra Red* (IR), dan spektrofotometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR).

2.7.1. Spektrofotometer Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Spektrofotometer UV-Vis merupakan pengukuran panjang gelombang, intensitas sinar ultraviolet serta cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet dan cahaya tampak memiliki energi yang cukup untuk mempromosikan elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu teknik analisis spektrofotometer yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik), ultraviolet dekat (190-380 nm), dan sinar tampak (380-78 nm) (Yulianti, 2020).

Absorpsi cahaya ultraviolet atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Transisi ini memerlukan 40-300 kkal/mol. Energi yang terserap selanjutnya terbuang sebagai kalor, sebagai cahaya atau tersalurkan dalam reaksi. Panjang gelombang cahaya UV atau tampak bergantung pada mudahnya promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah tampak (senyawa berwarna) mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV yang lebih pendek (Fessenden dan Fessenden, 1982).

2.7.2. Spektrofotometer *Infra Red* (IR)

Radiasi inframerah mengacu pada spektrum elektromagnet yang berada pada daerah gelombang sinar tampak dan *microwave*. Batasan panjang gelombang yang umum digunakan untuk pendeteksian senyawa organik berkisar dari 4000 cm^{-1} sampai 400 cm^{-1} . Posisi pita serapan IR ditentukan dengan menggunakan satuan cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005).

Bila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan dalam amplitudo getaran atom-atom yang terikat itu. Jadi molekul ini berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi (energi yang terserap ini akan dibuang dalam bentuk panas bila molekul itu kembali ke keadaan dasar). Keadaan vibrasi dari ikatan terjadi pada keadaan tetap, atau terkuantitas, tingkat-tingkat energi. Panjang gelombang eksak absorpsi oleh suatu tipe ikatan tertentu, bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan (C-H, C-C, O-H, dan sebagainya) menyerap radiasi inframerah pada panjang gelombang karakteristik yang berlainan.

Suatu ikatan dalam sebuah molekul dapat menjalani berbagai macam osilasi; oleh karena itu, suatu ikatan tertentu dapat menyerap energi pada lebih daripada satu panjang gelombang. Banyaknya energi yang diabsorpsi oleh suatu ikatan tergantung pada perubahan dalam momen ikatan seperti vibrasi atom-atom yang saling berikatan lebih besar perubahan dalam momen ikatan mengakibatkan absorpsi sejumlah energi juga lebih besar. Ikatan non-polar tidak mengabsorpsi radiasi inframerah karena tidak ada perubahan momen ikatan apabila atom-atom saling berosilasi. Ikatan non-polar relatif menyebabkan absorpsi yang lemah. Pada ikatan polar menunjukkan absorpsi yang kuat (Fessenden dan Fessenden, 1982).

2.7.3. Spektrofotometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Spektrofotometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) adalah suatu teknik untuk menentukan struktur senyawa yang tidak diketahui. NMR dapat digunakan untuk menjelaskan dinamika dan mekanisme transformasi metabolit dan untuk mengeksplorasi kompartementalisasi jalur metabolisme (Markley *et al.*, 2017). Spektrofotometer NMR didasarkan pada penyerapan gelombang radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul ini berada dalam medan magnet yang kuat (Fessenden dan Fessenden, 1982). Tabel 1 menunjukkan letak pergeseran kimia beberapa senyawa organik dalam spektra ^1H -NMR (Sudjadi, 1985).

Tabel 1. Letak Pergeseran Kimia dalam Spektra ^1H -NMR

Senyawa Proton	^1H (δ) ppm
C-CH ₃ (alkana)	0,5-2
C \equiv C-H (alkuna)	2,5-3,5
H ₃ C-O- (eter)	3,5-3,8
H ₂ C=C (alkena)	4,5-7,5
Ar-OH (fenol)	4-8
R-OH (alkohol)	5-5,5
Ar-H (aromatik)	6-9
-CO-H (aldehid)	9,8-10,5
-CO-OH	11,5-12,5

Selain pergeseran kimia dalam spektra $^1\text{H-NMR}$ terdapat pergeseran kimia lainnya yaitu pada spektra $^{13}\text{C-NMR}$. Melalui spektra ini maka dapat diketahui jenis-jenis atom karbon yang terkandung dalam suatu senyawa. Letak pergeseran kimia dalam spektra $^{13}\text{C-NMR}$ untuk beberapa senyawa organik (Sudjadi, 1985) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Letak Pergeseran Kimia dalam Spektra $^{13}\text{C-NMR}$

Senyawa Karbon	^{13}C (δ) ppm
C=O (keton)	205-220
C=O (aldehid)	190-200
C=O	170-185
C aromatik	125-150
C=C (alkena)	115-140
RCH ₂ OH	50-65
RCH ₂ Cl	40-45
RCH ₂ NH ₂	37-45
R ₃ CH	25-35
CH ₃ CO-	20-30
R ₂ CH ₂	16-25
RCH ₃	10-15

2.8. Radikal Bebas

Menurut Halliwell *and* Gutteridge (1999), radikal bebas adalah suatu atom, gugus, molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit paling luar. Molekul tersebut diantaranya atom hidrogen, logam-logam transisi, dan molekul oksigen. Kehadiran satu atau lebih elektron tak berpasangan menyebabkan molekul ini mudah tertarik pada suatu medan magnetik dan menyebabkan molekul sangat reaktif. Radikal bebas dapat bermuatan positif (kation), bermuatan negatif (anion) atau tidak bermuatan.

Proses pelepasan elektron dari suatu senyawa disebut oksidasi sedangkan proses penangkapan elektron disebut reduksi. Senyawa yang dapat menarik atau menerima elektron disebut oksidan atau oksidator sedangkan senyawa yang dapat

melepaskan atau memberikan elektron disebut reduktan atau reduktor (Yuslianti, 2018). Reaksi radikal bebas adalah reaksi rantai yang terdiri dari inisiasi (pembentukan radikal bebas), propagasi (reaksi dalam mana terbentuk radikal bebas baru), dan pengakhiran (*termination*: berupa kopling atau disproporsional atau pembentukan radikal bebas yang stabil). Inisiator radikal bebas adalah zat yang menyebabkan pembentukan radikal bebas seperti, cahaya dan peroksida. Inhibitor radikal bebas adalah zat yang membentuk radikal bebas tak reaktif seperti fenol (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Keberadaan radikal bebas tidak selamanya merugikan tubuh manusia akan tetapi ada juga yang mempunyai efek yang menguntungkan, seperti membantu destruksi sel-sel mikroorganisme, kanker dan proses pematangan sel-sel di dalam tubuh. Leukosit memproduksi radikal bebas untuk memusnahkan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan cara merusak DNA, mengganggu produksi prostaglandin dan merangsang pembentukan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . Akan tetapi produksi radikal bebas yang berlebihan dan produksi antioksidan yang tidak memadai dapat menyebabkan kerusakan sel-sel jaringan dan enzim-enzim (Parwata, 2016).

2.9. Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, karsinogenesis, dan penyakit lainnya. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak (Parwata, 2016). Senyawa ini memiliki energi aktivasi yang rendah untuk mendonorkan atom hidrogen sehingga tidak dapat menginisiasi radikal bebas yang kedua kemudian menghasilkan elektron radikal bebas stabil dan memperlambat oksidasi (Noori, 2012). Aktivitas penghambatan antioksidan dalam reaksi oksidasi berdasarkan keseimbangan reaksi oksidasi reduksi (Fitria, 2021).

2.9.1. Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan sangat beragam jenisnya. Berdasarkan fungsinya terbagi menjadi antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer yaitu antioksidan yang berperan dalam menghentikan reaksi rantai radikal bebas dengan berfungsi sebagai pendonor atom H atau elektron pada radikal bebas dan berdampak pada pembentukan produk yang lebih stabil. Antioksidan sekunder, yaitu antioksidan yang kerjanya menghambat kerja peroksidan dengan mekanisme reaksi berupa penyerapan sinar UV, deaktivasi ion logam (dengan pembentukan senyawa kompleks). Antioksidan tersier, yaitu antioksidan yang berfungsi memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas (Kate, 2014).

Menurut Noori (2012), berdasarkan kelarutannya antioksidan dapat dibagi menjadi antioksidan hidrofilik dan antioksidan hidrofobik. Antioksidan hidrofilik (*water soluble*) adalah antioksidan yang bereaksi dengan ROS (*Reactive Oxygen Species*) pada sitoplasma sel dan plasma darah, contohnya asam askorbat, glutathion dan asam urat. Sedangkan antioksidan hidrofobik (*lipid soluble*) adalah antioksidan yang melindungi membran sel dari lipid peroksidase, contohnya karoten, α -tokoferol dan ubiquinon.

Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi antioksidan endogen, antioksidan alami, dan antioksidan sintesis. Antioksidan yang sudah diproduksi di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan antioksidan endogen atau enzim antioksidan, seperti enzim Superoksida Dismutase (SOD), Glutathion Peroksidase (GPx), dan Katalase (CAT). Antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman (kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari) seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E dan senyawa fenolik (flavonoid). Antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan seperti butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat dan *Tert*-butil hidroksi quinon (TBHQ) (Parwata, 2016). Penggunaan antioksidan sintetis bagi kesehatan manusia tidak disarankan lagi karena dapat memberikan efek samping yang berbahaya yaitu karsinogenesis.

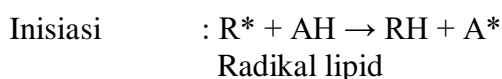
2.9.2. Mekanisme Kerja Antioksidan

Menurut Ingrid dan Santoso (2014), reaksi berantai pada radikal bebas (tanpa ada antioksidan) terdiri dari tiga tahap, yaitu :

1. Tahap inisiasi : $RH \rightarrow R^* + H^*$
2. Tahap propagasi : $R^* + O_2 \rightarrow ROO^*$
 $ROO^* + RH \rightarrow ROOH + R^*$
3. Tahap terminasi : $R^* + R^* \rightarrow R - R$
 $ROO^* + R^* \rightarrow ROOR$
 $ROO^* + ROO^* \rightarrow ROOR + O_2$

Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal bebas (R^*) yang sangat reaktif, karena (RH) melepaskan satu atom hidrogen, hal ini dapat disebabkan adanya cahaya, oksigen atau panas. Pada tahap propagasi, radikal (R^*) akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (ROO^*). Radikal peroksi selanjutnya akan menyerang RH (misalnya, pada asam lemak) menghasilkan hidroperoksida dan radikal baru. Hidrogen peroksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton. Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan berlanjut sampai tahap terminasi, sehingga antar radikal bebas dapat saling bereaksi membentuk senyawa yang kompleks. Dengan adanya antioksidan memberikan atom hidrogen atau elektron pada radikal bebas (R^* , ROO^*), mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil RH. Sementara turunan radikal antioksidan (A^*) memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal semula R^* .

Reaksi penghambatan antioksidan terhadap radikal lipid mengikuti persamaan reaksi sebagai berikut:



2.9.3. Metode Pengujian Antioksidan

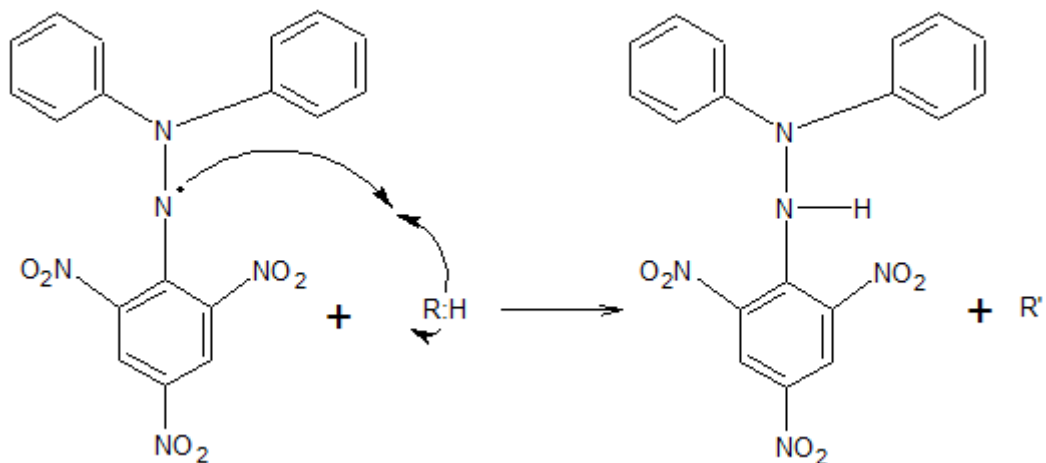
Beberapa metode pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* yang digunakan dewasa ini adalah beta karoten *bleaching*, 2,2-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH *Radical Scavenging*) *method*, *Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances* (TBARS) *assay*, ABTS (2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat) *method*, *Rancimat assay*, *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) *assay*, *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) dan *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP) *assay*, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) *method*, *Peroxyl Radical Scavenging Capacity* (PSC) dan *Total Oxyradical Scavenging Capacity* (TOCS) *method* dan *Folin Ciocalteau Total Phenolic Assay* dan lain-lain. Banyaknya metode uji aktivitas antioksidan tersebut dapat memberikan hasil uji yang beragam. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya pengaruh dari struktur kimiawi antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisiko-kimia sediaan sampel yang berbeda (Parwata, 2016).

a) Metode DPPH (2,2-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)

Senyawa DPPH adalah radikal nitrogen organik yang stabil berwarna ungu tua dan bersifat stabil di suhu ruangan. DPPH bereaksi dengan atom hidrogen yang berasal dari suatu senyawa antioksidan membentuk molekul yang stabil (Fitria, 2021). Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas antioksidan secara cepat, sederhana, dan tidak membutuhkan biaya yang mahal (Prasetyo *et al.*, 2021).

Metode DPPH memiliki mekanisme yaitu penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan menyebabkan elektron pada radikal DPPH menjadi berpasangan sehingga terjadi penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil. Adanya senyawa antioksidan menyebabkan perubahan warna larutan DPPH dari warna ungu gelap menjadi warna kuning. Makin kuat senyawa antioksidan untuk menangkal radikal DPPH, makin pudar warna yang

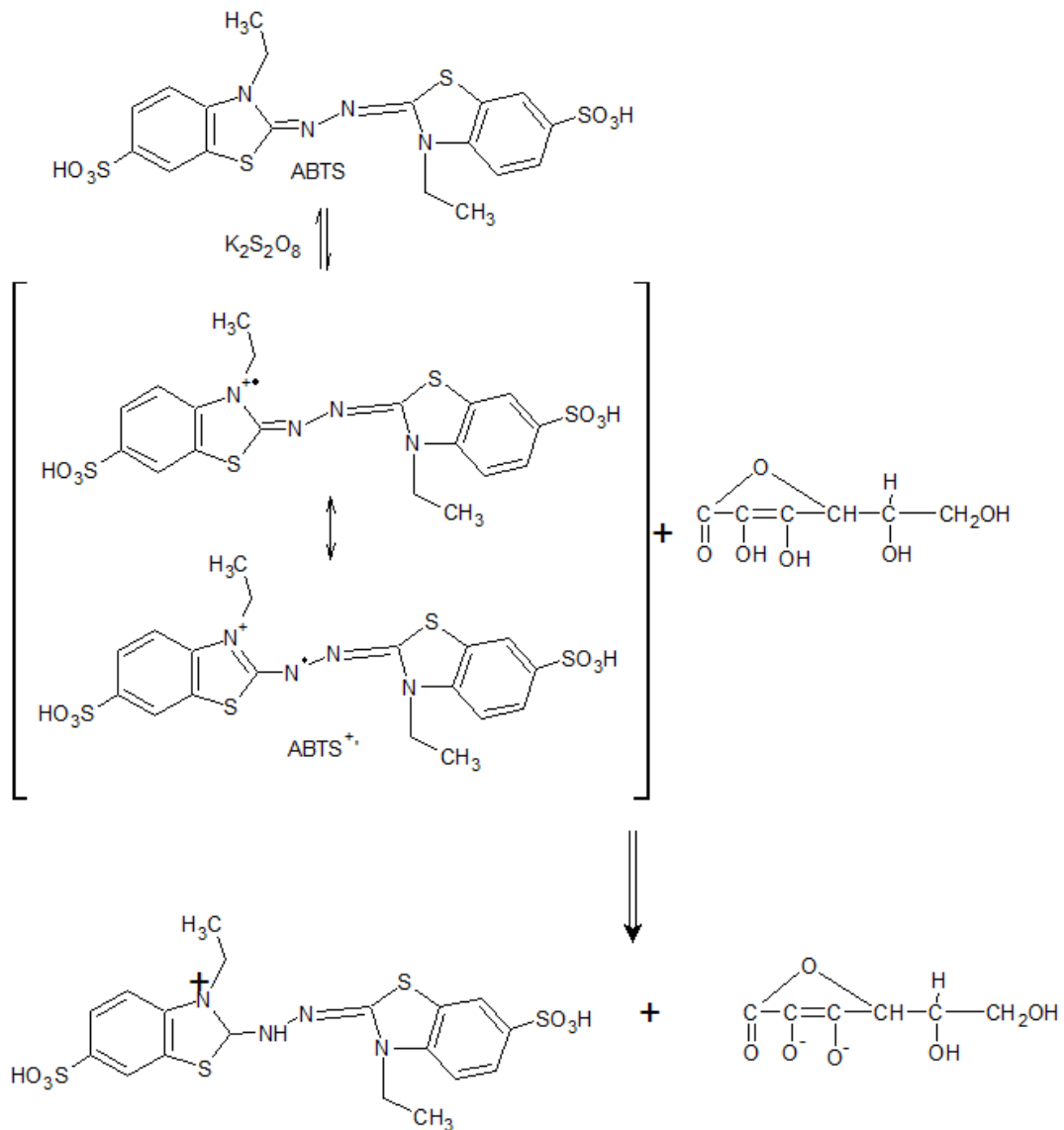
teramati (Fitria, 2021). Reaksi reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan

b) Metode ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat)

Senyawa ABTS merupakan radikal dengan pusat nitrogen memiliki karakteristik warna biru-hijau, ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk non-radikal yang tidak berwarna. Prinsip uji ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS dengan mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal ABTS. Metode ABTS baik digunakan pada sistem larutan berbasis air maupun organik, mempunyai serapan spesifik pada panjang gelombang dari bagian *visible*, dan membutuhkan waktu reaksi yang lebih sedikit (Mastuti, 2015). Reaksi peredaman radikal bebas ABTS oleh vitamin C menurut Puspitasari *et al.* (2020), dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Reaksi peredaman radikal bebas oleh vitamin C

ABTS dioksidasi oleh kalium persulfat sehingga menghasilkan kation radikal ABTS^{•+}. Kation radikal ABTS distabilkan dengan vitamin C dengan mendonorkan elektron pada radikal bebas sehingga kation radikal ABTS stabil, sedangkan vitamin C teroksidasi menjadi *semi dehydroascorbic acid* yang relatif stabil (Puspitasari *et al.*, 2020).

Aktivitas penangkapan radikal bebas dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi larutan atau sampel yang mampu mereduksi radikal sebesar 50% atau merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat suatu proses oksidasi 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas penangkapan radikal, sebaliknya nilai IC_{50} yang tinggi maka aktivitas penangkapan radikal bebas semakin kecil (Vifta *et al.*, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2022 – Maret 2023, bertempat di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, Bogor. Analisis spektrofotometer *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) dilakukan di Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong, Banten. Pengujian antioksidan dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat-alat yang digunakan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, penguap putar vakum (*rotary evaporator*), satu set alat kromatografi cair vakum, satu set alat kromatografi kolom (KK), lampu UV, satu set alat kromatografi lapis tipis (KLT), pipet kapiler, neraca analitik, oven, spektrofotometer NMR, dan spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2. Bahan-bahan yang digunakan

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah serbuk daun sungkai yang diambil di Kecamatan Seputih Raman Kabupaten Lampung Tengah. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi berkualitas teknis yang telah didestilasi.

Bahan-bahan kimia yang digunakan antara lain metanol (MeOH), *n*-heksana (*n*-C₆H₁₄), etil asetat (EtOAc), aseton (C₃H₆O), akuades (H₂O), etanol (C₂H₅OH), silika gel Merk G 60 untuk impregnasi, silika gel 60 GF₂₅₄ (35-70 Mesh), plat KLT, DPPH (2,2-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) dan asam askorbat.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan Sampel

Tanaman sungkai telah dideterminasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor. Daun sungkai sebanyak 1000 gram dibersihkan dengan air mengalir kemudian dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung selama satu minggu hingga dapat dilakukan proses penggilingan. Daun sungkai yang sudah kering digiling hingga halus, serbuk halus ini yang kemudian digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini.

3.3.2. Ekstraksi dengan berbagai pelarut

Serbuk halus daun sungkai ditimbang sebanyak 1000 gram kemudian direndam dengan menggunakan pelarut metanol. Sampel dimaserasi selama 1x24 jam sebanyak 3 kali pengulangan untuk tiap pelarut. Selanjutnya maserat disaring menggunakan kertas saring, dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh ditimbang untuk diketahui beratnya. Selanjutnya, ekstrak pekat metanol dipartisi cair-cair dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi metanol. Kemudian fraksi *n*-heksana di evaporasi menghasilkan ekstrak *n*-heksana. Fraksi metanol ditambahkan dengan air dan di partisi menggunakan pelarut etil asetat sehingga diperoleh fraksi metanol-air dan fraksi etil asetat. Fraksi-fraksi hasil partisi selanjutnya dievaporasi untuk menghasilkan ekstrak pekatnya.

3.3.3. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Ekstrak kasar etil asetat sebanyak 25 gram kemudian di fraksinasi dengan kromatografi cair vakum. Tahap pertama sampel dilarutkan dengan aseton. Sampel yang telah larut diimpregnasi pada silika gel 60 GF₂₅₄ (silika kasar). Massa dari silika yang digunakan sebesar 2 kali berat sampel yaitu sebanyak 50 gram. Persiapan kolom KCV dilakukan dengan cara menambahkan adsorben berupa silika gel 60 (silika halus) ke dalam kolom KCV sebanyak 10 kali berat sampel yaitu 250 gram kemudian dipadatkan, ditekan, dan di pompa vakum (Astuti, 2021).

Sampel daun sungkai yang telah diimpregnasi dimasukkan ke dalam kolom KCV lalu ditekan menggunakan gelas penekan dalam keadaan di vakum agar tidak terdapat rongga dalam sampel. Setelah sampel selesai dikemas, pada bagian atasnya ditambahkan kertas saring untuk menjaga permukaan sampel tetap stabil pada saat penambahan eluen. Eluen yang digunakan adalah *n*-heksana 100%, dilanjutkan dengan campuran *n*-heksana:etil asetat dengan gradien (0-100% etil asetat). Pada proses KCV ini dihasilkan 13 fraksi (Astuti, 2021) Hasil elusi dari masing-masing pelarut ditampung dan dilakukan monitoring menggunakan metode KLT. Fraksi-fraksi yang memiliki nilai *R_f* yang sama maka digabung dalam satu wadah.

3.3.4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada penelitian ini, KLT dilakukan dengan fraksi-fraksi yang akan difraksinasi dan juga fraksi-fraksi yang didapat setelah perlakuan fraksinasi. KLT dilakukan dengan menggunakan campuran eluen menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol. Hasil kromatogram kemudian disemprot menggunakan larutan serum sulfat untuk menampakkan noda dari komponen senyawa tersebut. Ketika diperoleh pemisahan terbaik yang lebih sedikit bercak dilihat dibawah lampu UV setelah dilakukan elusi terhadap plat KLT. Setiap fraksi yang menghasilkan pola pemisahan dengan *R_f* (*Retention factor*) yang

sama pada kromatogram, digabung dan dipekatkan sehingga diperoleh beberapa fraksi gabungan yang akan difraksinasi lebih lanjut (Hidayati, 2020).

3.3.5. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pada penelitian ini, uji antioksidan menggunakan metode DPPH yang sudah dilakukan penelitian sebelumnya dan telah dimodifikasi (Okfrianti *et al.*, 2022).

a) Pembuatan Larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 0,0078 gr dilarutkan dengan metanol *p.a* dalam labu ukur 50 mL, dilapisi dengan alumunium foil dan dicampurkan hingga homogen.

b) Pembuatan Larutan Blanko

Dipipet sebanyak 1 mL larutan DPPH 1 mM, ditambahkan metanol *p.a* sampai tanda batas 10 mL, dilapisi alumunium foil, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm.

c) Pembuatan larutan asam askorbat

Larutan Asam Askorbat 1000 ppm dibuat dari 50 mg asam askorbat dilarutkan dengan metanol *p.a*, pada labu ukur 50 mL. Kemudian, larutan induk asam askorbat dibuat konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm pada labu ukur 5 mL, ditambah 1 mL larutan DPPH, ditambah metanol *p.a* sampai tanda batas. Selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi, lalu diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

d) Pembuatan larutan uji fraksi etil asetat hasil KCV dari daun sungkai

Dibuat larutan induk 1000 ppm dengan melarutkan 10 mg masing-masing fraksi etil asetat daun sungkai dalam metanol *p.a* pada labu ukur 10 mL. Dibuat variasi konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm, dari larutan induk ditambahkan 4 mL metanol *p.a* dan 1 mL larutan DPPH 1 mM, dicukupkan

dengan metanol *p.a* pada labu ukur 5 mL. Selanjutnya dihomogenkan dan diinkubasi, lalu diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

e) Analisis Data Antioksidan

Analisis data antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan dengan menggunakan perhitungan sebagai berikut:

$$\%inhibisi = \left\{ \frac{A_{awal} - A_{setelah\ reaksi}}{A_{awal}} \right\} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ didapat dengan membuat persamaan garis yang menghubungkan antara % inhibisi terhadap konsentrasi larutan uji masing-masing sampel (10, 20, 30, 40, dan 50 ppm) dan pembanding asam askorbat (10, 20, 30, 40, dan 50 ppm). IC₅₀ diperoleh dengan menghitung konsentrasi larutan uji yang bisa menghasilkan hambatan radikal bebas (% inhibisi) sebesar 50% berdasarkan persamaan garis regresi linier menggunakan rumus:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

Y= hambatan radikal bebas

X= konsentrasi larutan uji

Data yang diperoleh dari alat spektrofotometer UV-Vis berupa absorbansi kontrol dan reagen dari masing-masing uji setelah direaksikan dengan larutan uji sampel dan pembanding pada berbagai konsentrasi, digunakan untuk menghitung % inhibisi.

3.3.6. Kromatografi Kolom (KK)

Setelah dihasilkan fraksi-fraksi dengan jumlah yang lebih sedikit dan memiliki pola pemisahan terbaik, tahapan fraksinasi selanjutnya dilakukan menggunakan

teknik kromatografi kolom. Adsorben silika gel Merck (35-70 Mesh) dilarutkan dalam pelarut yang akan digunakan dalam proses pengelusian. *Slurry* dari silika gel dimasukkan terlebih dahulu ke dalam kolom, fase diam diatur hingga rapat (tidak berongga) dan rata. Selanjutnya sampel yang telah diimpregnasi dimasukkan pada silika gel ke dalam kolom yang telah berisi fase diam. Pada saat sampel dimasukkan, kolom diusahakan tidak kering/kehabisan pelarut karena akan mengganggu fase diam yang telah dikemas rapat, sehingga proses elusi tidak akan terganggu (Gritter *et al.*, 1991). Eluat yang telah didapatkan dimasukkan ke dalam botol vial yang sesuai. Fraksi yang mengandung zat yang sama berdasarkan hasil uji KLT dapat disatukan menjadi fraksi baru.

3.3.7. Analisis Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan metode KLT menggunakan beberapa campuran eluen. Kemurnian senyawa ditunjukkan dengan timbulnya satu noda dengan berbagai campuran eluen yang digunakan, kemudian disemprot menggunakan larutan serium sulfat untuk menampakkan bercak/noda dari komponen senyawa tersebut. Isolat murni dapat disebut murni secara uji KLT jika isolat tetap menunjukkan noda tunggal, hal tersebut dikarenakan isolat atau senyawa murni yang didapat mengandung satu jenis senyawa.

3.3.8. Spektrofotometer Resonansi Magnetik Nuklir (NMR)

Sampel berupa kristal murni yang akan diidentifikasi dilarutkan ke dalam pelarut aseton, kemudian ditambahkan sedikit senyawa acuan. Larutan ditempatkan dalam tabung gelas tipis dengan tebal 5 mm di tengah-tengah kumparan frekuensi radio (rf) diantara dua kutub magnet yang sangat kuat kemudian energi dari kumparan rf ditambah secara terus menerus. Energi pada frekuensi terpasang dari kumparan rf yang diserap cuplikan direkam dan memberikan spektrum NMR.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pengujian aktivitas antioksidan dari 5 fraksi etil asetat yakni FEA, FEB, FEC, FED, dan FEE hasil KCV menggunakan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 2,055 ppm, 0,848 ppm, 3,277 ppm, 4,635 ppm dan 0,689 ppm,.
2. Diperoleh senyawa NV31 sebanyak 3 mg dengan sifat fisik kristal jarum berwarna putih yang memiliki kesamaan dengan senyawa β -sitosterol dari golongan steroid.
3. Diperoleh senyawa NV32 sebanyak 3,6 mg dengan sifat fisik kristal jarum berwarna kuning yang merupakan campuran senyawa dari golongan steroid dan triterpenoid.
4. Senyawa NV31 telah dilakukan penelitian oleh Baskar *et al.* (2010) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 389,5 μ M.
5. Salah satu senyawa NV32 memiliki kemiripan dengan senyawa Peronemin B1.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang berkaitan dengan penelitian ini, sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap senyawa NV32 dan bioaktivitas lain seperti antiinflamasi dan antitumor.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R., Naczek, M., and Shahidi, F. 2000. Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls. *JAOCS*. 77(9) : 957–61.
- Andarina, R., dan Djauhari T. 2017. Antioksidan Dalam Dermatologi. *JKK*. 4(1) : 39–48.
- Anwar, R., Aisyah, L.S., Lestari, F.P., Ilfani, D., Yun, Y.F., and Prasetya, P.D. 2021. Senyawa Steroid dari Cocor Bebek (*Kalanchoe tomentosa*) sebagai Antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *JPK*. 17(2) : 202-210.
- Ardhica, J. 2022. *Isolasi Senyawa Kimia Dari Ekstrak Etanol Daun Sungkai (Peronema canescens. Jack) dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Staphylococcus epidermidis dan Escherichia coli*. Skripsi. Universitas Jambi.
- Astuti, N.M.F. 2021. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Non Polar Daun Tumbuhan Sungkai (Peronema canescens Jack) Serta Uji Toksisitas Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Skripsi. Universitas Lampung.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *JKCBB*. 8(2) : 53–61.
- Baskar, A.A., Ignacimuthu, S., Paulraj, G.M., and Numair, K.S. 2010. Chemopreventive Potential of β -Sitosterol in Experimental Colon Cancer Model - an In Vitro and In Vivo study. *Research Article*. 10 : 24.
- Darwati, Nurlelasari, dan Mayanti, T. 2019. Isolasi Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Asam Kandis (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC) Sebagai Penurun Demam. *JPHH*. 37(1) : 51-58.
- Darwati, A.A. and Adisumiwi, S. 2015. Santon dari Kulit Batang Tumbuhan Asam Kandis (*Garcinia cowa*). *Chempublish*. 1(1) : 25-31.
- Fadlila, R.N. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat dari Kulit Batang Nangka (Artocarpus heterophylla Lamk.)*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Alaudin.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S. 1982. *Kimia Organik*. Erlangga. Jakarta.
- Fitria, A. 2021. *Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Ekstrak Non Polar, Semi Polar, dan Polar dari Daun Sungkai*. Skripsi. Universitas Perintis Indonesia.
- 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. *JPLB*. 4(1) : 460–70.
- 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. Hal. 23-27.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi. Alih Bahasa Kosasih Padmawinata*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Haerani, A., Chaerunisa, A., Yohana, dan Subarnas, A. 2018. Artikel Tinjauan: Antioksidan Untuk Kulit. *Farmaka, Universitas Padjajaran, Bandung*. 16(2) : 135-151.
- Halimu, R.B., S.Sulistijowati, R., and Mile, L. 2017. Identifikasi Kandungan Tanin pada *Sonneratia alba*. *JIPK*. 5(4) : 93–97.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. Oxford.
- Hambali, M., Mayasari, F., dan Noermansyah, F. 2014. Ekstraksi Antosianin dari Ubi Jalar dengan Variasi Konsentrasi Solven dan Lama Waktu Ekstraksi. *JTK*. 20(2) : 25–35.
- Harborne, J.B. 1987. *Phytochemical Methods, Alih Bahasa Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro*. Penerbit ITB. Bandung.
- Hardiningtyas, S.D., Purwaningsih, S., dan Handharyani, E. 2014. Aktivitas Antioksidan dan Efek Hepatoprotektif Daun Bakau Api-Api Putih. *JPHPI*. 17(1) : 80-91.
- Heywood, V.H., Brummit, R.K., Culham, A., and Seberg, O. 2007. *Flowering Plant Families of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- 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.
- Inggrid, H.M. dan Santoso, H. 2014. *Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (Actinidia deliciosa)*. LP2M Universitas Katolik Parahayangan. Bandung.
- Julianto, T.S. 2019. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.
- Kate, D.I. 2014. *Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH Ekstrak Metanolik Umbi Bidara Upas*. Skripsi. Universitas Sanata Dharma.
- Khasanah, U. 2021. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Sungkai (Peronema canescens Jack) Serta Studi Potensi Antivirus*

Coronavirus Disease 2019 (Covid-19) Secara In Silico. Skripsi. Universitas Lampung.

- 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 from *Peronema canescens* (Verbenaceae). *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 5(44) : 1050–1055.
- Kusriani, R.H., Nawawi, A., dan Turahman, T. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Kulit Batang dan Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923 dan *Escherichia Coli* ATCC 25922. *JFG*. 2(1) : 8–14.
- Latief, M., Fisesa, A.T., Sari, P.M., and Tarigan, I.L. 2021. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Pada Mencit Terinduksi Karagenan. *JFSP*. 7(2) : 144–53.
- Latief, M., Sari, P.M., Fatwa, L.T., Tarigan, I.L., and Rupasinghe, H.P.V. 2021. Antidiabetic Activity of Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Leaves Ethanol Extract on the Male Mice Induced Alloxan Monohydrate. *PCPR*. 6(2) : 64–74.
- Markley, J.L., Bruschiweiler, R., Edison, A.S., Eghbalnia, H.R., Powers, R., Raftery, D., and Wishart, D.S. 2017. The Future of NMR-Based Metabolomics. *COBIOT*. 43 : 34–40.
- Mastuti, R. 2015. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Celosia. *JIBB*. 2(3) : 143-148.
- Muharni, M., Ferlinahayati, F., Yohandini, H., Riyanti, F., and Pakpahan, N.A. 2021. The Anticholesterol Activity of Betulinic Acid and Stigmasterol Isolated from the Leaves of Sungkai (*Peronema canescens* Jack). *Int J App Pharm*. 13(2) : 198–203.
- Mutmainnah, P.A., Hakim, A., and Savalas, L.R.T. 2017. Identifikasi Senyawa Turunan Hasil Fraksinasi Kayu Akar *Artocarpus Odoratissimus*. *JPPIPA*. 3(2) : 26–32.
- Molyneux, Philips. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *SJST*. 26(2) : 211-219.
- Ningsih, A., dan Ibrahim, A. 2013. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Fraksi *n*-heksan Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap Beberapa Bakteri dengan Metode KLT-Bioautografi. *J. Trop. Pharm*. 2(2) : 76-82.
- Noori, S. 2012. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Scientific Reports*. 1(8) : 1–9.
- Noviany, N., Samadi, A., Yuliyani, N., Hadi, S., Aziz, M., Purwitasari, N.,

- Mohamad, S., Ismail, N.N., Gable, p.k., and Mahmud, T. 2020. Structure Characterization and Biological Activity of 2-Arylbenzofurans from an Indonesian Plant, *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. *Phytochemistry Letters*. 35 : 11–15.
- Nurdiani, D. 2018. *Buku Informasi Melaksanakan Analisa Secara Kromatografi Konvensional Mengikuti Prosedur*. Kemendikbud.
- Okfrianti, Y., Irnamera, D., and Bertalina. 2022. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Antioxidant Activity of Sungkai Leaf (*Peronema canescens* Jack) Ethanol Extract. *JK*. 13(2) : 333–339.
- Parwata, M.O.A. 2016. *Antioksidan*. Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana. Bukit Jimbaran.
- Pindan, N.P., Saleh, C., dan Magdaleni, A.R. 2021. Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fraksi *n*-heksana, Etil Asetat, dan Etanol sisa Dari Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) dengan Metode DPPH. *J. Atom*. 6(1) : 22-27.
- Plantamor. 2022. Plantamor Situs Dunia Tumbuhan. <http://plantamor.com/species/info/peronema/canescens>. diakses pada 20 februari 2022.
- Prasetyo, E., Kharomah, N.Z.W., and Rahayu, T.P. 2021. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Terhadap Ekstrak Etanol Kulit Buah Durian (*Durizo zibethinnus* L.) dari Desa Alasmalang Kabupaten Banyumas. *JP*. 8(1) : 75.
- Puspitasari, A.D., Susanti, E., and Khustiana, A. 2020. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Vitamin C Perasan Daging Buah Lemon (*Citrus limon* (L.) Osbeck) Menggunakan Metode ABTS. *JITek*. 5(2) : 99-104.
- Ramadenti, F., Sundaryono, A., and Handayani, D. 2017. Uji Fraksi Etil Asetat Daun *Peronema canescens* Terhadap *Plasmodium Berghei* Pada *Mus Musculus*. *Alotrop, JPIK*. 2(1) : 89–92.
- Roy, T.R., Sultana, R.S., and Rahman, A.H.M. 2016. Taxonomic Study and Medicinal Uses of Verbenaceae Family of Rajshahi District, Bangladesh. *JPRB*. 3(1) : 160–72.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Metabolit Sekunder, Teori, Konsep, dan Teknik Pemisahan*. Deepublish. Yogyakarta.
- Sehwag, S., and Das, M. 2013. Antioxidant Activity: An overview. *JFST*. 2(3) : 1-10.
- Silalahi, M. 2013. Peningkatan Kandungan Metabolit Sekunder Tumbuhan Melalui Penambahan Prekursor Pada Media Kultur *In Vitro*. *JDP*. 6(1) : 17–23.

- Silverstein, R.M., Webster, F.X., and Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compound, 7th edition*. State University of New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Simanjuntak, E., dan Zulham. 2020. Superoksida Dismutase (SOD) dan Radikal Bebas. *JKF*. 2(2) : 124–29.
- Simanjuntak, K. 2012. Peran Antioksidan Flavonoid dalam Meningkatkan Kesehatan. *Bina Widya*. 23(3) : 135–40.
- Sudjadi. 1985. *Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Vifta, R.L., Rahayu, R.T, and Luhurningtyas, F.P. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa*) dan Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale*) dengan Metode ABTS (2,2-Azinobis (3-Etilbenzotiazolin)-6-Asam Sulfonat). *IJCST*. 8(3) : 197–201.
- Wati, N.F.N. 2014. Peningkatan Kualitas Minyak Nilam Melalui Proses Adsorpsi Menggunakan Adsorben γ -alumina dengan Sistem Flow. *IJCR*. 2(1) : 84–95.
- Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *JBMI*. 3(2) : 59–68.
- Widiastuti, S. 2017. *Potensi Fe^{2+} , Co^{2+} dan Ca^{2+} Terhadap Peningkatan Aktivitas Klorofil Sebagai Antioksidan Pada Alga Hijau*. Skripsi. Universitas Hasanudin.
- Wilarso, S. 2000. *Silvikultur Jenis Sungkai (Peronema canescens Jack)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. PT. Taman Kampus Presindo. Jember.
- Yani, A.P, Ruyani, A., Yenita, Ansyori, I., dan Irwanto, R. 2013. The Potential Test of Sungkai Young Leaves (*Peronema canescens*) to Maintain Goodhelth (Immunity) in Mice (*Mus Musculus*). *PROS Semin Biol*. 11(1) : 245–50.
- Yuhernita dan Juniarti. 2011. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara J. Sci*. 15(1) : 48-52.
- Yulianti, K. 2020. *Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Kloroform Daun Akar Bulu (Merremia Vitifolia)*. Skripsi. Universitas Cokroaminoto Palopo.
- Yuslianti, E.R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Deepublisher (Grup Penerbitan CV Budi Utama). Yogyakarta.
- Zulaikhah, S. T. 2017. The Role of Antioxidants to Prevent Free Radicals in The Body. *Sains Medika*. 8(1) : 39.