

**ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN  
BINAHONG (*Anredera cordifolia*) DENGAN METODE *Brine Shrimp salina*  
*Leach* MENGGUNAKAN EKSTRAKSI ULTRASONIK**

SKRIPSI

Oleh:  
**SERVITA RAMADHIANTI**  
NIM. 16630027



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2020**

**ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN  
BINAHONG (*Anredera cordifolia*) DENGAN METODE *Brine Shrimp salina*  
Leach MENGGUNAKAN EKSTRAKSI ULTRASONIK**

SKRIPSI

Oleh:  
**SERVITA RAMADHIANTI**  
NIM. 16630027

Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2020**


**ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN  
BINAHONG (*Anredera cordifolia*) DENGAN METODE *Brine Shrimp salina*  
*Leach* MENGGUNAKAN EKSTRAKSI ULTRASONIK**

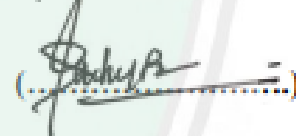
**SKRIPSI**

Oleh:  
**SERVITA RAMADHIANTI**  
NIM. 16630027


Telah disetujui oleh:

1. Pembimbing I : Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002
2. Pembimbing II : Ahmad Abtokhi, M.Pd  
NIP. 19710311 200312 1 002

  
.....)

  
.....)

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan**

  
Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

**ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN  
BINAHONG (*Anredera cordifolia*) DENGAN METODE *Brine Shrimp salina*  
Leach MENGGUNAKAN EKSTRAKSI ULTRASONIK**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**SERVITA RAMADHIANTI**  
NIM. 16630027

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 29 Desember 2020

Penguji Utama : A. Ghanaim Fasya, M.Si  
NIP. 19820616 200604 1 002

(.....  


Ketua Penguji : Diana Candra Dewi, M.Si  
NIP. 19770720 200312 2 001

(.....  


Sekretaris Penguji : Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

(.....  


Anggota Penguji : Ahmad Abtokhi, M.Pd  
NIP. 19761003 200312 1 004

(.....  


**Mengesahkan,  
Ketua Jurusan**

  
Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Servita Ramadhianti  
NIM : 16630027  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dengan Metode *Brine Shrimp salina Leach* menggunakan Ekstraksi Ultrasonik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 29 Desember 2020  
Yang membuat pernyataan,



Servita Ramadhianti  
NIM. 16630027

## KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan karunia-Nya dan Hidayah-Nya kepada penulis. Sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan hasil penelitian yang berjudul “Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dengan Metode *Brine Shrimp salina Leach* menggunakan Ekstraksi Ultrasonik,”. Shalawat dan salam selalu tercurah melimpah kepada Nabi Muhammad SAW, keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya. Sosok teladan dalam membangun peradaban dan penyempurna akhlaq.

Laporan hasil penelitian ini dibuat untuk memenuhi salah satu kriteria utama kelulusan strata 1 di jurusan kimia. Laporan hasil penelitian ini dapat disusun karena dukungan, motivasi serta bimbingan dari banyak pihak. Tiada kata yang patut terucap untuk menguntai sedikit makna kebahagiaan ini.

Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Keluarga terutama orang tua, Ibu Anis Sugiarti dan Pak Hamzah Fanzuri serta Pak Teguh Winaya yang selalu memberikan do'a, semangat, dan motivasi yang tak pernah henti.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku pembimbing utama dan Bapak Ahmad Abthoki, M.Si selaku pembimbing agama. Ibu Elok dan Pak Abthoki telah memberi bimbingan, pengarahan dengan kesabaran yang super sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Ibu Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Seluruh Anggota Unit Aktivitas Pers Mahasiswa (UAPM Inovasi) angkatan 2014-2019 yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat dan kritis kepada penulis. Terima kasih yang mendalam atas ilmu kepenulisannya.
6. Anggota Mamak *Squad* (Ismi Kholidah, Nanda Wulandari, Fitri Fatimah, Fendy Zamzam, Rizky Febrianto dan Usman Ali Rouf) yang selalu memberi motivasi dan semangat ceria kepada penulis. Tanpa kalian, penulis bagai butiran debu tanpa candaan.
7. Seluruh anggota grup, “Farmasi Jadi-jadian,” yang selalu menjadi penasehat dan tempat curhat dikala mengerjakan penelitian.
8. Muhammad Rizky Wiranto, suami saya yang selalu mendampingi dan memberi masukan sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa skripsi penelitian ini masih perlu diperbaiki dalam segala aspek. Penulis menerima saran dan kritik yang bersifat membangun dari siapa saja demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga proposal ini dapat menjadi sarana pembuka tabir ilmu pengetahuan baru, bermanfaat bagi kita semua dan untuk peradaban yang akan datang, Aamiin.

Balikpapan, 29 Desember 2020

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiii</b>
<b>المستخلص .....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan .....	5
1.4 Batasan Masalah .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 Tanaman Binahong dalam Perspektif Islam .....	7
2.2 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Binahong .....	8
2.3 Senyawa Aktif Tanaman Binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> ) .....	10
2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif menggunakan Metode Ultrasonik .....	11
2.5 Senyawa Flavonoid .....	13
2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	14
2.7 Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT .....	16
2.7.1 Klasifikasi Larva Udang <i>Artemia salina Leach</i> .....	16
2.8 Identifikasi Flavonoid menggunakan UV-Vis dan FTIR .....	17
2.8.1 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	17
2.8.2 Identifikasi menggunakan FTIR .....	18
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	20
3.2 Alat dan Bahan .....	20
3.2.1 Alat .....	20
3.2.2 Bahan .....	20
3.3 Rancangan Penelitian .....	21
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	21
3.4.1 Preparasi Sampel .....	21
3.4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Daun Binahong dengan Ultrasonik .....	21
3.4.3 Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid .....	22



3.4.4 Pemisahan Flavonoid dengan KLT Analitik dan KLT Preparatif .....	22
3.4.4.1 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Analitik .....	22
3.4.4.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif (KLTP) .....	23
3.4.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode BSLT .....	24
3.4.5.1 Penetasan Larva Udang .....	24
3.4.5.2 Uji Toksisitas .....	24
3.4.6 Identifikasi Senyawa Flavonoid menggunakan UV-Vis .....	25
3.4.7 Identifikasi Senyawa Flavonoid menggunakan FTIR .....	25
3.4.8 Analisa Data .....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
4.1 Preparasi Sampel .....	27
4.2 Analisis Kadar Air .....	28
4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Daun Binahong dengan Ultrasonik .....	28
4.4 Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid .....	31
4.5 Pemisahan Flavonoid dengan KLT Analitik dan KLT Preparatif .....	32
4.5.1 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Analitik .....	32
4.5.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif (KLTP) .....	37
4.6. Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dengan Metode BSLT .....	40
4.6.1 Penetasan Larva Udang .....	40
4.6.2 Uji Toksisitas .....	40
4.7 Identifikasi Isolat 4 menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	43
4.8 Identifikasi Isolat 4 menggunakan FTIR .....	45
4.9 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam .....	48
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>27</b>
5.1 Kesimpulan .....	27
5.2 Saran .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>61</b>

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Daun Tanaman Binahong ( <i>Anredera Cordifolia</i> ).....	9
<b>Gambar 2.2</b> Kerangka Dasar Flavonoid. ....	14
<b>Gambar 2.3</b> Spektra IR ekstrak etanol buah parijoto.....	19
<b>Gambar 4.1</b> Hasil uji fitokimia ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat .....	31
<b>Gambar 4.2</b> Reaksi dugaan antara senyawa flavonoid dengan Mg dan HCl .....	32
<b>Gambar 4.3</b> KLTA eluen terbaik sebelum dan sesudah disemprot amonia .....	37
<b>Gambar 4.4</b> Hasil KLTP eluen metanol: aquades di bawah lampu UV .....	38
<b>Gambar 4.5</b> Hasil analisa isolat 4 dengan instrumen UV-Vis.....	45
<b>Gambar 4.6</b> Hasil analisa isolat 4 dengan FTIR.....	47



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b> Variasi eluen terbaik untuk isolasi flavonoid.....	16
<b>Tabel 2.2</b> Serapan gelombang flavonoid pada spektrofotometer UV-Vis .....	18
<b>Tabel 4.1</b> Data pemisahan flavonoid KLTA etil asetat daun binahong .....	34
<b>Tabel 4.2</b> Data KLTP campuran eluen metanol:aquades .....	39
<b>Tabel 4.3</b> Data KLTP campuran eluen metanol:aquades .....	40
<b>Tabel 4.4</b> Hasil uji toksisitas ekstrak etanol 70% menggunakan metode BSLT..	42
<b>Tabel 4.5</b> Nilai LC <sub>50</sub> sampel ekstrak, fraksi dan isolat 4 daun binahong .....	43
<b>Tabel 4.6</b> Interpretasi spektra FTIR isolat 4.....	48



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Rancangan Penelitian.....	61
<b>Lampiran 2.</b> Diagram Alir.....	62
<b>Lampiran 3.</b> Perhitungan Pembuatan Reagen dan Pembuatan Larutan .....	69
<b>Lampiran 4.</b> Perhitungan Hasil Penelitian dan Data Pengamatan.....	73
<b>Lampiran 5.</b> Dokumentasi Penelitian .....	84



## ABSTRAK

Ramadhianti, Servita. 2020. **Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dengan Metode *Brine Shrimp salina* Leach menggunakan Ekstraksi Ultrasonik**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd

---

**Kata kunci:** Tanaman binahong, Ekstraksi ultrasonik, BSLT, Kromatografi lapis tipis, Spektrofotometer Uv-Vis, FTIR

Tanaman binahong merupakan tumbuhan obat yang tumbuh di dataran rendah maupun dataran tinggi. Daun dari tanaman binahong tersebut banyak ditemukan senyawa kimia seperti flavonoid, alkaloid, triterpenoid. Senyawa aktif dalam binahong memiliki manfaat sebagai agen antikanker, salah satunya flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa flavonoid dalam isolat flavonoid daun binahong dengan identifikasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Kemudian hasil ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid hasil pemisahan KLTP diuji aktivitas sitotoksik dengan metode BSLT.

Daun binahong diekstraksi dengan metode ultrasonik selama 20 menit dan difraksinasi cair-cair menggunakan etil asetat:air (1:1) dengan pengulangan tiga kali. Rendemen yang didapatkan dari ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat masing-masing 13,93% dan 15,3% serta positif mengandung flavonoid setelah diuji kualitatif, berubah warna menjadi cokelat pada sampel. Isolasi flavonoid dilakukan dengan cara kromatografi lapis tipis menggunakan eluen metanol: aquades (6:4) dan menghasilkan noda yang diduga flavonoid berwarna kuning di bawah lampu UV 366 nm. Berdasarkan hasil uji toksisitas menggunakan metode BSLT, didapatkan nilai  $LC_{50}$  untuk ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat flavonoid berturut-turut 56,721 ppm, 28,954 ppm, dan 24,371 ppm. Hasil  $LC_{50}$  tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat flavonoid bersifat toksik. Kemudian hasil identifikasi isolat flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan empat serapan pada panjang gelombang 668 nm, 421 nm, 368 nm dan 276 nm. Adapun hasil identifikasi menggunakan FTIR, isolat diduga masuk dalam golongan flavonoid yang mempunyai gugus fungsi O-H, C-H alkana, C-H alkil, C=O karbonil, C=C nonkonjugasi, daerah aromatik *overtone* C-H pada  $CH_2$ , C-OH primer, dan C-H alkana.

## ABSTRACT

Ramadhianti, Servita. 2020. **Isolation and Toxicity Test Of Flavonoid Compounds from Binahong Leaves (*Anredera cordifolia*) using Brine Shrimp salina Leach Method with Ultrasonic Extraction.** Department of Chemistry, Science and Technology Faculty, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd

---

**Keywords:** Anredera Cordifolia, Ultrasonic Method, Toxicity Test, Thin Layer Chromatography, spectrofotometer UV-Vis, FTIR.

Binahong plants are medicinal plants that grow in the lowlands and highlands. The leaves of the binahong plant are often found in chemical compounds such as flavonoids, alkaloids, triterpenoids. Active compounds in binahong have benefits as anticancer agents, one of which is flavonoids. This study aims to determine the class of flavonoid compounds in binahong leaf flavonoid isolates with LC-MS. Then the results of crude extracts, ethyl acetate fraction and flavonoid isolates from the KLTP separation were tested for T47D breast anticancer activity.

Binahong leaves were extracted by ultrasonic method for 20 minutes and fractionated using ethyl acetate: water (1: 1) with three repetitions. The yield obtained from ethanol extract 70% and ethyl acetate fraction respectively 13.93% and 15.3% and positive for containing flavonoids after qualitative testing, changed color to brown in the sample. Isolation of flavonoids was carried out by thin layer chromatography using methanol: aquades (6: 4) as the eluent and resulted in stains that were suspected of being yellow flavonoids under 366 nm UV light. Based on the results of the toxicity test using the BSLT method, the  $LC_{50}$  values were obtained for 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction, and flavonoid isolates respectively 56,721 ppm, 28,954 ppm, and 24,371 ppm. The  $LC_{50}$  results indicate that the 70% ethanol extract, ethyl acetate fraction, and flavonoid isolates are toxic. Then identification results of flavonoid isolates with a UV-Vis spectrophotometer are 668 nm, 421 nm, 368 nm dan 276 nm. As for the results of identification using FTIR, the isolates were thought to be included in the flavonoid group which had the functional groups O-H, C-H alkane, C-H alkyl, C=O carbonyl, C=C nonkonjugation, aromatic overtone C-H in  $CH_2$ , C-OH primer, dan C-H alkene.

## المستخلص

رمضياتي، سيرينا. 2020. عزل واختبار سمية مركب الفلافونويد من ورق بيناهونغ (أنريديرا كورديفوليا) بطريقة روبيا مالحيسالينا ليتش. البحث الجامعي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. مشرفة: إيلوك كاملة حياقي، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: نبات بيناهونغ، الاستخراج بالموجات فوق الصوتية، اختبار فتك الجمبري البحري، طبقة رقيقة اللون، مقياس

الطيف الضوئي  $UV-Vis$ ، مطيافية الأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه.

بيناهونغ هي نبات طبي تنبت في الأراضي المنخفضة والمرتفعة. وفي ورقها العديد من المركبات الكيميائية مثل فلافونويد، ألكالويد، تريترينويد. المركبات في بيناهونغ لها فوائد عديدة كعامل مضاد للسرطان، منها فلافونويد. الهدف من هذا البحث هو معرفة مجموعة من مركبات الفلافونويد في الفلافونويد بيناهونغ تعزل عن طريق تحديد مقياس الطيف الضوئي  $UV-Vis$ ، مطيافية الأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه. ثم تم اختبار المستخلص الخام وجزء أسيتات الإيثيل وعزل الفلافونويد الناتج عن فصل التحفيز المستحث على المدى الطويل من أجل النشاط السام للخلايا بطريقة اختبار فتك الجمبري البحري.

تم استخلاص ورق بيناهونغ بطريقة الموجات فوق الصوتية لمدة 20 دقيقة وتجزئتها باستخدام أسيتات الإيثيل: ماء (1:1) بثلاث مرات. كان العائد المتحصّل عليه من مستخلص الإيثانول بنسبة 70%. وكسر أسيتات الإيثيل 13.93% و 15.3% على التوالي وكان موجبا للفلافونويدات بعد الاختبار الكيفي، تغير اللون وأصبح أسمرًا في العينة. تم عزل مركبات الفلافونويد عن طريق كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام عنصر الميثانول: الماء المقطر (6:4) وأسفر عن بقع يظن أنها مركبات الفلافونويد الصفراء تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية 366 م. بناء على اختبار السمية باستخدام طريقة اختبار فتك الجمبري البحري، تم الحصول على نتيجة LC50 النصفية لـ 70% من مستخلص الإيثانول وجزء أسيتات الإيثيل وعزلات الفلافونويد على التوالي 47,268 جزء في المليون و 28,954 جزء في المليون و 24,371 جزء في المليون. تشير نتيجة LC50 إلى أنّ مستخلص الإيثانول 70% من جزء أسيتات الإيثيل، وعزلات الفلافونويد سامة. تمّددت نتيجة تعريف عزلات الفلافونويد بمقياس الطيف الضوئي  $UV-Vis$ ، إلى أربعة امتصاصات بطول موجة 668 نانومتر، 421 نانومتر، و 276 نانومتر. أمّا بالنسبة إلى نتيجة التعرف باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه، فقد كان يعتقد أنّ العزلات مشمولة في مجموعة الفلافونويد التي تضم المجموعات الوظيفية C-H، O-H، الكان، C-H، C=O الكربونات، C=C عدم الاقتران، رقعة منطقة عطرية C-H في CH<sub>2</sub> C-OH الأساسية، و C-H الكينا.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia*) ialah tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai sitotoksik, antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker (Djamil. 2012). Tanaman binahong dikenal oleh masyarakat Tiongkok sebagai obat tradisional pada bagian akar, daun, dan rhizoma (Setiaji, 2009). Allah SWT menciptakan tanaman binahong dengan berbagai manfaatnya yang berguna untuk kehidupan makhluk hidup. Sebagaimana yang telah disebutkan pada Al-Qur'an dalam surah As-Syu'ara ayat 7 tentang bermacam tanaman yang ada di bumi beserta manfaatnya.

يَرَوۡا۟ اِلَى الْاَرْضِ كَمۡ اُنۡبۡتۡنَا فِيهَا مِنۡ كُلِّ رَۡوۡحٍ كَرِيۡمٍ

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Q.S. asy-Syu'ara : 7)

Ayat di atas bermakna bahwa Allah SWT menciptakan bumi beserta isinya untuk dimanfaatkan manusia dengan bijak sebagai pemenuh kebutuhan sehari-harinya. Manusia yang patutnya bersyukur, harus berusaha mengeksplorasi manfaat yang terkandung dalam tumbuhan agar mengetahui kebesaran Allah SWT. Setiap tumbuhan yang diciptakan Allah SWT pasti memiliki maksud dan manfaat yang luar biasa untuk manusia. Allah SWT memberi tanda-tanda bagi orang yang berfikir dan merenung agar selalu taat.

Aktivitas dalam tumbuhan berkaitan dengan metabolit sekunder yang bermacam-macam. Hasil fitokimia daun binahong oleh Lidinilla (2014)



menunjukkan adanya metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin dan polifenol dalam ekstrak etanol 70%. Samirana (2014) menemukan senyawa flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid dari ekstrak etanol 70% daun binahong. Berdasarkan penelitian tersebut bisa dikatakan salah satu metabolit sekunder yang terkandung dalam daun binahong yakni flavonoid.

Tanaman yang mempunyai senyawa flavonoid mampu digunakan sebagai antikanker, antioksidan, antiinflamasi, antialergi dan antihipertensi (Fauziah, 2010). Fungsi terpenting dari flavonoid dari sayuran atau buah untuk mengurangi resiko terkena penyakit stroke maupun jantung (Safitri, 2004). Suatu tanaman dapat memiliki aktivitas antioksidan apabila mengandung senyawa yang bisa menangkal radikal bebas, misalnya flavonoid, fenol, dan steroid (Subeki, 1998). Beberapa tanaman yang dapat digunakan sebagai antioksidan antara lain daun sirsak (*Annona muricata linn*), daun binahong (*Anredera cordifolia*) dan daun benalu mangga (*Dendrophthoe pentandra*) (Kurniasih, dkk, 2015).

Pengobatan suatu penyakit yang dilakukan manusia, Rasulullah SAW bersabda bahwa setiap penyakit yang diberikan Allah SWT pasti ada obatnya. Hal ini sejalan dengan sabda Rasulullah SAW dalam hadistnya, yang berbunyi:

قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ (رَوَاهُ مُسْلِمٌ)

Artinya : “Rasulullah bersabda: setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka sembuhlah si penderita atas izin Allah Azza Wa Jalla” (HR. Muslim no.1473).”

Berdasarkan hadist yang diriwayatkan, Allah SWT telah memberikan suatu pertanda mengenai pengobatan penyakit. Semua orang dapat sembuh dari penyakit

atas seizin Allah SWT. Ungkapan hadist ini memberikan penguatan bahwa manusia bisa mengambil manfaat dari tumbuhan yang Allah SWT ciptakan. Manusia hendaklah mencari pengetahuan agar menemukan obat-obatan yang berasal dari tanaman.

Potensi tanaman binahong sebagai tanaman toksik dibuktikan pada hasil penelitian Surbakti (2018) menguji sitotoksitas daun binahong ekstrak etanol 70% hasil maserasi dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menghasilkan  $LC_{50}$  sebesar 97,797  $\mu\text{g/mL}$ . Jazilah (2014) juga menguji sitotoksitas daun binahong dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksana dan mendapatkan hasil  $LC_{50}$  berturut-turut 106,992 ppm dan 175,800 ppm. Fraksi n-heksana daun binahong juga menunjukkan hasil yang toksik dengan  $LC_{50}$  463,877 ppm (Manik, 2013). Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi flavonoid pada daun binahong mendapatkan flavonoid jenis 4',6,7 trihidroksiauron (Windi, 2011) dengan hasil uji sitotoksik  $LC_{50}$  sebanyak 58,447 ppm. Berdasarkan data tersebut, daun binahong mempunyai aktivitas metabolit sekunder yang toksik yang dilihat dari nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000 ppm dan masuk dalam kategori toksik.

Cara memperoleh senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, pemilihan metode ekstraksi juga penting guna menarik senyawa flavonoid lebih banyak pada daun binahong. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan metode ultrasonik. Metode ini memanfaatkan efek gelombang akustik dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz (Suslick, 1998). Prinsip dasar dari metode ini ialah meningkatnya proses ekstraksi dikarenakan ada gelembung kavitas oleh gelombang ultrasonik. Gelembung kavitas akan menumbuk sampel secara konstan,

dan menjadikan proses ekstraksi ini lebih cepat dibandingkan metode maserasi (metode konvensional) (Thompson, 1999).

Ekstraksi dengan metode ultrasonik dapat meningkatkan rendemen daun binahong dibuktikan oleh penelitian (Sjahid, 2020) mendapatkan 40,09% selama 20 menit ekstraksi, sementara hasil maserasi selama 3 hari sebanyak 11,40% (Dwitiyanti, 2019). Hasil rendemen terbaik ekstraksi ultrasonik juga dilakukan Handayani (2016) yang mendapatkan rendemen dan kadar flavonoid paling tinggi pada waktu ekstraksi 20 menit yakni 11,72% dengan kadar 45843 ppm. Berdasarkan pada penelitian diatas, dikatakan bahwa ekstraksi metode ultrasonik memberi hasil yang relatif baik dibanding ekstraksi metode maserasi dalam segi efisiensi waktu dan mampu menarik kadar flavonoid lebih banyak. Pada penelitian ini, peneliti ingin membandingkan hasil LC<sub>50</sub> daun binahong yang diekstraksi dengan cara maserasi dan ultrasonik.

Penelitian ini dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol 70%. Kemudian hasil ekstrak kasar dipartisi dengan etil asetat:air (1:1) (Susmayanti, 2011) untuk menarik senyawa flavonoid. Hasil fraksi etil asetat di Kromatografi Lapis Tipis Anallitik (KLTA) untuk mencari eluen terbaik dan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) sebagai proses pemurnian. Eluen yang dipakai ada lima macam, yaitu etanol:etil asetat:n-hexana (3:5:8) (Susmayanti, 2011); *n*-butanol:asam asetat:air (4:1:5) (Pradana, 2014); etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26) (Samirana, 2017); metanol:aquades (4:6) (Putri, 2017); dan n-hexana:etil asetat (7:3) (Walida, 2016).

Kemudian ekstrak kasar etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid diuji sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk

pengujian tingkatan toksik yang terdapat pada sampel. Hasil LC<sub>50</sub> yang didapatkan tersebut dapat digunakan sebagai kajian awal tanaman binahong untuk uji antikanker. Metode BSLT digunakan karena cepat, sederhana, murah, dan tanpa penanganan khusus (Kristanti, 2008). Isolat flavonoid yang didapatkan dari proses KLTP, diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR untuk mengetahui golongan senyawa flavonoid.

### 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas dari ekstrak kasar etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid pada daun binahong (*Anredera Cordifolia*)?
2. Golongan senyawa flavonoid apakah yang terkandung dalam isolat flavonoid daun binahong (*Anredera Cordifolia*) berdasarkan hasil identifikasi menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

### 1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas dari ekstrak kasar etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid pada daun binahong (*Anredera Cordifolia*).
2. Untuk mengetahui golongan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat flavonoid daun binahong (*Anredera Cordifolia*) berdasarkan hasil identifikasi menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### 1.4 Batasan Masalah

1. Senyawa yang akan dianalisis dan diidentifikasi hanya golongan flavonoid yang ada pada daun binahong (*Anredera Cordifolia*) dan sampel yang digunakan didapat di kota Balikpapan, Kalimantan Timur.

2. Ekstraksi secara ultrasonik menggunakan pelarut etanol 70% dan hasil ekstrak kasar dipisahkan dan dipartisi dengan pelarut etil asetat dan air (1:1).
3. Proses isolasi flavonoid digunakan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan eluen terbaik dari proses KLTA.
4. Metode yang digunakan untuk uji toksisitas ialah BSLT untuk ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid.
5. Instrumen yang digunakan untuk analisis golongan senyawa flavonoid dalam isolat flavonoid adalah spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil riset ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan tanaman binahong (*Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis*) sebagai alternatif dalam pembuatan obat-obatan herbal, khususnya untuk pengobatan seperti kanker. Sehingga mempermudah pengkajian lebih lanjut tentang aktivitas dan pemanfaatan senyawa flavonoid di tanaman binahong dalam berbagai bidang, terutama bidang industri dan kesehatan. Selain itu untuk memberi informasi tentang tingkatan toksisitas dari daun binahong.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tanaman Binahong dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan alam dan isinya seperti hewan dan tumbuhan dengan hikmah yang amat besar. Tidak ada yang sia-sia semua yang diciptakan Allah SWT. Dalam hal ini, manusia diberi kesempatan seluas-luasnya untuk mengambil manfaat dari hewan dan tumbuhan tersebut. Sekecil apapun ciptaan Allah SWT memiliki nilai guna, hanya orang kafirlah yang memandang remeh ciptaan Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surah Shad ayat 27 :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَلِكَ ظَنَّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ قَوْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ

Artinya : *“Dan Kami tidak akan menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.* (Q.S Shad:27).

Adanya langit dan bumi beserta isinya ialah hikmah yang agung. Apabila mereka memiliki prasangka buruk terhadap Allah SWT, celakalah mereka. Manusia diberi tanggungjawab untuk menjaga dan memanfaatkan segala ciptaan Allah SWT di dunia. Sehingga dapat mengetahui manfaat semua ciptaan-Nya seperti pemanfaatan daun binahong sebagai obat tradisional penyakit. Sebagaimana dalam firman Allah SWT dalam surah Asy-Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَبُهِتَ النَّاسُ ۗ وَهِيَ سَاهِيَةٌ ۗ فَهِيَ يَشْفِينُ ۗ

Artinya: *“Dan apabila aku sakit, Allah SWT lah yang menyembuhkan aku,”* (QS. Asy-Syu'ara:80)

Dalam ayat di atas, dijelaskan bahwa Allah SWT telah memberikan penyakit kepada umat-Nya sebagai ujian dengan izin-Nya pula penyakit itu dapat disembuhkan. Shihab (2001) menyatakan Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tanaman bisa dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit dan ini merupakan anugerah Allah SWT yang harus dipelajari dan dimanfaatkan. Savitri (2008) menyatakan tumbuhan yang baik merupakan tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan sebagai pengobatan. Rasulullah SAW juga pernah menggunakan tanaman sebagai obat herbal yaitu madu, jintan hitam, cuka, buah kurma, delima, bawang putih dan berbagai jenis tanaman lainnya.

Banyaknya penelitian yang memanfaatkan tanaman sebagai penyembuhan kanker payudara. Firdaus (2016) mengisolasi senyawa tanin dalam tanaman rumput bambu (*Lophaterum Gracile B.*) dan berpotensi sebagai agen antikanker payudara. Tanaman herbal lainnya yakni koro benguk (*Mucuna pruriens (L.)*), tanaman ini memiliki senyawa-senyawa kimia yang baik untuk dimanfaatkan sebaik-baiknya bagi kelangsungan hidup manusia (Murungun, 2011). Tak terkecuali tanaman binahong (*Anredera cordifolia*) yang mampu digunakan sebagai antioksidan dalam tubuh (Djamil, 2012).

## 2.2 Morfologi dan Klasifikasi Tanaman Binahong

Binahong adalah tanaman menjalar dan bersifat *perennial* (berumur lama), panjangnya mencapai 5 m. Batangnya lunak, silindris, berwarna merah, kadang membentuk seperti umbi yang melekat di ketiak daun dan bertekstur kasar. Daunnya berbentuk jantung dengan panjang 5—10 cm dan lebar 3—7 cm, ujungnya runcing, permukaannya licin dan bisa dimakan. Bunganya berbentuk

tandan dan bermahkota berwarna putih tulang berjumlah lima helai tidak berlekatan. Akar berbentuk tumpang, dan daging akar lunak (Manoi, 2009). Khasiat tanaman binahong diantaranya mempercepat penyembuhan luka, sebagai antibakteri dan antiinflamasi (Miladiyah dan Prabowo, 2012).



Gambar 2.1 Daun Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia*)

Klasifikasi tanaman binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) *steenis*) sebagai berikut (Ganjar, 2007):

Kingdom : Plantae  
 Subkingdom : Tracheobiota  
 Super Divisi : Spermatophyta  
 Divisi : Magnoliophyta  
 Kelas : Magnoliopsida  
 Sub Kelas : Hamamelidae  
 Ordo : Caryophyllales  
 Famili : Basellaceae  
 Genus : *Anredera Juss*  
 Spesies : *Anredera Cordifolia* (Ten.) *Steenis*



### 2.3 Senyawa Aktif Tanaman Binahong (*Anredera Cordifolia*)

Tanaman binahong memiliki banyak senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan hasil fitokimia oleh Rahmawati, dkk (2013) dalam batang, daun, umbi, dan bunga terdapat senyawa saponin, terpenoid, steroid, fenol, flavonoid, dan alkaloid. Jazilah (2014) juga melakukan fitokimia pada daun binahong, menghasilkan kandungan flavonoid, alkaloid dan saponin paling banyak dibanding lainnya. Kandungan senyawa flavonoid pada tanaman binahong juga banyak dibuktikan dengan hasil fitokimia dengan warna terang (Astuti, 2013).

Metabolit sekunder yang dikandung dalam tanaman memiliki fungsi dan peranan yang bermacam-macam. Biasanya metabolit sekunder berguna untuk mempertahankan diri dari lingkungannya (Ergina, 2014). Beberapa penelitian menunjukkan tanaman binahong memiliki manfaat. Menurut (Astuti, 2013), efek dari metabolit sekunder pada tanaman bisa digunakan sebagai antiproliferasi, antibakteria, antioksidan dan sitotoksitas. Setiaji (2009) mengekstraksi rhizoma binahong dengan pelarut etil asetat, didapatkan bahwa pada konsentrasi 2% bisa membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*.

Aktivitas farmakologis yang dimiliki oleh tanaman binahong disebabkan karena ada senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Kandungan senyawa kimia dalam tanaman binahong sebagai antiproliferasi yang dibuktikan Rahardian (2017) dengan nilai  $IC_{50}$  85,506  $\mu\text{g/mL}$ . Aktivitas farmakologis lainnya yakni antioksidan yang dilakukan Djamil (2012) yang mengisolasi flavonoid didapatkan antioksidan dengan  $IC_{50}$  68,07  $\mu\text{g/mL}$ . Adapun uji sitotoksik daun binahong dengan metode maserasi pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol didapatkan  $LC_{50}$  berturut-turut 591,618 ppm, 611,706 ppm, dan 1479,151 ppm (Susmayanti, 2012). Berdasarkan penelitian diatas membuktikan bahwa daun binahong memiliki banyak

manfaat karena senyawa metabolit sekunder yang ada, terdapat aktivitas antioksidan, asam askorbat dan total fenol yang cukup tinggi (Uchiha, 2003).

#### **2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif menggunakan Metode Ultrasonik**

Ekstraksi ultrasonik didasarkan pada peningkatan transfer massa yang diberikan gelombang akibat gelombang akustik ultrasonik. Gelombang akustik merambat pada bahan yang diekstraksi dan menyebabkan medium bergetar. Getaran itu memberi perpindahan massa terhadap pelarut dan sampel yang mempengaruhi proses ekstraksi. Proses getaran menghasilkan gelembung kavitasi, ketika gelombang kavitasi pecah akan meningkatkan pori-pori dinding sel. Pori-pori yang membesar akan memecahkan dinding sel dan komponen dalam sel keluar bercampur larutan (Thompson dan Doraiswamy, 1999).

Keuntungan dari ekstraksi ultrasonik yakni membutuhkan waktu yang singkat dan meningkatkan rendemen. Hal itu dibuktikan dengan penelitian Yang, dkk (2009) mengekstraksi tongkol jagung dengan metode ultrasonik selama 43 menit mampu mengekstrak 43% sementara dengan ekstraksi maserasi selama 24 jam hanya mengekstrak 34%. Adapun penelitian lain dilakukan Cameron dan Wang (2006) yang mengekstraksi pati jagung dengan metode ultrasonik selama 2 menit didapat rendemen 55,2-67,8%. Hasil tersebut lebih baik dibandingkan proses perendaman pati jagung dengan air selama 60 menit yang mendapatkan rendemen 53,4%. Menurut Zou TB dan En-Qin (2014), ekstraksi ultrasonik mempunyai kelebihan lain, yaitu bisa menurunkan suhu pada ekstrak tidak tahan panas dan cocok untuk mengekstraksi senyawa bioaktif tidak tahan panas.

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini ialah etanol 70%. Menurut Guether (2006) etanol memiliki titik didih yang rendah dan mudah diuapkan,

bersifat *inert* dan dapat melarutkan senyawa dengan cepat. Menurut Panji (2012), etanol 70% dapat mengisolasi flavonoid berkonsentrasi tinggi. Rizkia (2014) mengekstraksi umbi binahong dengan etanol 70% secara maserasi memperoleh rendemen 8,62% dan didapat senyawa flavonoid lebih banyak. Flavonoid mudah diekstraksi dengan etanol 70% juga dibuktikan dengan penelitian Pradana (2014) yang menghasilkan rendemen 9,49%.

Penggunaan ekstraksi ultrasonik dipengaruhi sejumlah faktor untuk mendapatkan hasil yang optimum, yakni variasi lama ekstraksi dan variasi pelarut. Sekarsari (2019) mengekstraksi flavonoid dari jambu biji dengan metode ultrasonik mendapatkan hasil paling tinggi pada waktu 20 menit dengan kadar 16,26%. Hal yang sama dilakukan Yuliantari (2017) yang mendapatkan rendemen dan kadar flavonoid paling tinggi pada waktu 20 menit dengan rendemen 19,14% dan kadar flavonoid 903,90 mg QE/g. Ibrahim (2015) melaporkan bahwa waktu ekstraksi yang terlalu lama dan melampaui batas optimum akan menyebabkan senyawa yang terkandung di dalam sampel akan rusak. Berdasarkan data diatas, pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 70% dengan lama ekstraksi 20 menit.

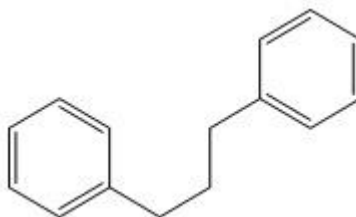
Proses ekstraksi senyawa flavonoid tanaman binahong dipartisi menggunakan pelarut etil asetat dan air dengan perbandingan 1:1 (Susmayanti, 2012). Penelitian Mojo (2016) membuktikan bahwa fraksi etil asetat dari daun soyogik memperoleh nilai  $LC_{50}$  sebesar 12,97 ppm ketika diuji toksisitas dengan metode BSLT. Aglikon flavonoid adalah polifenol karena itu memiliki sifat kimia seperti fenol, bersifat agak asam dan larut dalam basa. Adanya sejumlah gugus hidroksil yang tersulih, flavonoid merupakan senyawa polar. Gula yang terikat pada flavonoid cenderung membuat flavonoid mudah larut dalam air dan campuran

pelarut polar dengan air merupakan pelarut lebih baik untuk glikosidanya. Sebaliknya, aglikon kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, serta flavonol yang termetoksilasi cenderung mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Deman, 1997).

## 2.5 Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar dan memiliki beberapa gugus –OH. Golongan ini mudah diekstrak dengan pelarut polar seperti etanol dan akan membentuk ikatan hidrogen (Harborne, 1987). Flavonoid memiliki tiga jenis struktur yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid (Kristanti, dkk, 2008). Jenis flavonoid yang ada di alam, adalah antosianin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, kalkon, flavanon, isoflavon.

Flavonoid dapat ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi di bagian bunga maupun vegetatif (Robinson, 1995). Flavonoid mempunyai kemampuan antioksidan yang dapat mentransfer sebuah atom hidrogen atau elektron ke senyawa radikal bebas dengan cara menghentikan tahap reaksi. Antioksidan sangat dibutuhkan bagi tubuh manusia guna melindungi tubuh dari radikal bebas yang berbahaya. Tubuh yang mempunyai asupan antioksidan mampu memperlambat dan menghambat kerusakan dalam tubuh karena proses oksidasi (Sayuti., dkk).



Gambar 2.2 Kerangka dasar flavonoid (Robinson, 1995)

Senyawa flavonoid di dalam suatu tanaman dapat diuji dengan metode Wilstater yakni metode dengan cara menambahkan larutan HCl pekat dan serbuk magnesium (Mg). Sampel yang positif mengandung senyawa flavonoid akan ditandai dengan berubahnya larutan sampel menjadi merah, kuning, atau jingga karena hasil reduksi Mg dan HCl pekat dengan larutan sampel (Septyningsih, 2010). Larutan sampel yang berubah menjadi merah atau jingga tersebut menandakan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid jenis flavonol, flavanon, flavononol, dan xanton (Sukinah, 2017).

## 2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan kromatografi berdasarkan distribusi komponen sampel antara dua fase, yaitu fasa diam dan fasa gerak (Gandjar dan Rohman, 2007). Senyawa kimia bergerak naik mengikuti fasa gerak dengan jarak berbeda berdasarkan kepolarannya (Stahl, 2013). Fase diam dapat digunakan adalah silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau alumunium. Fase gerak berupa eluen yang berada dalam bejana pengembang (Gritter, 1991).

Perlakuan KLT ini untuk memurnikan dan mengambil senyawa flavonoid dari sampel. Pemisahan flavonoid terjadi karena perbedaan kecepatan laju reaksi beberapa zat terlarut yang berbeda yang dibawa naik oleh eluen (Gandjar dan Rohman, 2007). Identifikasi senyawa flavonoid diambil dari jarak tempuh senyawa yang dipisahkan dibandingkan dengan laju pelarutnya (Rf). Beberapa penelitian membuktikan bahwa senyawa flavonoid dapat diisolasi dengan eluen yang sesuai.

Flavonoid berupa senyawa polifenol dan berubah warna bila bereaksi dengan basa sehingga mudah terdeteksi di kromatogram. Isoflavon (misal deidzen)

akan berwarna biru terang pada sinar UV jika diuapi amonia, tetapi isoflavon lain seperti genestain tampak seperti lembayung pudar dengan amonia dan berubah menjadi coklat pudar (Harborne, 1987.). Menurut Robinson (1995), flavon dan flavonol dapat diuji dengan diuapi amonia lalu menimbulkan warna kuning. Kemudian flavonoid jenis kalkon dan auron akan berubah dari warna kuning menjadi merah setelah diuapi amonia.

Tabel 2.1 Variasi eluen terbaik untuk isolasi flavonoid

Sampel	Eluen	Hasil	Pereaksi	Referensi
Daun binahong	Etanol: etil asetat: n-heksana (3:5:8)	3 noda dengan $R_f$ 0,88, 0,76 dan 0,72	Diuapkan dengan $NH_3$ dan penyemprotan $AlCl_3$	Susmayanti, 2012
Umbi binahong	N-butanol:asam asetat:air (4:1:5)	6 noda dengan $R_f$ 0,38-0,94	Diuapkan dengan $NH_3$	Pradana, 2014
Daun Binahong	Etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26)	8 noda dengan positif flavonoid pada $R_f$ 0,81	Diuapkan dengan $NH_3$ dan dilihat dengan sinar UV 366 nm	Samirana, 2017
Daun mimba	Metanol:aquades (4:6)	2 noda dengan $R_f$ 0,36 dan 0,63.	Diuapkan dengan $NH_3$	Putri, 2017
Jantung Pisang Batu	N-heksana:etil asetat (7:3)	3 noda dengan $R_f$ 0,64, 0,7, dan 0,8	Diuapkan dengan $NH_3$	Walida, 2016

## 2.7 Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan pengujian senyawa secara umum yang mendeteksi seberapa bioaktivitas dalam suatu sampel. Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode ini adalah antikanker, antitumor, antimalaria, dan antimikroba (Colegate dan Molyneux, 2007). Pengujian toksisitas berguna untuk mengetahui seberapa beracun dosis yang diperlukan untuk suatu takaran dalam pengobatan (Azizah, 2016). Tingkat toksisitas mortalitas terhadap *Artemia salina* memiliki tiga kategori, harga  $LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$  sangat toksik,  $LC_{50} 30\text{-}1000 \mu\text{g/mL}$  termasuk toksik dan  $LC_{50} >1000$  tidak toksik (Meyer, 1982). Keuntungan dari metode BSLT ini ialah waktu uji yang relatif cepat, sederhana, menghasilkan jumlah organisme yang melimpah, murah dan memerlukan sedikit sampel (Meyer, 1982).

### 2.7.1 Klasifikasi Larva Udang *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* merupakan kelompok udang-udangan dari *phylum Arthropoda Artemia* yang hidup di air asin dengan tingkat salinitas 60—300 ppt. Spesies ini memiliki ukuran tubuh sebesar 1—2 cm dengan waktu hidup selama 25 hari. *Artemia salina* hanya bertahan hidup pada suhu di bawah 35 °C.

Berikut klasifikasi larva udang yang digunakan dalam uji toksisitas metode BSLT (Dumitrascu, 2011):

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Crustacea

Ordo: Anostraca

Family: Artemiidae

Genus: *Artemia*

Species: *Artemia salina*

Nelson (2019) melakukan penelitian uji toksisitas fraksi etanol dan fraksi n-heksana daun binahong menghasilkan hasil  $LC_{50}$  sebesar 40,761 ppm dan 273,145 ppm. Hasil tersebut termasuk dalam kategori toksik (Lestari, 2015). Uji toksisitas daun binahong dengan ekstrak etil asetat dan n-heksana juga dilakukan Jazilah (2014) dengan hasil  $LC_{50}$  sebanyak 106,992 ppm dan 175,800 ppm serta menunjukkan potensi bioaktivitas terhadap larva udang. Merujuk pada hasil  $LC_{50}$  dari penelitian sebelumnya, daun binahong termasuk dalam kategori toksik karena kurang dari 1000 ppm (Masroh, 2010).

## **2.8 Identifikasi Flavonoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR**

### **2.8.1 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis**

Spektrofotometer UV-Vis ialah instrumen untuk mengukur transmisi atau absorben dengan prinsip interaksi antar sinar UV. Sehingga terjadi transisi elektronik suatu molekul antara orbital ikatan (*bonding*) dengan non ikatan (*non-bonding*). Kemudian selisih perbedaan energi antar orbital sebanding dengan panjang gelombang yang diserap oleh detektor dengan satuan nanometer (nm) (Panji, 2012). Hasil penyerapan detektor menghasilkan spektrum yang memberi informasi gugus kromofor pada sampel (Hendayana, 2006).

Veronita (2017) mengidentifikasi dugaan senyawa flavonoid jenis auron dalam fraksi etil asetat daun binahong, menghasilkan panjang gelombang 410 nm (pita I) dan 292 nm (pita II). Markham (1988) juga menyatakan bahwa serapan gelombang senyawa flavonoid itu berbeda-beda dan dapat disimpulkan pada tabel 2.3.



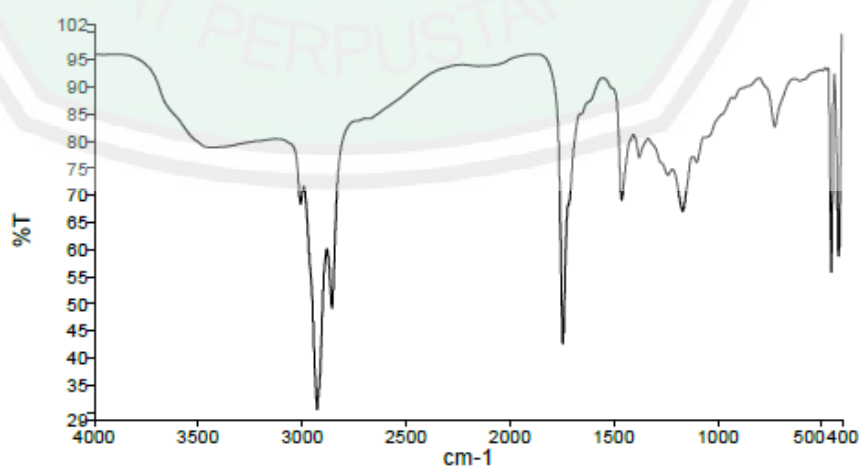
Tabel 2.2 Serapan gelombang senyawa flavonoid pada instrumen spektrofotometer UV-Vis

Dugaan senyawa	Pita I (nm)	Pita II (nm)
Flavon	310—350	250—280
Flavonol (3-OH tersubstitusi)	330—360	250—280
Flavonol (3-OH bebas)	350—385	250—280
Isoflavon	310—330	245—275
Flavonon dan dihidroksiflavonol	300—330	275—295
Khalkon	340—430	230—270
Antosianin dan Antosianidin	465—560	270—280

(Markham, 1988)

### 2.8.2 Identifikasi menggunakan FTIR

Spektrofotometer inframerah digunakan untuk identifikasi gugus fungsi suatu senyawa dengan prinsip perbedaan momen dipol. Momen dipol yang berbeda dapat bervibrasi dan terbaca oleh sinar FTIR pada suatu molekul (Rohman, 2007). Vibrasi molekul menimbulkan *peak* pada bilangan gelombang dan intensitas pada tiap gugus molekul. Besarnya bilangan berbanding lurus dengan frekuensi yang dihasilkan (Panji, 2012). Keunggulan dari FTIR adalah kepekaannya dan resolusi yang tinggi serta waktu yang cepat (Williams dan Fleming, 2008).



Gambar 2.3 Spektra IR ekstrak etanol buah parijoto (Vifta, 2018)

Vifta (2018) telah mengidentifikasi senyawa yang diduga flavonoid dari ekstrak etanol buah parijoto menghasilkan gugus fungsi –OH pada daerah  $3009\text{ cm}^{-1}$ , C-H aromatik pada  $2929\text{ cm}^{-1}$ , C=O pada  $1744\text{ cm}^{-1}$  dan C-O pada  $1167\text{ cm}^{-1}$ . Hal yang sama juga dilakukan Veronita (2017) yang mengidentifikasi senyawa dugaan flavonoid pada fraksi etil asetat daun binahong mendapatkan hasil –OH ( $3381,04\text{ cm}^{-1}$ ), C=O ( $1735,53\text{ cm}^{-1}$ ), C=C aromatik ( $1643,27\text{ cm}^{-1}$ ), C-H alifatik ( $1376,87\text{ cm}^{-1}$ ), dan C-O ( $1216,92\text{ cm}^{-1}$ ).



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Februari—September 2020 di Laboratorium Organik dan Laboratorium Kimia Fisik dan Anorganik Universitas Mulawarman, Samarinda, serta Balai Karantina Pertanian Kelas I Balikpapan.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain blender, ayakan 60 mesh, oven, loyang untuk preparasi sampel. Ekstraksi dengan metode ultrasonik menggunakan seperangkat alat ekstraksi ultrasonik, erlenmeyer, corong *buchner* dan *rotary evaporator vacum*. Partisi dan uji kualitatif flavonoid menggunakan corong pisah, kertas saring, klem dan statif, bola hisap, spatula, tabung reaksi, pipet tetes, vortex, pipet ukur 5 mL. Uji KLT menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub>, *chamber*. Pendeteksi noda menggunakan lampu UV 254 nm dan 366 nm. Uji sitotoksik menggunakan plat uji, mikropipet, cawan petri, akuarium, erlenmeyer. Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan seperangkat instrumen spektrofotometer UV-Vis Varian Carry Hyperchem dan FTIR merk Varian tipe FT-100 .

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman binahong (*Anredera Cordifolia*) di Kota Balikpapan, Kalimantan Timur. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi ultrasonik adalah etanol 70% dan partisi adalah etil asetat dan air. Bahan uji kualitatif flavonoid dengan logam Mg dan HCl, NH<sub>3</sub> dan

$\text{AlCl}_3$ . Eluen KLTA dan KLTP digunakan pelarut diklorometana, kloroform, asam formiat, etanol, metanol, etil asetat, *n*-butanol, *n*-heksana dan asam asetat, plat KLT GF 254. Uji sitotoksik digunakan larva udang *Artemia salina* Leach.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Ekstraksi senyawa aktif dengan metode ultrasonik dan partisi
3. Uji kualitatif senyawa flavonoid dengan reagen
4. Pemisahan flavonoid dengan KLT Analitik dan KLT Preparatif
5. Uji sitotoksik BSLT ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid
6. Identifikasi senyawa aktif pada isolat flavonoid dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Daun tanaman binahong sebanyak 5 kg dibersihkan dari pengotornya, dicuci dengan air sampai bersih lalu diangin-anginkan sehingga tidak ada kontak langsung dengan sinar matahari. Selanjutnya diblender halus dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh.

#### 3.4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Daun Binahong dengan Ultrasonik

Serbuk daun binahong sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan sampel:pelarut (1:10). Selanjutnya, sampel diekstraksi selama 20 menit dengan frekuensi 42 kHz.

Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan corong *buchner* dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 40°C lalu didiamkan hingga pelarutnya hilang. Kemudian dihitung rendemennya.

Selanjutnya ekstrak pekat dipartisi menggunakan etil asetat dan air (1:1) dalam corong pisah. Lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan (fasa organik dan fasa air). Lapisan yang terbentuk dipartisi kembali hingga tiga kali pengulangan dengan etil asetat. Lapisan yang terbentuk diuji kualitatif, lapisan organik (atas) diduga mengandung flavonoid. Lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50°C dan selanjutnya didiamkan hingga pelarutnya hilang. Fraksi etil asetat ditimbang dan dibagi menjadi dua bagian, yakni sebagai sampel uji sitotoksik BLST dan dilanjutkan ke KLT. Fraksi etil asetat dapat dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2)$$

### 3.4.3 Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Filtrat ekstrak etanol 70% hasil ekstraksi ultrasonik dan fraksi etil asetat masing-masing dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi berbeda sebanyak 0,5 mL. Kemudian ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Jika larutan yang terbentuk berwarna merah atau jingga artinya mengandung flavonoid.

### 3.4.4 Pemisahan Flavonoid dengan KLT Analitik dan KLT Preparatif

#### 3.4.4.1 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Analitik

Kromatografi Lapis Tipis Analitik dilakukan untuk menentukan eluen yang terbaik. Sebelum dilakukan penjenjuran campuran eluen di dalam bejana kromatografi selama 1 jam. Plat silika gel F<sub>254</sub> diaktivasi didalam oven dengan suhu

100°C selama 30 menit. Sebelumnya, masing-masing plat dengan ukuran 3 x 10 cm diberikan batas bawah 1 cm dan batas atas 1 cm. Fraksi etil asetat ditotolkan dengan pipa kapiler sebanyak 5 kali. Plat dimasukkan dalam *chamber* dalam larutan yang sudah dijenuhkan. Proses elusi dihentikan ketika larutan pengembang sampai pada garis batas.

Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Spot yang nampak disemprot dengan NH<sub>3</sub>. Kemudian dihitung nilai *r<sub>f</sub>*nya. Hasil eluen dengan noda terbaik digunakan untuk kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Perlakuan ini diulangi sebanyak 3 kali. Berikut campuran larutan pengembang atau eluen yang digunakan.

1. N-heksana:etil asetat (7:3) (Walida, 2016)
2. N-butanol:asam asetat:air (4:1:5) (Pradana, 2014)
3. Metanol: aquades (6:4) (Putri, 2017)
4. Etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26) (Samirana, 2017)
5. Etanol:etil asetat:n-heksana (3:5:8) (Susmayanti, 2012)

#### **3.4.4.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif (KLTP)**

Pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20 cm. Fraksi etil asetat ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi dan jarak satu sama lainnya 1 cm sebanyak 5 totolan. Selanjutnya dielusi menggunakan pelarut yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Spot yang nampak disemprot dengan NH<sub>3</sub>. Kemudian dihitung nilai *r<sub>f</sub>*nya. Noda yang diduga flavonoid, dikerok dan dilarutkan dengan 4 mL etil asetat.

$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots(3.3)$$

Kemudian kerokan KLTP divortex dengan kecepatan 3000 rpm dan disentrifuse selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dimasukkan ke botol vial dan ditutup dengan plastik. Lalu didiamkan selama 24 jam sampai pelarutnya menguap dan didapatkan isolat flavonoid.

### 3.4.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode BSLT

#### 3.4.5.1 Penetasan Larva Udang

Penetasan *Artemia salina Leach* dimasukkan ke dalam air sebanyak 250 mL dalam akuarium. Dimasukkan sebanyak 2,5 mg telur *Artemia salina Leach* ke dalam akuarium yang sudah diberi lampu dan aerator. *Artemia salina Leach* menetas dalam waktu 24 jam dan dapat digunakan sebagai uji saat usia 48 jam.

#### 3.4.5.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat flavonoid hasil KLTP dengan konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 ppm. Pengulangan uji dilakukan sebanyak 5 kali. Sampel ditimbang sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam 100 µL DMSO sambil diaduk. Lalu diencerkan dengan 150 µL akuades hingga volumenya 250 µL. Kemudian diambil 200 µL larutan dan diencerkan dengan 600 µL hingga volume totalnya 800 µL. Dibuat larutan kontrol dibuat sama seperti sampel tanpa penambahan sampel uji.

Pengujian toksisitas dengan menyiapkan 2 plat mikro standar sebagai plat uji dan plat kontrol. Baris ke-1 dan 2 masing-masing kolom dimasukkan 100 µL larutan sampel ke plat uji dan 100 µL larutan ke plat kontrol. Pada baris ke-2 diencerkan sebanyak 100 µL akuades dan diaduk. Lalu dipipet kembali 100 µL dan

dimasukkan ke baris ke-3 diencerkan lagi dan diaduk, begitu seterusnya. Sehingga konsentrasi yang dihasilkan mulai baris ke-2 yakni, 500; 250; 125; 62,5; dan 31,25  $\mu\text{m}$ . Selanjutnya ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  air laut yang terdiri dari 10 larva udang pada masing-masing kolom plat yang sudah ada sampel uji. Kemudian didiamkan selama 24 jam. Jumlah rata-rata larva udang yang mati dihitung pada tiap baris plat. Hasil  $\text{LC}_{50}$  sampel uji ditentukan dengan analisis probit menggunakan Minitab 16.

#### **3.4.6 Identifikasi Senyawa Flavonoid menggunakan Spektrofotometer**

##### **UV-Vis**

Hasil isolat flavonoid daun binahong yang didapatkan dari KLTP selanjutnya diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis. Isolat yang pelarutnya telah menguap diberi pelarut metanol sebanyak 4 mL. Lalu divortex sampai metanol mampu melarutkan isolat flavonoid. Kemudian isolat flavonoid dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisa menggunakan panjang gelombang 200—500 nm.

#### **3.4.7 Identifikasi Senyawa Flavonoid menggunakan FTIR**

Isolat flavonoid daun binahong diidentifikasi menggunakan instrumen FTIR untuk mengetahui gugus fungsi. Isolat digerus dengan KBr menggunakan *mortal agate* lalu dipress dengan besar tekanan 80 torr selama 10 menit sampai menjadi pelet. Kemudian pelet tersebut dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer FTIR dan dianalisa gugus fungsinya.



### 3.4.8 Analisa Data

Ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat flavonoid daun binahong akan diperoleh data kematian larva udang yang dianalisa angka probit dengan program Minitab 16. Hasil data yang didapatkan dari Minitab 16 menampilkan angka  $LC_{50}$  pada sampel uji yakni konsentrasi yang mengakibatkan kematian hewan uji sebanyak 50%. Kemudian identifikasi senyawa flavonoid dengan menginterpretasikan hasil spektra UV-Vis dan FTIR sehingga dapat diketahui dugaan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun binahong.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Daun binahong (*Anredera cordifolia* Ten. Steenis) diambil dari daerah Balikpapan, Kalimantan Timur. Preparasi sampel diawali dari pencucian sampel dengan air sampai bersih untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel. Daun binahong yang sudah dibersihkan kemudian dipotong kecil-kecil dan diblender untuk memperluas permukaannya dan memudahkan proses pengeringan. Proses pengeringan tersebut berguna untuk mengurangi kadar air dalam sampel dan mencegah reaksi enzimatik yang dapat merusak kandungan zat aktif sampel. Pengeringan sampel dilakukan pada suhu ruang (25°C) selama 7 hari hingga sampel kering.

Pemilihan suhu pengeringan akan berpengaruh terhadap kualitas sampel pada kadar fitokimia atau senyawa aktif. Proses pengeringan tidak menggunakan suhu yang tinggi karena bisa mendekomposisi senyawa aktif. Menurut Rompas (2014) suhu yang terlalu tinggi akan membuat senyawa aktif flavonoid mudah teroksidasi dan rusak.

Setelah didapatkan sampel kering, dilakukan proses penghalusan sampel dengan cara diayak dengan ayakan 60 mesh. Penghalusan bertujuan untuk memperluas permukaan sampel supaya saat tahap ekstraksi, interaksi sampel dan pelarut menjadi efektif sehingga meningkatkan rendemen ekstraksi. Serbuk daun binahong yang sudah halus disimpan dalam wadah bersih dan terlindung dari cahaya matahari. Pada penelitian ini didapat 500 gram bubuk daun binahong dari 2 kg sampel daun binahong sebelum diblender.

#### **4.2 Analisis Kadar Air**

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode gravimetri yakni proses penguapan air pada sampel menggunakan oven bersuhu 105°C sampai didapat berat konstan. Analisis kadar air bertujuan untuk koreksi rendemen karena kadar air mempengaruhi proses pelepasan senyawa metabolit ketika ekstraksi dan mengurangi rendemen. Kadar air yang tinggi akan menjadi media mikroorganisme yang dapat mendekomposisi senyawa metabolit sampel. Suatu bahan dapat tetap stabil tanpa pengaruh mikroorganisme ketika kadar air bahan kurang dari 10%.

Proses kadar air dilakukan dengan memanaskan cawan kosong ke dalam oven bersuhu 105°C selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Proses pengeringan dan pendinginan untuk menghilangkan air dalam cawan. Selanjutnya dilakukan penimbangan hingga diperoleh berat yang konstan. Kemudian dilakukan langkah yang sama dengan penambahan 5 gram sampel kering daun binahong sehingga didapatkan selisih berat sebelum dan sesudah diberi sampel.

Kadar air sampel binahong penelitian ini senilai 5,35%. Hal ini menunjukkan sampel tersebut bisa disimpan dalam jangka waktu lama dan baik untuk proses ekstraksi. Kumala (2007) menjelaskan bahwa semakin kecil kadar air dalam sampel, semakin mudah pula pelarut mengekstraksi senyawa aktif dengan rendemen yang besar.

#### **4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Daun Binahong dengan Ultrasonik**

Ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ialah metode ultrasonik selama 20 menit. Prinsip dari ekstraksi ultrasonik yaitu merambatnya gelombang ultrasonik pada medium yang dilewati dan akan mengakibatkan getaran. Getaran tersebut akan

membentuk gelombang kavitasi yang semakin lama akan pecah sehingga dinding sel tumbuhan pun pecah. Dinding sel tumbuhan itu menipis karena dirusak oleh sonikasi sehingga membuat proses pengadukan yang efektif dan lebih cepat antara pelarut dan senyawa (Sari, 2012).

Sampel daun binahong diambil sebanyak 8 gram dan dilarutkan ke dalam 80 mL pelarut etanol 70%. Pelarut etanol 70% dipilih karena bersifat polar dan bisa menarik senyawa metabolit dalam daun binahong seperti flavonoid. Dinding sel akan ditembus oleh pelarut dan memasuki rongga sel tumbuhan sehingga senyawa flavonoid dapat larut dalam pelarut tersebut. Hal ini sesuai dengan teori *like dissolve like* (Shriner, dkk, 1980). Sampel yang telah diekstraksi, kemudian disaring dan diambil filtratnya untuk dipekatkan. Pemekatan dengan rotary evaporator supaya pelarutnya hilang dan dapat dihitung rendemennya. Penelitian ini mendapatkan hasil ekstrak kasar daun binahong seberat 1,115 gram dengan rendemen 13,93% berwarna hijau kehitaman.

Rendemennya ekstraksi ultrasonik selama 20 menit pada penelitian ini mendapatkan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstraksi maserasi. Zulfa (2014) dan Putra (2019) yang mengekstraksi daun binahong dengan etanol 70% selama 48 jam menghasilkan 14,8% dan 15,5%. Hal ini dikarenakan waktu yang digunakan dalam ekstraksi ultrasonik hanya 20 menit dibandingkan dengan ekstraksi maserasi selama 48 jam. Semakin lama waktu ekstraksi, maka rendemennya akan tinggi karena interaksi antara pelarut dan bahan itu semakin lama bereaksi sehingga proses penetrasi pelarut ke dalam sel bahan semakin baik. Lamanya interaksi tersebut mengakibatkan banyaknya senyawa pada bahan yang berdifusi keluar sel sehingga banyak yang terekstrak dan rendemen tinggi. Namun,

lamanya proses ekstraksi menggunakan ultrasonik dapat merusak senyawa pada bahan akibat adanya pemanasan yang ditimbulkan dari ultrasonik, khususnya pada senyawa yang rentan terhadap panas. Maka dari itu, penggunaan ekstraksi ultrasonik harus dengan pemilihan waktu dan penanganan yang tepat guna mencegah rusaknya senyawa pada bahan.

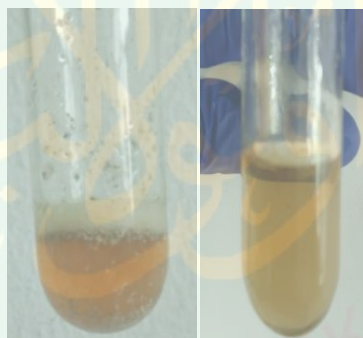
Ekstrak kasar dilanjutkan ke proses fraksinasi untuk memisahkan senyawa flavonoid yang terkandung menggunakan pelarut etil asetat dan air (1:1). Etil asetat ialah pelarut semi polar yang bisa mengambil senyawa semi polar seperti flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah kecokelatan ketika ditambahkan HCl dan serbuk magnesium. Markham (1988) mengatakan etil asetat dapat mengikat flavonoid yang mempunyai kepolaran rendah, antara lain flavonol, isoflavon, dan flavanon. Maka dari itu, flavonoid jenis tersebut akan menghasilkan warna coklat kemerahan.

Tahap fraksinasi menghasilkan dua fase larutan yang tidak bercampur karena memiliki densitas yang berbeda. Lapisan atas ialah lapisan etil asetat dengan densitas sebesar  $0,902 \text{ g/cm}^3$  dan lapisan bawah ialah air dengan densitas  $0,998 \text{ g/cm}^3$ . Lapisan atas ditampung dan didiamkan hingga pelarutnya hilang. Lalu didapatkan fraksi sebesar 15,3% berwarna hijau muda. Penelitian Putra (2019) melakukan fraksinasi daun binahong dengan etil asetat dan n-heksana didapatkan rendemen 26,10% dan 11,62%. Hal yang sama dilakukan Andhini (2017) yang mendapatkan rendemen 19,56% untuk fraksi n-heksana, dan 26,46% untuk fraksi etil asetat. Rendemen etil asetat lebih besar daripada n-heksana menandakan banyak senyawa yang bersifat semi polar yang ditarik oleh etil asetat. Pada penelitian ini didapatkan rendemen fraksi etil asetat lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar

dikarenakan banyaknya senyawa dalam daun binahong yang terekstrak ke etil asetat bersifat semi polar. Selanjutnya ekstrak kasar dan fraksi etil asetat diuji kualitatif flavonoid dan sitotoksitas BSLT.

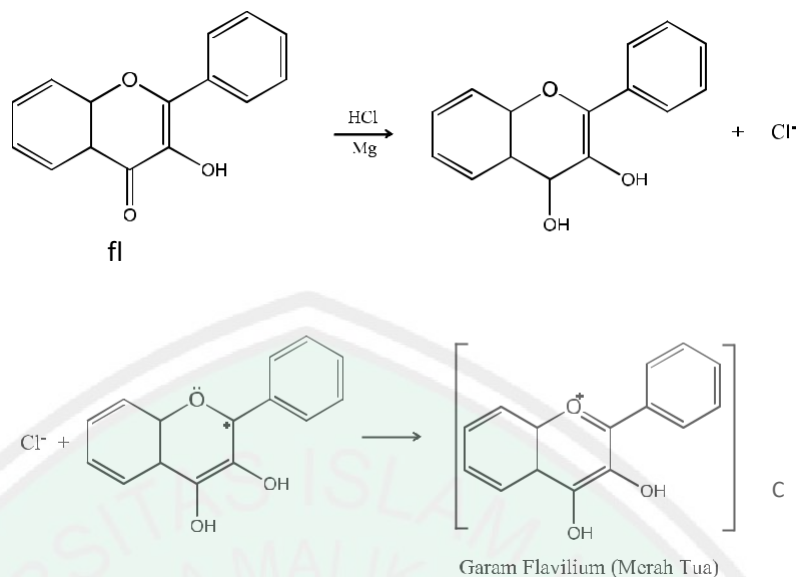
#### 4.4 Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Hasil uji kualitatif flavonoid dilakukan dengan mengambil 0,5 mL Selanjutnya sampel ditambahkan dengan 0,2 gram logam Mg dan 10 tetes HCl pekat. Penambahan HCl pekat dalam penelitian berguna untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak pekat etanol 70% dan fraksi etil asetat daun binahong positif mengandung flavonoid ditandai dengan adanya warna merah kecoklatan pada sampel. Hasil analisis kualitatif terlampir pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1** Hasil uji fitokimia ekstrak etanol 70% dan fraksi etil asetat

Hal tersebut terjadi karena senyawa golongan flavonoid bersifat polar jadi lebih larut dalam pelarut polar. Flavonoid yang bersifat polar dikarenakan flavonoid memiliki lebih dari satu gugus hidroksil (Harborne, 1987). Reaksi dugaan yang terjadi antara senyawa flavonoid dengan Mg dan HCl dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2** Reaksi dugaan antara senyawa flavonoid dengan Mg dan HCl (Harbone, 1987)

Polihidroksi dari flavon akan direduksi oleh logam magnesium dalam asam klorida pada larutan sampel. Sehingga membentuk garam benzopirilium yang berwarna merah hingga kecoklatan dengan sebutan garam flavilium. Warna yang dihasilkan dari proses fitokimia, akan menentukan golongan dari senyawa flavonoid yang terdeteksi. Flavonoid golongan auron, flavon, dan kalkon akan menghasilkan warna merah atau jingga, sementara golongan flavonol membentuk warna coklat kemerahan.

#### 4.5 Pemisahan Flavonoid dengan KLT Analitik dan KLT Preparatif

##### 4.5.1 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Analitik

KLT Analitik digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang bisa memisahkan senyawa flavonoid dengan baik. Eluen terbaik ialah eluen yang memisahkan senyawa dengan menghasilkan noda yang tidak berekor dan jarak antar satu noda ke noda lainnya tidak tumpang tindih. Eluen terbaik ini mampu

memisahkan senyawa flavonoid dalam daun binahong. Berikut beberapa eluen yang terbaik diharapkan dapat memisahkan senyawa flavonoid dari penelitian sebelumnya, diantaranya n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) (Pradana, 2014), metanol:aquades (6:4) (Putri, 2017), etil asetat:asam asetat:asam format:air (100:11:11:26) (Samirana, 2017), etanol:etil asetat:n-hexana (3:5:8) (Susmayanti, 2012), dan n-hexana:etil asetat (7:3) (Walida, 2016).

Sebelum elusi dilakukan proses penjenhuan eluen dengan menutup rapat bejana yang berisi 15 mL eluen. Penjenhuan bertujuan untuk menghilangkan uap air dan gas lainnya yang mengisi fase penyerap yang akan menghalangi laju eluen (Gandjar, 2007). Penjenhuan ini dilakukan selama 1 jam sebelum proses elusi. Penelitian ini menggunakan teknik elusi pengembangan menaik. Penotolan menggunakan sampel fraksi etil asetat pekat yang ditotol di plat silika sebanyak 10 kali. Penotolan harus berdiameter sekecil mungkin secara bertahap sambil dilakukan pengeringan 1 menit tiap totolan. Pengeringan berguna untuk mencegah penurunan resolusi dan bercak ganda (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pemisahan senyawa flavonoid terjadi dikarenakan terdapat perbedaan kepolaran antara fasa gerak berupa eluen dan fasa diam berupa plat silika. Proses elusi dihentikan jika eluen mencapai tanda batas atas. Hasil noda disemprot ammonia lalu diamati dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Pada panjang gelombang 254 nm, terjadi fluoresensi pada lempeng sedangkan noda sampel menghasilkan warna gelap. Hal tersebut karena interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Kemudian panjang gelombang 366 nm, noda akan berfluoresensi dan lempeng tampak gelap. Noda tersebut timbul karena adanya interaksi antara sinar UV 366



nm dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom pada noda. Hasil pemisahan senyawa flavonoid dengan berbagai eluen, antara lain:

**Tabel 4.1.** Data hasil pemisahan noda senyawa flavonoid dari eluen KLTA fraksi etil asetat daun binahong dengan beberapa variasi eluen di lampu UV 366 nm dengan pendeteksi amonia.

No.	Fasa gerak	Jumlah noda	Nilai Rf	Warna noda pada 366 nm	Dugaan Senyawa
1.	N-hexana:etil asetat (7:3)	6	0,53	Merah	-
			0,64	Merah	-
			0,72	Merah	-
			0,84	Merah	-
			0,92	Jingga	-
			0,98	Jingga	-
2.	Etanol:etil asetat:n-hexana (3:5:8)	2	0,51	Merah	-
			0,73	Merah muda	-
3.	Metanol:aquades (6:4)	4	0,60	Merah	-
			0,70	Merah	-
			0,79	Jingga	-
			0,92	Kuning	Flavonoid
4.	Etil asetat:asam asetat:asam format:air (100:11:11:26)	2	0,86	Jingga	-
			0,91	Jingga	-
5.	N-butanol:asam asetat:air (4:1:5)	3	0,7	Jingga	-
			0,91	Merah	-
			0,97	Kuning	Flavonoid

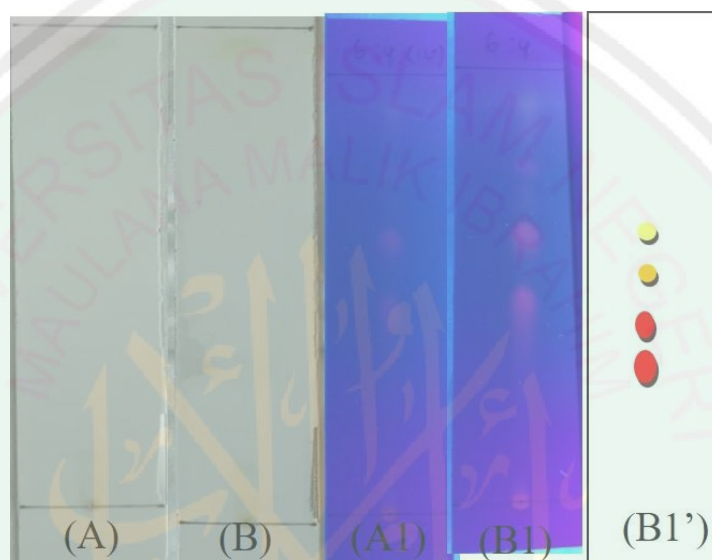
Data pada tabel 4.1 eluen campuran n-heksana:etil asetat (7:3) menghasilkan 6 noda dengan rentang rf 0,53—0,98. Warna noda pada eluen tersebut tidak mengalami perubahan apapun sebelum dan setelah disemprot reagen amonia dan nodanya melebar. Begitupula dengan eluen etanol:etil asetat:n-heksana (3:5:8) yang menghasilkan 2 noda berwarna merah dan merah muda pada rf 0,51 dan 0,73, yang tidak mengalami perubahan warna dengan noda melebar. Pemisahan dengan eluen etil asetat:asam asetat:asam format:air (100:11:11:26) didapatkan dua noda pada rf 0,86 dan 0,91 berwarna jingga. Namun, noda yang

dihasilkan cenderung melebar dan tidak membentuk pola totalan titik. Sehingga noda yang tidak mengalami perubahan saat disebut reagen, berarti tidak ditemukannya senyawa flavonoid. Noda yang mengandung flavonoid ditandai dengan warna kuning untuk flavon dan flavonol, biru untuk katekin dan antosianidin setelah diuapi amonia pada sinar UV 366 nm (Markham, 1988). Sementara pada sinar tampak, noda flavon dan flavonol terlihat warna kuning, antosianin terlihat warna kelabu atau biru, sedangkan kalkon dan auron berwarna merah jingga (Robinson, 1995).

Sementara itu untuk eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) didapatkan 3 noda dan diduga mengandung senyawa flavonoid pada rf 0,97. Akan tetapi, pemisahan pada eluen n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) ini membentuk pola noda yang berekor, serta melebar dengan warna noda yang tumpang tindih. Pemisahan senyawa flavonoid dengan eluen ini tidak sebgus dengan pemisahan menggunakan eluen metanol:aquades (6:4).

Eluen metanol:aquades (6:4) menunjukkan pemisahan paling baik dari eluen lainnya. Hasil elusi pada eluen tersebut menghasilkan 4 noda dengan rf sebesar 0,60-0,92. Spot yang mempunyai rf tinggi (diatas 0,55) diduga mengandung komponen flavonoid yang bersifat polar sama seperti sifat eluennya. Noda yang terbentuk pun membentuk pola titik, tidak berekor dan noda tidak tumpang tindih. Selain itu, noda pada plat KLT terjadi perubahan intensitas ketika disemprot amonia. Noda dengan rf 0,92 berubah warna dari kuning pucat menjadi kuning terang di bawah sinar UV 366 nm. Eluen yang dianggap lebih baik dalam proses pemisahan senyawa flavonoid, sesuai dengan spot yang dihasilkan dipaparan di atas. Hasil spot tersebut diperkuat dengan pernyataan Markham (1995) bahwa

pemisahan eluen terbaik akan menghasilkan noda yang tidak berekor, noda terpisah jelas dan mengalami perubahan setelah diberi reagen. Selain itu, setelah disemprot reagen, noda berubah warna menjadi kuning terang yang disetujui dengan pernyataan Koeriwa (2010) senyawa flavonoid menghasilkan berwarna kuning, hijau, dan jingga ketika disemprot amonia pada plat KLT.



**Gambar 4.3** Keterangan: (A) Hasil KLT sebelum disemprot amonia pada sinar tampak, (B) Hasil KLT setelah disemprot amonia pada sinar tampak, (A1) Hasil KLT sebelum disemprot amonia pada sinar UV 366 nm, (B1) Hasil KLT sesudah disemprot amonia pada sinar UV 366 nm, (B1') ilustrasi KLT.

Hasil KLT pada tabel 4.1 menunjukkan adanya senyawa flavonoid yang lebih baik dari eluen lainnya pada fase gerak metanol:aquades (6:4). Rf yang dihasilkan pun berbeda tergantung perbedaan struktur senyawa dan distribusi senyawa terhadap fasa gerak dan fasa diam. Noda yang memiliki nilai rf yang kecil akan terdistribusi dalam fasa diam sehingga rf nya kecil, jika rfnya besar maka terdistribusi dalam fasa gerak sehingga rfnya besar. Hal ini senada dengan

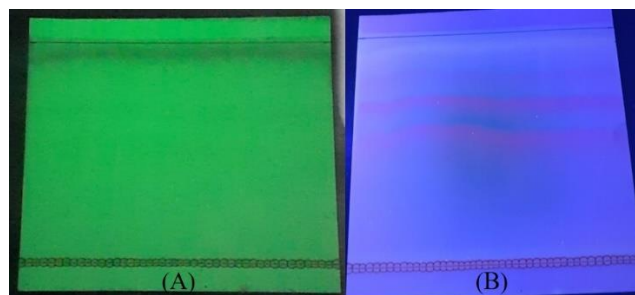
pernyataan Gandjar dan Rohman (2007) bahwa semakin dekat kepolaran senyawa fasa gerak dan senyawa, maka senyawa akan semakin terbawa oleh fasa gerak.

Adanya kesamaan sifat eluen yang polar seperti flavonoid ini, menghasilkan eluen yang terpisah dengan baik sesuai prinsip “like dissolve like” yang mampu menarik senyawa flavonoid pada fasa geraknya. Gambar 4.3 Hasil KLTA eluen terbaik sebelum dan sesudah disemprot amonia di bawah lampu UV 366 nm.

#### **4.5.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLT Preparatif (KLTP)**

KLT Preparatif (KLTP) dilakukan untuk mendapatkan isolat senyawa flavonoid. Proses isolasi KLTP didasarkan pada perbedaan daya serap, daya partisi, dan kelarutan dari komponen kimia yang terkandung akan bergerak mengikuti kepolaran eluen. Apabila daya serap adsorben dan komponen kimia tidak sama, maka komponen bergerak dengan kecepatan berbeda dan menyebabkan pemisahan (Munson, 2010). Penotolan pada KLTP dilakukan dengan 10 kali totalan pada plat silika G60 F<sub>254</sub> berukuran 10 x 20 cm. . Fasa gerak disebut pembawa, sementara fasa diam disebut penahan. Distribusi zat terlarut dalam dua fase disebut dengan koefisien distribusi (Wonoraharjo, 2013).

Pemisahan KLTP menggunakan eluen terbaik hasil KLTA, yakni metanol:aquades (6:4). Noda yang dihasilkan di plat KLTP menunjukkan 2 noda pada lampu UV panjang gelombang 254 nm, sedangkan pada panjang gelombang 366 nm menunjukkan 4 noda. Dugaan golongan senyawa yang muncul di panjang gelombang 254 nm dan 366 nm ialah flavonoid disajikan pada gambar dan tabel berikut.



**Gambar 4.4** (A) Hasil KLTP sebelum disemprot amonia pada sinar UV 366 nm, (B) Hasil KLTP setelah disemprot amonia pada sinar UV 366 nm.

**Tabel 4.2** Data hasil KLTP dengan campuran eluen metanol:aquades (6:4) di bawah lampu UV 254 nm sebelum dan sesudah disemprot amonia.

Isolat	Warna noda tanpa pendeteksi amonia	Warna noda dengan pendeteksi amonia	Dugaan flavonoid yang muncul
4	Hijau	Hijau tua	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Flavonol yang memiliki 3-OH bebas dan memiliki atau tidak mengandung 5-OH bebas, biasanya berasal dari dihidroflavonol.</li> <li>b. Beberapa 6 atau 8OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O yang mengandung 5-OH</li> <li>c. Isoflavon, dihidroflavon, biflavonil, atau flavonon yang memiliki 5-OH</li> <li>d. Khalkon yang mempunyai 2'- atau 6'-OH namun tidak mempunyai 2- atau 4-OH bebas</li> </ul>
3	Tidak berwarna	Hijau	<ul style="list-style-type: none"> <li>e. Flavonol yang memiliki 3-OH bebas dan memiliki atau tidak mengandung 5-OH bebas, biasanya berasal dari dihidroflavonol. (Markham, 1988)</li> </ul>

**Tabel 4.3** Data hasil KLTP dengan campuran eluen metanol: aquades (6:4) di bawah lampu UV 366 nm sebelum dan sesudah disemprot amonia.

Isolat	Warna noda tanpa pendeteksi amonia	Warna noda dengan pendeteksi amonia	Dugaan flavonoid yang muncul
1	Merah	Merah	-
2	Merah	Merah	-
3	Jingga redup	Jingga redup	-
4	Kuning redup	Kuning terang	a. Flavonol yang memiliki 3-OH bebas dan memiliki atau tidak mengandung 5-OH bebas, biasanya berasal dari dihidroflavonol. (Markham, 1988)

Berdasarkan tabel 4.2 dan 4.3 diduga isolat ke 4 mengandung senyawa flavonoid dengan warna kuning redup sebelum diberi pendeteksi amonia dan berubah menjadi kuning terang setelah diberi pendeteksi amonia. Warna yang lebih kontras dari warna sebelumnya, dikarenakan adanya kromofor yang khas, yaitu C=O, -O-, dan C=C pada senyawa flavonoid. Kromofor pada senyawa flavonoid tersebut mengakibatkan adanya transisi elektronik  $n \rightarrow \pi^*$  yang menunjukkan keberadaan kromofor khas tersebut. Pada transisi ini pula ditunjukkan bahwa senyawa yang terserap pada plat KLT bersifat polar dan pelarut yang mengikat hidrogen berinteraksi kuat dengan pasangan yang mempunyai elektron bebas. Hal inilah yang menyebabkan adanya peningkatan intensitas warna pada plat KLT yang awalnya kuning redup menjadi kuning terang, yang menandakan amonia dapat memberi sensitivitas yang lebih tinggi. Hal ini sama dengan penelitian sebelumnya dilakukan Rahmawati (2013) yang mengisolasi

3,5,3',4-tetrahydroxiflavonol dan noda di plat KLTnya berflouresensi kuning saat di sinar UV 366 nm pada daun binahong.

Isolat 4 yang diduga flavonoid dikerok dan dilarutkan dalam etil asetat sebanyak 4 mL. Setelah itu divortex selama 15 menit bertujuan untuk menghomogenkan pelarut etil asetat dengan senyawa flavonoid yang terserap pada silika gel. Pemisahan silika gel dan senyawa flavonoid dilakukan dengan cara sentrifugasi untuk mengendapkan silika gel. Filtrat hasil sentrifugasi ditampung dalam botol vial dan pelarut diangin-anginkan untuk mendapatkan isolat padat. Dalam penelitian ini didapat isolat flavonoid sebanyak 4 mg untuk diidentifikasi senyawa flavonoid menggunakan instrumen FTIR dan spektrofotometer UV-Vis.

#### **4.6. Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dengan Metode BSLT**

##### **4.6.1 Penetasan Larva Udang**

Penetasan larva udang *Artemia salina Leach* ditetaskan dalam air laut dibantu dengan aerator dan penerangan guna memasok oksigen (Panggabean, 1984). Larva akan menetas dalam waktu 48 jam dan bisa digunakan untuk pengujian toksisitas karena hewan uji sudah terbentuk mulut. Senyawa uji akan masuk dan toksik ke dalam tubuh hewan uji melalui media mulut dan kulit. *Artemia* yang baru menetas disebut nauplius yang berwarna oranye, berbentuk lonjong dengan panjang 400 mikron.

##### **4.6.2 Uji Toksisitas**

Uji toksisitas menggunakan BSLT ialah metode untuk mengetahui sifat toksik darisenyawa yang diuji menggunakan larva *Artemia salina Leach*. Penentuan sifat toksik senyawa tersebut dilihat dari nilai LC<sub>50</sub> dimana terjadinya kematian

sebesar 50% pada hewan uji. Pada penelitian ini, sampel yang akan diuji adalah ekstrak kasar etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat hasil KLTP.

Konsentrasi yang digunakan adalah 31,25; 62,5; 125; 250 dan 500 ppm serta DMSO tanpa pelarut sebagai kontrol. Pengujian dilakukan sebanyak 5 kali guna memperoleh hasil yang akurat. DMSO mempunyai gugus S=O bersifat polar dan dua alkil -CH<sub>3</sub> bersifat kurang polar. Gugus polar akan melarutkan air laut, sementara gugus yang kurang polar akan melarutkan ekstrak yang bersifat kurang polar. Sampel sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 100 µL DMSO dan diencerkan dengan air laut hingga larut. Sampel dimasukkan ke dalam plat uji bersamaan dengan memasukkan 10 hewan uji. Kemudian didiamkan di udara terbuka selama 24 jam dan amati berapa hewan uji yang mati.

**Tabel 4.4** Hasil uji toksisitas ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat 4 menggunakan metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Modus larva yang mati (ekor)			% Mortalitas		
	Ekstrak	Fraksi	Isolat	Ekstrak	Fraksi	Isolat
Kontrol	0	0	0	0	0	0
31,25	7	8	3	70	80	30
62,5	6	8	6	60	80	60
125	8	10	9	80	100	90
250	8	9	9	80	90	90
500	10	9	10	100	90	100

Dari data tabel di atas menunjukkan bahwa nilai modus dengan kematian tertinggi terjadi pada konsentrasi 500 ppm. Senyawa metabolit sekunder tersebut masuk ke dalam tubuh *Artemia* melalui mulut dan kulit. Senyawa metabolit sekunder akan menghambat enzim RNA polymerase dalam pemutusan rantai DNA. Hal ini akan menyebabkan tidak berlangsungnya sintesis protein sebagai sumber energi larva udang. Lalu, membran protein integral pada sel larva akan berikatan



dengan gugus OH milik flavonoid yang menyebabkan adanya transport ion oleh  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  yang sulit dihentikan ke dalam sel. Maka, proses transport ion menjadi sulit terkendali dan menyebabkan membran sel *Artemia* pecah dan mengalami kematian.

Hasil analisis probit toksisitas disajikan pada table 4.5

**Tabel 4.5** Nilai toksisitas sampel ekstrak, fraksi, dan isolat 4 pada daun binahong

Larutan uji	Nilai $\text{LC}_{50}$ (ppm)
Ekstrak etanol 70%	56,721
Fraksi etil asetat	28,954
Isolat 4 flavonoid	24,371

Parameter yang bisa dilakukan untuk mengetahui kemampuan toksik dari suatu sampel ialah nilai  $\text{LC}_{50}$ . Nilai  $\text{LC}_{50}$  memberi petunjuk bahwa pemberian senyawa pada konsentrasi tertentu akan mematikan 50% dari jumlah total larva udang. Menurut Ningdiyah, dkk, (2015), nilai  $\text{LC}_{50}$  menandakan sifat sangat toksik ketika hasilnya  $<30$  ppm, bersifat toksik jika hasilnya  $31\text{—}1000$  ppm dan bersifat tidak toksik jika hasilnya  $>1000$  ppm. Pada penelitian ini didapatkan nilai probit yang dihasilkan dari ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat, dan isolat 4 flavonoid berturut-turut  $\text{LC}_{50}$  56,721 ppm, 28,954 ppm, dan 24,371 ppm.

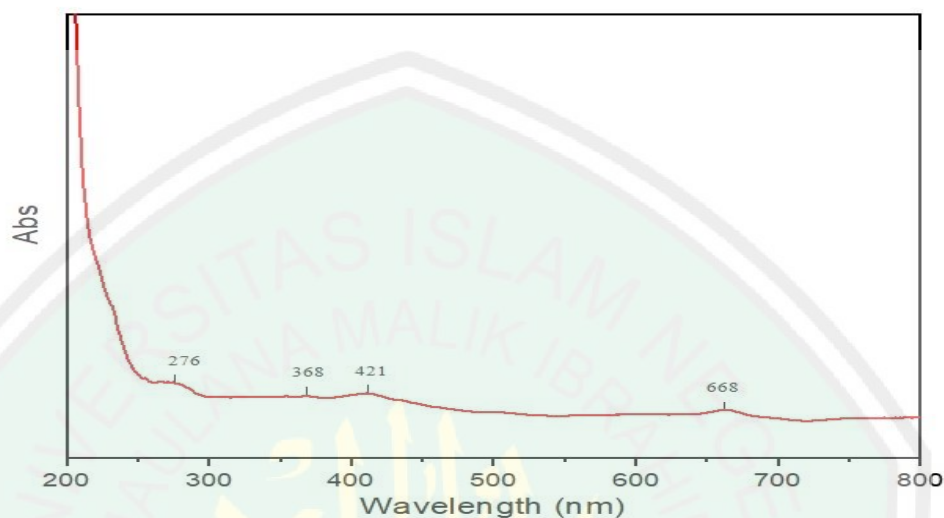
Nilai  $\text{LC}_{50}$  pada ekstrak etanol 70% hasil ekstraksi ultrasonik, masuk dalam kategori toksik, yakni 56,721 ppm. Hasil  $\text{LC}_{50}$  dengan ekstraksi ultrasonik lebih toksik dibandingkan ekstraksi menggunakan ekstraksi maserasi. Hal itu terbukti pada penelitian Surbakti (2018) yang menggunakan ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 70% pada daun binahong mendapatkan  $\text{LC}_{50}$  sebesar  $97,797 \mu\text{g/mL}$ . Hal ini dapat dikatakan bahwa  $\text{LC}_{50}$  hasil ekstraksi ultrasonik lebih rendah dan lebih toksik dari  $\text{LC}_{50}$  hasil ekstraksi maserasi. Kemudian waktu yang dibutuhkan lebih singkat daripada ekstraksi maserasi.

Hasil  $LC_{50}$  untuk fraksi etil asetat dan isolat 4 pada tabel termasuk dalam kategori sangat toksik, yaitu 28,954 ppm, dan 24,371 ppm. Hasil penelitian sebelumnya masih menggunakan ekstraksi maserasi, dan mendapatkan nilai  $LC_{50}$  32,06 ppm pada fraksi etil asetat dan 24,74 ppm pada isolat flavonoid daun binahong 8-Glucopyranosyl-4',5,7-trihydroxyflavone (Djamil, 2012). Berdasarkan hasil penelitian terdahulu, terbukti bahwa ekstraksi ultrasonik dapat memberikan nilai  $LC_{50}$  yang lebih toksik dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi yang nilai  $LC_{50}$  dapat dilihat pada tabel 4.5. Dari hasil penelitian ini terbukti walaupun rendemen dari ekstraksi ultrasonik yang didapatkan lebih rendah, namun menghasilkan toksisitas yang baik. Hal ini dikarenakan ekstraksi ultrasonik memanfaatkan amplitudo ultrasonik yang melewati sampel dan memecahkan gelembung kavitasi di permukaan membran bahan sehingga mampu menarik senyawa flavonoid lebih cepat dan banyak. Senyawa yang terekstrak pun sudah mencapai batas optimum yakni dengan lama ekstraksi selama 20 menit, dilihat dari nilai  $LC_{50}$  yang lebih baik dibandingkan dengan metode ekstraksi maserasi. Nilai  $LC_{50}$  yang semakin kecil pada suatu sampel bisa dikembangkan menjadi obat alternatif untuk sel kanker.

#### **4.7 Identifikasi Isolat 4 menggunakan Spektrofotometer UV-Vis**

Instrumen spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengidentifikasi jenis flavonoid yang terkandung dalam isolat flavonoid hasil KLTP. Penggunaan instrumen ini sebagai data awal untuk mengetahui kandungan senyawa yang dilihat dari serapan panjang gelombang yang dihasilkan pada spektra. Spektra akan menghasilkan serapan pada panjang gelombang tertentu akibat adanya transisi elektronik. Pada penelitian ini dilakukan identifikasi isolat 4 flavonoid hasil KLTP

pada panjang gelombang 200—800 nm. Hasil spektra menunjukkan bahwa isolat 4 tersebut memiliki empat panjang gelombang maksimum antara lain, 276; 368; 421 dan 668 nm seperti pada gambar 4.5



**Gambar 4.5** Hasil analisa isolat 4 dengan instrumen UV-Vis

Pita hasil UV-Vis menunjukkan panjang gelombang 276 nm, yang menunjukkan adanya serapan benzil karena berada pada rentang 250—280 nm. Pada pita di 276 nm juga menunjukkan gugus utama berupa flavonol 3-OH bebas, yang mengakibatkan adanya kromofor C=O dan C=C dari gugus aromatik terkonjugasi. Sehingga kromofor tersebut menyebabkan terjadi transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$ . Kemudian pada pita yang menunjukkan panjang gelombang 368 nm, berada pada rentang 300—560 nm. Rentang tersebut terjadinya adanya transisi elektron-elektron yang tidak berikatan ke orbital anti ikatan  $n \rightarrow \pi^*$  oleh suatu gugus C=O.

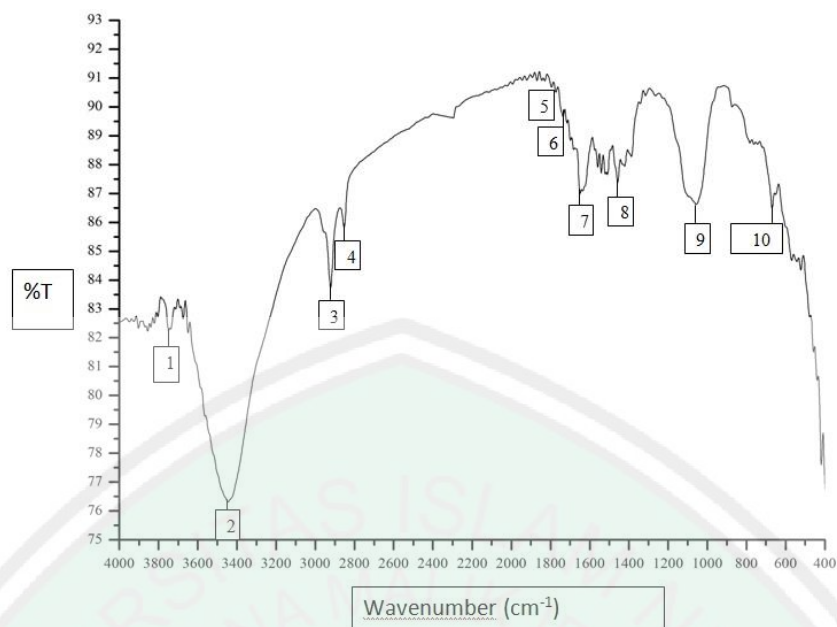
Hal ini sesuai dengan penelitian Zirconia (2015) yang mengidentifikasi senyawa flavonol pada kembang bulan menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan hasil 365 nm (pita I) dan 280 nm (pita II). Pada panjang gelombang 280

nm memiliki transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$  sedangkan pada panjang gelombang 365 nm memiliki transisi  $n \rightarrow \pi^*$ . Setelah dikonfirmasi menggunakan pereaksi geser, hasil UV-Vis tersebut menunjukkan adanya senyawa flavonoid 5,7,8,3',4' pentahidroksiflavanonol atau 5,6,7,3',4' pentahidroksiflavanonol.

Adapun dua serapan lainnya pada 421 nm dan 668 nm. Pada panjang gelombang 421 nm diduga adanya golongan flavonoid jenis auron, yang menunjukkan transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  antara orbital ikatan atau orbital pasangan elektron bebas dan orbital anti-ikatan yang memerlukan energi rendah. Hal ini senada dengan penelitian Rissanti (2014) yang mendapatkan serapan UV-Vis pada panjang gelombang 421,5 nm untuk isolat auron. Lalu, daerah serapan panjang gelombang 668 nm diduga adanya serapan dari klorofil yang masih terkandung pada sampel. Hal ini sesuai dengan ungkapan Harborne (1987) apabila ditemukan serapan pada panjang gelombang di atas 625 nm, maka mengidentifikasi adanya klorofil.

#### 4.8 Identifikasi Isolat 4 menggunakan FTIR

Proses identifikasi menggunakan FTIR didasarkan pada vibrasi oleh tiap gugus fungsi yang akan memberikan informasi tentang dugaan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat. Gugus fungsi bisa diketahui dari hasil bilangan gelombang yang terdeteksi dari masing-masing gugus yang bervibrasi ketika dikenai sinar inframerah. Hasil isolat 4 flavonoid dihaluskan menggunakan mortal agate dan ditambah garam KBr sebagai *background*. Kemudian dilakukan pengepresan pada tekanan 80 torr dengan waktu 10 menit, lalu didapatkan pelet tipis untuk dianalisa dalam FTIR. Hasil spektra FTIR disajikan pada Gambar 4.6.



**Gambar 4.6** Hasil analisa isolat 4 dengan instrumen FTIR

**Tabel 4.6** Interpretasi spektra FTIR isolat 4 flavonoid

No	Bilangan gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Referensi Bilangan Gelombang	Jenis vibrasi
1	3648,758	3450—3700 (a)	O-H tanpa ikatan hidrogen,
2	3444,802	3550—3250 (b)	O-H beikatan hidrogen, ulur (alkohol)
3	2922,041	3000—2800 (a)	C <sub>sp</sub> <sup>3</sup> -H, ulur, asimetris (alkana)
4	2854,489	2962—2850 (b)	C-H, ulur, simetri (alkil)
5	2000—1851	2000—1650 (b)	<i>Overtone</i> aromatik
6	1739,535	1750—1735 (b)	C=O, ulur (karbonil)
7	1649,276	1667—1640 (b)	C=C, ulur nonkonjugasi
8	1457,361	1480—1440 (a)	C-H pada CH <sub>2</sub> tekuk guntingan
9	1055,623	1230—1000 (a)	C-O ulur (alkohol 1°)
10	669,026	1000—650 (b)	C-H tekuk keluar bidang (alkena)

Keterangan: (a) Sacrotes, 1994, (b) Shriner, dkk., (2014)

Gambar 4.6 menunjukkan hasil identifikasi serapan yang muncul pada isolat 4 daun binahong dengan instrumen FTIR. Terdapat serapan O-H dengan vibrasi ulur tanpa ikatan hidrogen pada bilangan gelombang 3648,753 cm<sup>-1</sup>. Kemudian terdapat vibrasi ulur yang melebar dan landai di daerah bilangan gelombang

3444,802  $\text{cm}^{-1}$  diduga gugus O-H alkohol pada flavonoid. Adapun serapan ulur  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  asimetris yang diduga gugus fungsi alkana pada 2922,041  $\text{cm}^{-1}$ , dan diikuti serapan C-H ulur simetri untuk gugus metil  $\text{CH}_2$  pada bilangan gelombang 2854,489  $\text{cm}^{-1}$ . Dugaan ini diperkuat oleh serapan yang muncul pada daerah panjang gelombang 1457,361  $\text{cm}^{-1}$  yang merupakan CH pada  $\text{CH}_2$  tekuk guntingan dan 669,026 yakni C-H tekuk keluar bidang untuk gugus alkena. Kemudian pada rentang bilangan gelombang 2000—1851  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan daerah *overtone* berintensitas lemah berguna sebagai penentuan substitusi cincin pada struktur aromatik flavonoid. Daerah *overtone* tersebut menunjukkan ciri khas senyawa aromatis yang didukung pula dengan serapan C=C ulur non konjugasi pada bilangan gelombang 1649,276  $\text{cm}^{-1}$ . Pada daerah 1739,535  $\text{cm}^{-1}$  didapatkan vibrasi ulur gugus C=O diduga mengandung karbonil yang merupakan gugus fungsi khas dari senyawa flavonoid, baik keton maupun ester. Serapan lainnya ditemukan pada Selain itu didapatkan serapan pada 1055,623  $\text{cm}^{-1}$  yang diduga C-O bervibrasi ulur alkohol primer yang mana gugus O-H terletak pada atom karbon C primer. Hasil interpretasi dari FTIR ini, ditemukan gugus karbonil C=O pada 1739,535  $\text{cm}^{-1}$  yang mengidentifikasi bahwa senyawa isolat yang terkandung merupakan dugaan golongan flavonoid.

Hal ini didukung dengan penelitian Putra (2019) yang menemukan flavonol pada daun binahong yang memiliki gugus =C-H aromatik (846 dan 790  $\text{nm}^{-1}$ ), O-H (3558  $\text{nm}^{-1}$ ), C-O alkohol primer (1045  $\text{nm}^{-1}$ ), dan C-H ulur alkana dan alkil (2989 dan 2875  $\text{nm}^{-1}$ ). Adapun penelitian terdahulu yang mengidentifikasi flavonoid yang dikonfirmasi menggunakan FTIR, GC-MS, H-NMR, dan C-NMR didapatkan hasil FTIR gugus -OH (3347  $\text{nm}^{-1}$ ), C-H alifatik (2973 dan 2880  $\text{nm}^{-1}$ ),

C=O ( $1655 \text{ nm}^{-1}$ ), C=C ( $1453 \text{ nm}^{-1}$ ), C-O ( $1082 \text{ nm}^{-1}$ ), dan C-C ( $879 \text{ nm}^{-1}$ ) menunjukkan adanya senyawa flavonoid jenis quersetin (5,7,3'4' tetrahidroksi flavonol) (Umaru, 2020). Berdasarkan hasil interpretasi FTIR dan beberapa literatur, isolat yang terkandung dalam daun binahong di penelitian ini diduga flavonoid yang mengandung gugus O-H berikatan dan tidak berikatan dengan hidrogen, C-H ulur untuk alkana dan alkil, C=O ulur (karbonil), C=C ulur non konjugasi, C-O alkohol primer, dan C-H tekuk untuk alkena, serta terdapat daerah *overtone*.

#### 4.9 Kajian Hasil Penelitian dalam Perspektif Islam

Tumbuhan binahong yang telah diteliti dalam penelitian ini menunjukkan adanya sifat toksik yang dilihat dari nilai  $LC_{50}$ . Nilai  $LC_{50}$  setiap sampel uji pun hasilnya berbeda-beda, ekstrak etanol 70% menghasilkan 47,268 ppm, fraksi etil asetat 28,954 ppm dan isolat 4 56,721 ppm. Menurut Lestari (2015) nilai  $LC_{50}$  dibawah 100 ppm dapat dikategorikan toksik dan bisa diuji lebih lanjut sebagai agen antikanker.

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضَ فِي أَرْوَاحٍ رَوَّاسِيٍّ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung di bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu. Dan Dia mengembangbiakkan segala jenis binatang dan Kami juga menurunkan hujan dari langit, kemudian Kami menumbuhkan pada mereka (makhluk Allah SWT) bermacam-macam tumbuhan yang baik,” (Q.S. Luqman: 10).

Menurut tafsir Al-Misbah dikatakan bahwa Allah SWT telah menciptakan langit yang sangat tinggi tanpa tiang menjulang. Allah SWT menaruh gunung yang begitu kuat untuk berada di bumi ini sebagai tempat tinggal yang kuat dan makhluk-

Nya tidak akan tergoncang. Tidak hanya itu, Allah SWT juga mampu menurunkan hujan, mengembangbiakan beragam binatang, dan menumbuhkan segala tumbuhan yang baik (Shihab, 2002). Tumbuhan yang dimaksud baik salah satunya binahong yang memiliki banyak metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin ini bisa memberikan manfaat sebagai pengobatan alternatif.

Metabolit sekunder dari daun binahong tersebut diekstraksi dengan alat teknologi ultrasonik sehingga proses pengambilan metabolit sekunder khususnya flavonoid, berjalan optimal. Dalam Al-Qur'an, perkembangan teknologi sudah tercantum dan bermanfaat sebagai kebutuhan manusia yang lebih cepat dan hasilnya baik. Hal itu bisa dilihat dari surah An-Anbiya ayat 80—81, yang berbunyi:

وَعَلَّمْنَاهُ صَنْعَةَ لَبُوسٍ لَّكُمْ لِيُحْصِنَكُمْ مِنْ بَأْسِكُمْ ۖ فَهَلْ أَنْتُمْ شَاكِرُونَ (٨٠) وَلِسُلَيْمَانَ الرِّيحَ عَاصِفَةً تَجْرِي بِأَمْرِهِ إِلَى الْأَرْضِ الَّتِي كُنَّا فِيهَا وَكُنَّا بِكُلِّ شَيْءٍ عَالِمِينَ (٨١)

Artinya: “Dan telah Kami ajarkan kepada Daud membuat baju besi untuk kamu, guna memelihara kamu dalam peperanganmu; Maka hendaklah kamu bersyukur (kepada Allah), Dan (telah Kami tundukkan) untuk Sulaiman angin yang sangat kencang tiupannya yang berhembus dengan perintahnya ke negeri yang kami telah memberkatinya. Dan adalah Kami Maha Mengetahui segala sesuatu.”

Firman Allah SWT dalam Al-Qur'an telah tercantum pada potongan ayat di atas yang menggambarkan teknologi berkembang untuk melindungi manusia. Peralatan perang yang dikenakan Daud AS seperti topi besi, baju anti peluru, dan sebagainya menjadi pelindung diri dalam peperangan agar berhasil dan menjaga umatnya. Perkembangan teknologi disini menjadi bukti bahwa semakin bertambahnya tahun maka teknologi akan berkembang untuk kesejahteraan manusia. Hal tersebut serupa dengan penelitian ini yang menggunakan alat teknologi terbaru yakni alat ultrasonik sebagai metode ekstraksi yang mendapatkan



nilai  $LC_{50}$  lebih toksik pada uji toksisitas. Hasil penggunaan alat ultrasonik yang lebih baik dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional, mampu menjadi pertimbangan peneliti selanjutnya untuk memilih alat tersebut agar hasilnya optimal. Nilai  $LC_{50}$  yang toksik tersebut bisa digunakan sebagai data awal untuk meneliti semua ciptaan Allah SWT dan menghasilkan ilmu baru, sehingga bermanfaat bagi seluruh makhluk ciptaan Allah SWT.



## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari hasil penelitian ini, adalah:

1. Ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan isolat 4 flavonoid dari daun binahong memperoleh nilai  $LC_{50}$  berturut-turut sebesar 56,721, 28,954 dan 24,371 ppm. Nilai  $LC_{50}$  untuk ekstrak etanol 70% termasuk toksik, sementara untuk fraksi etil asetat dan isolat 4 flavonoid termasuk sangat toksik.
2. Hasil identifikasi isolat 4 flavonoid daun binahong hasil KLTP dengan instrumen spektrofotometer UV-Vis serapan panjang gelombang 668 nm, 421 nm, 368 nm, dan 276 nm. Kemudian identifikasi FTIR menunjukkan bahwa isolat daun binahong mengandung dugaan senyawa flavonoid yang memiliki gugus fungsi O-H, O-H, C-H alkana, C-H alkil, C=O karbonil, C=C nonkonjugasi, daerah aromatik *overtone* C-H pada  $CH_2$ , C-OH primer, dan C-H alkena.

#### 5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukan penelitian isolasi senyawa flavonoid pada daun binahong dengan metode pemisahan KLT menggunakan alat penotol KLT agar bentuk nodanya konstan. Kemudian, untuk identifikasi senyawa dengan UV-Vis bisa ditambah pereaksi geser, instrumen LC-MS/MS, H-NMR, agar mengetahui senyawa dengan jelas. Selain itu, sampel daun binahong dapat dilanjutkan dengan penelitian antikanker payudara, kolon, heLa dan sebagainya karena mengandung nilai  $LC_{50}$  yang toksik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, V. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Euchema Cottoni*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ardianti, A. dan Kusnadi, J. 2014. Ekstraksi Antibakteri dari Daun Berenuk (*Crescentia cujete* Linn.) Menggunakan Metode Ultrasonik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2): 28-35.
- Astuti, S.M. 2011. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibiotika Ekstrak Daun, Batang, Bunga dan Umbi Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*). *Skripsi*. Universitas Kejutaraan Malaysia.
- Astuti, S.M. 2011. *Determination of Saponin Compound from Anredera cordifolia to Potential Treatment for Several Disease*. Vol. 3. No. 4. Pp 224-232.
- Budaraga, I.K., Armin, M.Y., dan Bulanin, U. 2016. Toxicity of Liquid Smoke Cinnamon (*Cinnamomum Burmanni*) Production of Ways for Purification and Different Concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(7): 13-21.
- Burdall, S.E., Hanby, A.M., Lansdown, M.R., dan Speirs, V. 2003. Breast cancer cell lines : friend or foe. *Breast Cancer Research*, 5, 89-95.
- Cameron, D.K., Wang, Ya-Jane. 2006. Application of Protease and High-Intensity Ultrasound in Corn Starch Isolation from Degermed Corn Flour. *Journal Food Science University of Arkansas*, Vol 83(5): 505-509.
- Carlos, Martinez Perez., Carol Ward., Graeme Cook., Petter Mullett. 2014. Novel Flavonoid as Anti-cancer Agents: Mechanism of Action and Promise for Their Potential Application in Breast Cancer. *The Author Journal Compilation*, 42(1): 1017-1023.
- Chapdelaine JM. 2001. *MTT Reduction- A Tetrazolium- Based Colorimetric Assay for Cell Survival and Proliferation*, Application Note 5, MAXlineTM.
- Converse, R. H., R.R Martin. 1990. *Elisa Methods for Plants Viruses*. A Laboratory Manual: APS Press.
- Crowther, J.R. 2001. *The ELISA Guide Book Methods in Molecular Biology*. The International Atomic Energy Agency. Vienna. Austria. Humana Press Inc Totawa, New Jersey.
- Damanhuri, E. dan Padmi. (2004). *Diktat Pengelolaan Sampah*. Teknik Lingkungan Institut Teknologi Bandung (ITB). Bandung.
- Demam, M. John. 1997. *Kimia Makanan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung Press.

- Dermawan, R. 2012. Metode Analisis Uji Warna Senyawa Metabolit Sekunder. *Makalah Kimia Organik Analisis*. Makasar: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Djamil, Ratna. 2012. Isolasi dan Penentuan Struktur Serta Uji Bioaktivitas Senyawa Kimia dari Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Disertasi*. Universitas Indonesia.
- Djamil, Ratna., Wiwi Winarti., Ernie. 2009. Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Fase n-Butanol dari Ekstrak Metanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia*). *Jurnal Ilmiah ISFI*, 1(1): 1-5.
- Djamil, Ratna., Wahyudi P.S., Wahono., M. Hanafi. 2012. Antioxidant Activity of Flavonoid *Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis Leaves. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(9): 241-243.
- Effendy. 2007. *Kimia Koordinasi Jilid I*. Malang: Universitas Negeri Malang Press.
- Ergina., Siti Nuryanti., dan Indarini Dwi Pursitasari. 2014. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) yang Diekstraksi dengan Pelarut Air dan Etanol. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3): 165-172.
- Fattah, A.b.A.b.A., *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW*. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Gandjar, I.G., Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R.J., Bobbit., dan Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Penerjemah Kosasih Padmawinta. Bandung: ITB Press.
- Guether, E. 2006. *Minyak Atsiri*. Jakarta: Penerbit UI.
- Handayani, Hanadkk. 2016. Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Rasio Bahan;Pelarut Dan Lama Ekstraksi).*Jurnal Pangan dan Argoindustri* Vol.4 No.1 p.262-272.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan: Padmawinata K, dan Soedira, I. Bandung: ITB Press.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Hidayati, Nita Yulia., Ana Medawati, Supriatno. 2015. Potensi Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Binahong(*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) Terhadap Proliferasi Sel Kanker Lidah Manusia (SP-C1). *Jurnal Biomedik Pendidikan Dokter*.
- Jazilah, Nur. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*

(Tenore) Steens.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Kelvin J.F ., Tyson L.B. 2011. *Seratus Tanya Jawab Mengenai Gejala Kanker dan Efek Samping Pengobatan Kanker*. Jakarta: PT. Indeks.
- Khacha-ananda, Supakit., Kharjornsak Tragoolpua., Panuwan Chantawannakul Yingmanee Tragoolpua. 2013. Antioxidant and Anti-cancer Cell Proliferation Activity of Propolis Extracts from Two Extraction Methods. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 14(11): 6991-6995.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.
- Kurniasih, Nunung., Mimin Kusmiyati., Nurhasanah., Riska Puspita Sari., Riza Wafdan. 2015. Potensi Daun Sirsak (*Annona Muricata Linn*), Daun Binahong (*Anredera cordifolia*), dan Daun Benalu Mangga (*Dendrophloe petandra*) sebagai Antioksidan Pencegah Kanker. *Jurnal Kimia*, 9(1): 162-183.
- Kusnadi., Egi Triana Devi. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolous L.*) dengan Metode Refluks. *Pancasakti Science Education Journal*, 1(1): 56-67.
- Landers ES., Linton LM., Birren B., Nusbaum C., Zody MC., Baldwin J. 2001. Initial Sequencing and Analysis of The Human Genome. *Nature Journal*, 409(6822): 1304-1351.
- Latifah. 2015. Identifikasi Golongan Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Rimpang Kencur *Kaempferia galanga L.* Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lestari, Dwi., Rudi Kartika., Eva Marliana. 2019. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* Umbi Bawang Tiwai dan Uji Toksisitas Akut Fraksi Aktif. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*, 1(1): 1-9.
- Lidnilla, Nida Ghania. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) Terhadap Penurunan Kadar Asam Urat dalam Darah Tikus Putih Jantan yang Diinduksi dengan Kafeina. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Luanpitpong, S., Rojanasakul, Y. 2012. *Understanding and Managing Chemotherapy Side Effects*. New York: Cancer Care Inc.
- Manoi, Feri. 2009. Binahong (*Anredera cordifolia*) Sebagai Obat. *Warta Penelitian dan Pengembangan Jurnal*, 15(1): 3-6.
- Markham, KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB Press.

- Meiyanto, M., Kudo, G., Lee, Y., Yang, T.J., Gelboin, H.V., dan Gonzales, F.J. 1999. Targeted Disruption of the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 274. 23963-23968.
- Miladiyah, Isnatin., Bayu Rizki Prabowo. 2012. Ethanolic Extract of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis Leaves Improved Wound Healing in Guinea Pigs. *Universa Medicina*, Vol 31(1): 4-11.
- Mojo, Triyono., Kajian Toksisitas Fraksi N-Heksana, Etil Asetat dan Etanol Daun Soyogik (*Sauria bracteosa DC*). *Jurnal MIPA Unsrat*, 5(1): 41-43.
- Mosman, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Method*, 16(1-2): 55-63.
- Nelson., Yusnelti., H. Amanda. 2019. Identifikasi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Basella Alba Linn*) dan Uji Sitotoksik dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*. *Seminar Nasional AvoER*, 1(1): 590-593.
- Ningdyah, A.W., Alimuddin, A.H., Jayasuka. 2015. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Pandanus conoideus Lamk*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Novianti, Nurlisa Dwi. 2012. Isolasi dan Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Jambo-jambo (*Kjelbergiodendron celebicus* (Koord) Merris). *Skripsi*. Universitas Indonesia.
- Pariyana., Irsan Saleh., Suryadi Tjekyan., Hermansyah. 2016. Efektivitas Pemberian Ekstrak Daun Binahong Terhadap Ketebalan Jaringan Granulasi dan Jarak Tepi Luka pada Penyembuhan Luka Sayat Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 3(3): 155-165.
- Pradana, F. 2014. Identifikasi Flavonoid dengan Pereaksi Geser dan Pengaruh Ekstrak Etanol 70 % Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Induksi Alokasan. *Skripsi*. Malang: UIN Malang.
- Prayong, P., Barusrux S., and Weerapreeyakul, N. 2008. Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapia Journal*, 79(1): 598-601.
- Putra, Yadnya., P.O Samirana., D.A.A Andhini. 2019. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Potensial Antioksidan dari Daun Binahong (*Anredera scandens* (L) Moq). *Jurnal Farmasi Udayana*, 8(2): 85-94.
- Putri, Atikah Halimah., Ria Siti Putriyana., Novia Silviani. 2019. Isolasi dan Ekstraksi Kelompok Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata*). *Fullerene Journal of Chemistry*, 4(2): 28-33.
- Putri, Muzemmila Arinda., Sentot Joko Raharjo. 2017. Profil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Senyawa Metabolit Sekunder Air Perasan Daun Mimba

- (Azadirachta indica). *Jurnal Akademisi Farmasi Putra Idonesia Malang*, 1(1): 2-8.
- Rahardian, Muhammad Ryan., Dwi Utami. Uji Sitotoksik dan Antiproliferasi Ekstrak Eter Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap Sel Hela. *Media Farmasi Indonesia*, 13(1): 1284-1292.
- Rahayu, Siti., Nunung Kurniasih., Vina Amalia. 2015. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Bawang Merah sebagai Antioksidan Alami. *Jurnal al-kimiya*, 2(1): 1-7.
- Reich, E. and A. Blatter. 2004. Modern TLC A Key Technique of Identification and Quality Control of Botanical and Dietary Supplements. *Journal Association of Official Analytical Chemists International*. Hal. 152-196.
- Rizkia, Putri. 2014. Uji Efektivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Ekstrak dan Isolat Senyawa Flavonoid dalam Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung: ITB Press.
- Rustanti, Elly., Qurrotu A'yunin Lathifah. 2018. Identifikasi Senyawa Kuersetin dari Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Alpukat (*Persea americana* Mill). *Alchemy: Journal of Chemistry*, 6(2): 38-42.
- Sari, A. A., Shaleh, Chairul., dan Erwin. 2015. Uji Fitokimia, Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Berbagai Fraksi Daun Mara (*Macaranga tamaricus* (L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 12(2): 53-58.
- Samirana, P.O., Swastini D. A., Ardinata, I. P., Suarka, I.P. 2017. Penentuan Profil Kandungan Kimia Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia scandens* (L.) Moq). *Jurnal Farmasi Udayana*, 6(1): 23-33.
- Samirana, P.O., N. P. E. Leliqia. 2014. TLC-Densitometer Profile and Antiulcer Activity Assay of Ethanol Extract of Binahong Leaves (*Anredera Scandens* (L.) Moq.) in Sprague Dawley Strain Male Rats. *Proceeding The International Conference of Pharmaceutial Care*, Pp. 63-71.
- Sastrohamidjojo. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. UK: The University of West London.
- Stahl, Stephen. 2013. *Stahl's Essensial Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications 3rd Edition*. Britain: Cambridge University Press.

- Sulaiman, CT., Indira Valachandran. 2016. LC/MS Characterization of Antioxidant Flavonoids from *Tragia Involucatra* L. Beni-suef University. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 1-5.
- Sukadana, I.M., Santi, S.R., Monikayani, N.W. 2018. Aktivitas Antimakan Daun Tenggulum (*Protitium javanicum* Burn. F) terhadap Ulat Kubis *Plutella xylostella*. *Journal Media Sains*, 2(2): 90-95.
- Surbakti, Putri Ayu., Edwin De Queljoe., Widdhi Boddhi. 2018. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 7(3): 22-31.
- Suslick, K. S. 1988. *Ultrasounds: Its Chemical, Physical and Biological Effects*. VHC Publishers. New York.
- Susmayanti, W., Fachriyah, E., dan Kusrini D. 2012. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Sitotoksik Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenns) S.). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 15(3): 88-93.
- Theodora C.T., I.W Gunawan., I. M. D. Swantara. 2019. Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Pada Ekstrak Etil Asetat Daun Gedi (*Abelmoschus manihot*. L.). *Jurnal Program Studi Kimia FMIPA Universitas Udayana*, 13(2): 131-138.
- Thompson, L.H and Doraiswamy. 1999. Sonochemistry: Science and Engineering. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38: 1215-1249.
- Titis, M., Fachriyah, E. dan Kusrini, D. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Alkaloid Daun Binahong (*Anredera cordifolia*). *Journal of Chemical Information*, 1(1): 196-201.
- Triyono, Agus., Zuraida Zulkarnain., Tofan Aries Mana. 2018. Efek Antihiperpigmentasi Kombinasi Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) dan Daun Pare (*Monordica Charantia* L.) pada Kulit Marmut. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 8(1): 10-16.
- Veronita, Fanna., Nanik Wijayanti., Sri Mursiti. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Daun Binahong serta Aplikasinya sebagai *Hand Sanitizer*. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2): 138-143.
- Vifta, R. L., Yustisia D. A. 2018. Skrining Fitokimia, Karakterisasi dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1(1): 8-13.
- Vijayalakshmi A., Masilamani K., Nagarajan E., Ravichandiran V. 2015. In Vitro Antioxidant and Anticancer Activity of Flavonoids from Cassie Tora Linn. Againsts Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Der Pharma Chemica*, 7(9): 122-129.



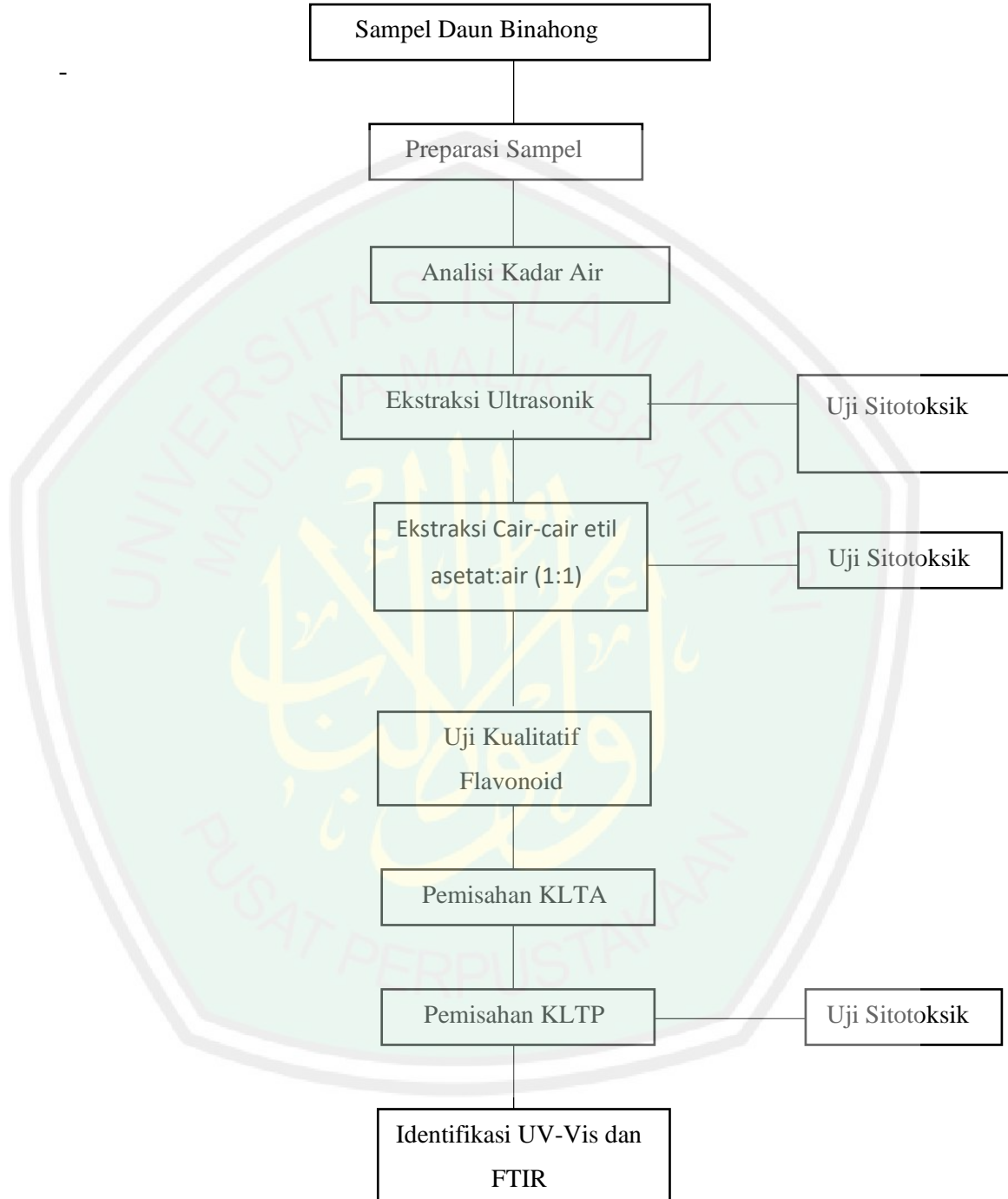
- Virginia, Dita Maria., Roni Permata Saputra., Agustina Setiawati. 2019. Cytotoxic Activity of *Anredera cordifolia* Leaf Extract On Hela Cells. *Biotropia Journal*, 26(1): 33-40.
- Walid, Muhammad., Partomuan Simanjuntak., Ahmad Darmawan. 2019. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Kimia Aktif Kulit Batang Kersen terhadap *Artemia Salina*. *Journal of Politeknik Kota Tegal*, 8(1) pp 56-60.
- Walida, Siti Masriatul., Endah Rismawati., Undang A. Dasuki. 2016. Isolasi Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Jantung Pisang Batu (*Musa balbisiana* Colla). *Prosiding Farmasi*, 2(1): 5-7.
- Wang Qing-Hui., Guo Shuai., Yang Xue-Yan., Shang Ming-Ying., Shang Ying-Hui., Xiao Jun-Jun., Cai Shao-Qing. 2017. Flavonoids Isolates from *Sinopodophylli Fructus* and Their Bioactivities Against Human Breast Cancer Cell. *Chinese Journal of Natural Medicine*, 15(3): 225-233.
- WHO (World Health Organization). 2008. *World Health Statistic 2013*. Switzerland: WHO Press.
- Wina Sonya Puzi H., Yani Lukmayani., Undang A. Dasuki. 2015. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper Crocatum Ruiz and Pav*). *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba*: 53-60.
- Wyllie, A., Donahue, V., Fischer B., Hill D. Keeseey., Manzow, S. 2000. Cell Death Apoptosis and Necrosis. *The New England of Journal Medicine*, Review Articles.
- Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced Thymocyte Apoptosis is Associated with Endogenous Endonuclease Activation. *Nature*, 280: 555-556.
- Yang, Wade., Vishnu K. Ajapur., Kathiravan Krishnamurthy., Hao Feng., Ruijin Yang. 2009. Expedited Extraction of Xylan From Corncob by Power Ultrasound. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4): 76-83.
- Yuliani, Sri Hartini., Clara Dewi Anggraeni., Winda Sekarjati., Andung Panjalu., Enade Perdana Istyastiono., Agustina Setiawati. 2015. Cytotoxic Activity of *Anredera Cordifolia* Leaf Extract on Hela Cervical Cancer Cells Through p-53 Independent Pathway. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(2): 328-331.
- Yuswi, N.C.R. 2017. Antioxidant Extraction of Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) with Ultrasonic Bath (Study Type of Solvent and Extraction Time). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 5(1): 71-79.
- Zou, T.B., Xia, E.Q., He, T.P., Huang, M. Y., Jia, Q., dan H.W. 2014. Ultrasound-Assisted Extraction of Manganiferin from Mango Leaves Using Response Surface Methodology Molecule. 19:1411-1421.

- Zulfa, Elya., Tegas B. P., Mimik M. 2015. Formulasi Salep Ekstrak Etanolik Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) dengan Variasi Basis Salep. *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 12(2): 41-47.
- Zuraida., Sulistiyani., Dondin Sajuthi., dan Irma Herawati Suparto. 2017. Fenol, Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kulit Batang Pulau (*Alstonia scholaris* R.Br). *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*, 35(3): 211-219.



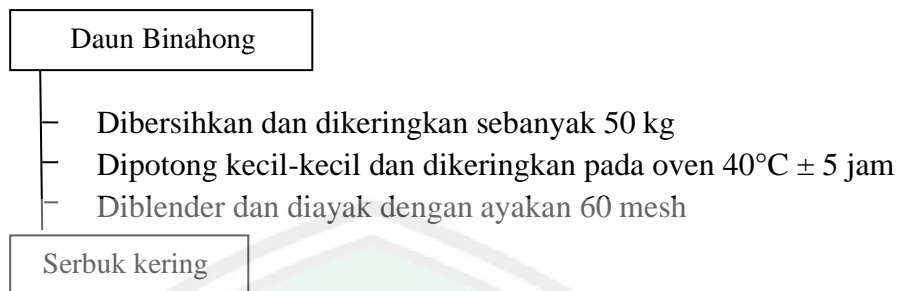
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian

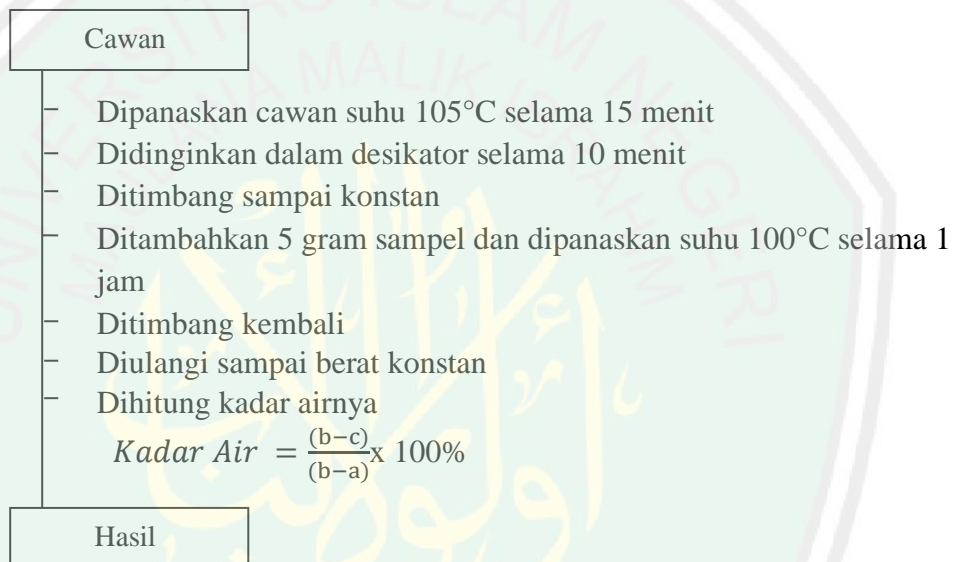


## Lampiran 2. Diagram Alir

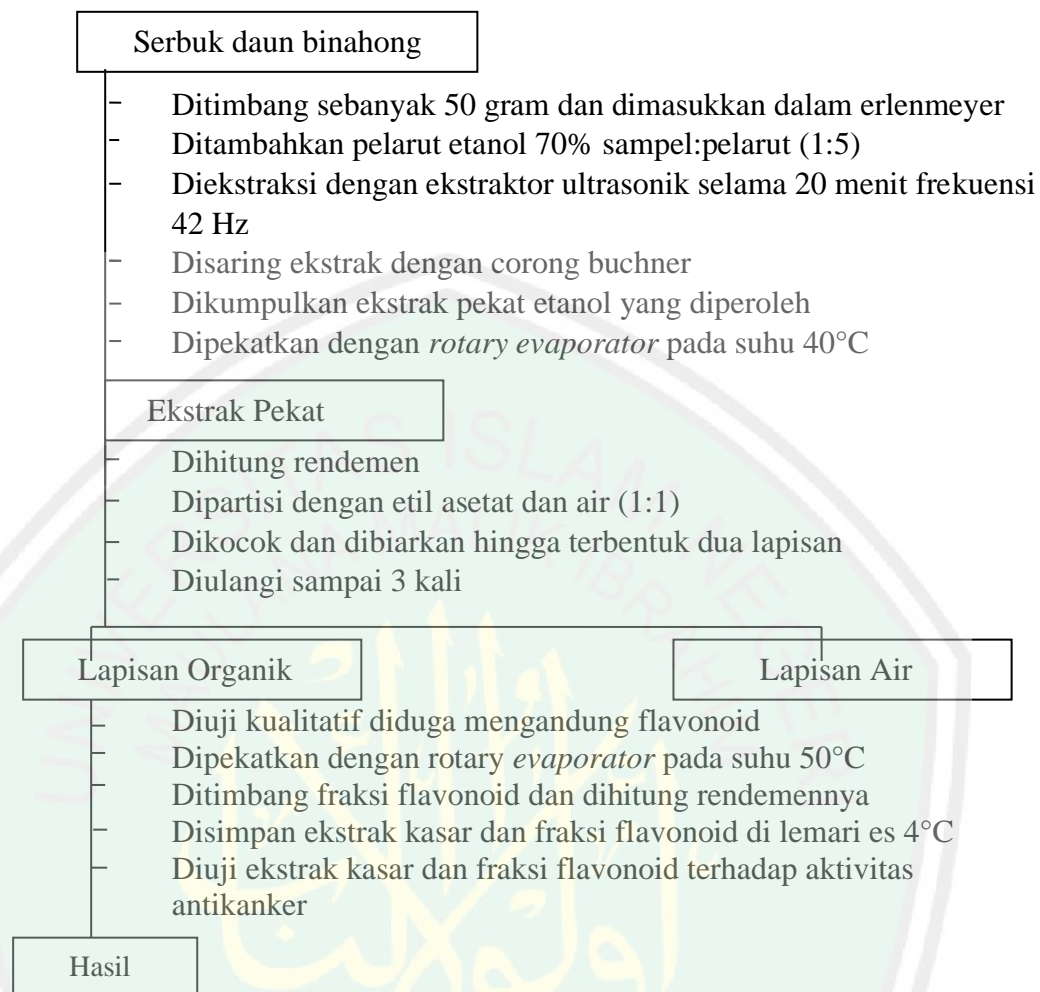
### L.2.1 Preparasi Sampel



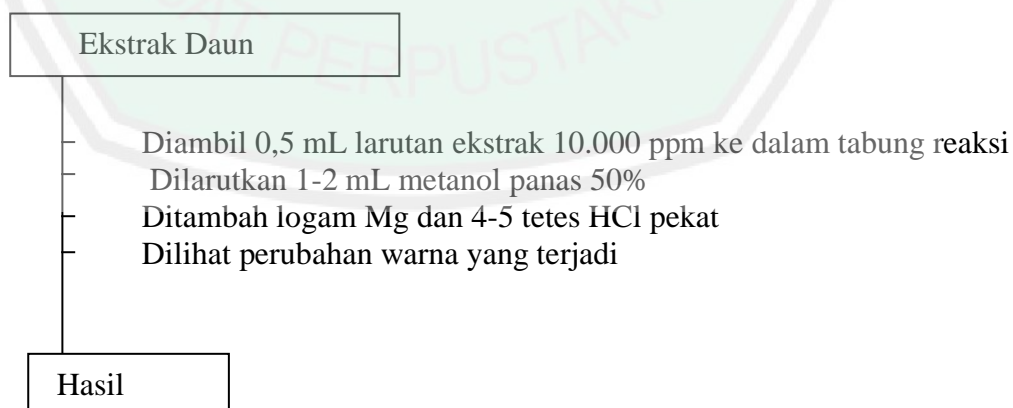
### L.2.2 Analisis Kadar Air



### L.2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif

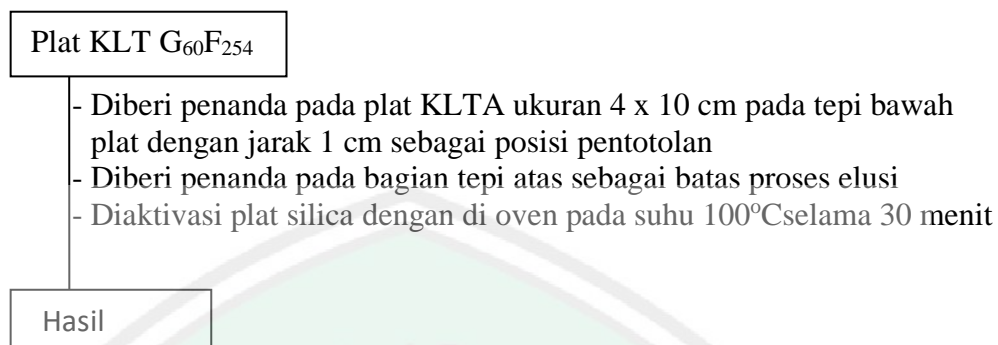


### L.2.4. Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

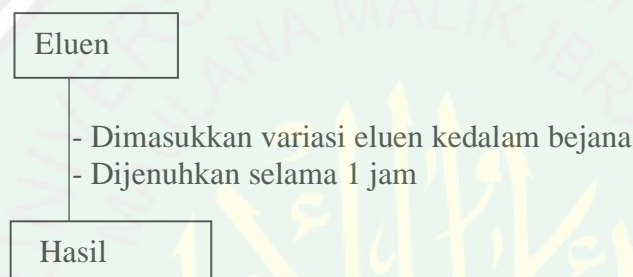


## L.2.5 Pemisahan Senyawa Flavonoid dengan KLTA

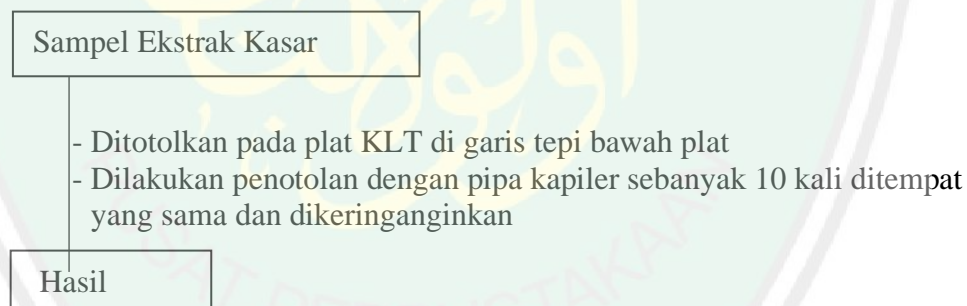
### L.2.5.1 Persiapan Plat KLTA



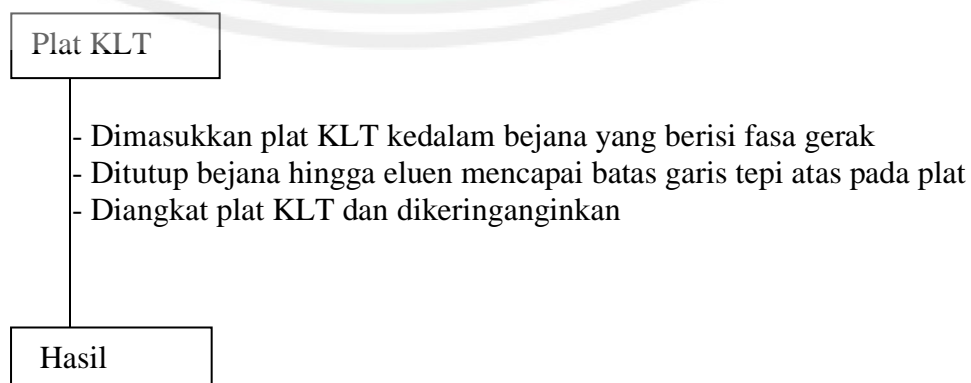
### L.2.5.2 Persiapan Fasa gerak



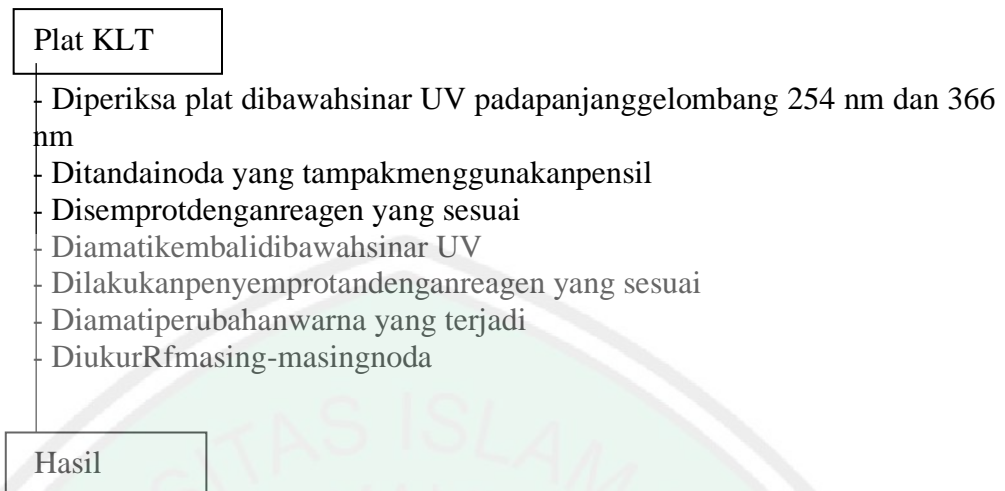
### L.2.5.3 Penotolan Sampel



### L.2.5.4 Proses Elusi

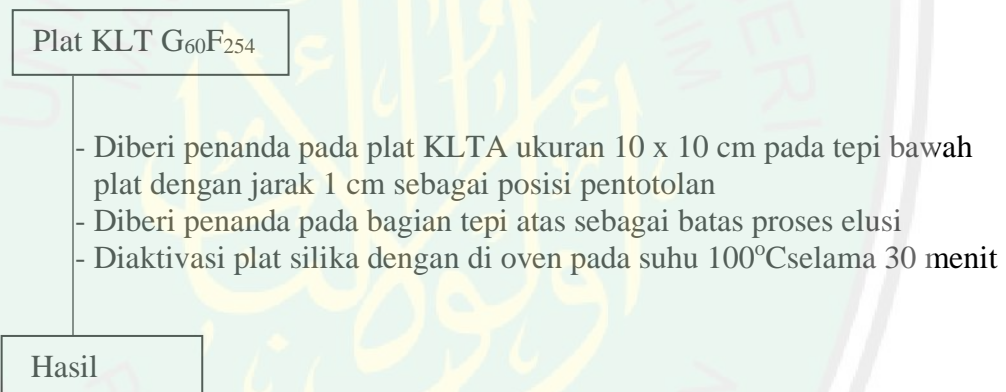


### L.2.5.5 Identifikasi Noda

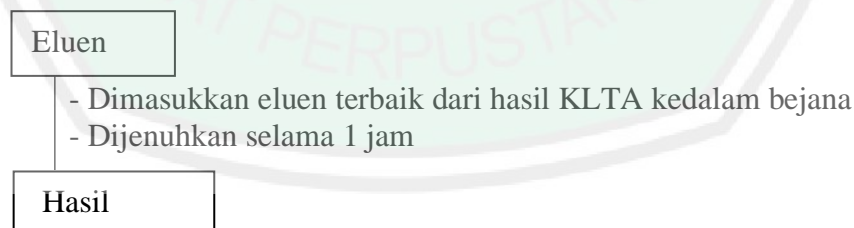


### L.2.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP

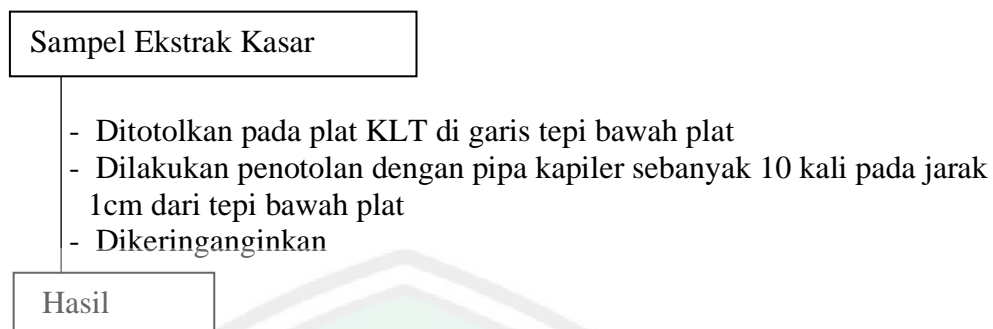
#### L.2.6.1 Persiapan Plat KLTP



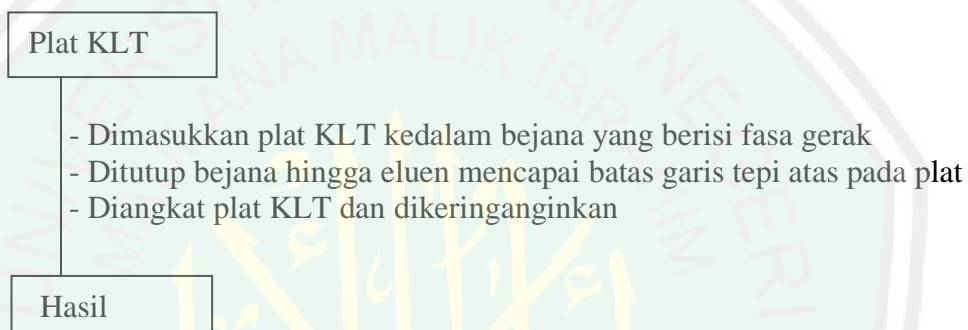
#### L.2.6.2 Persiapan Fasa gerak



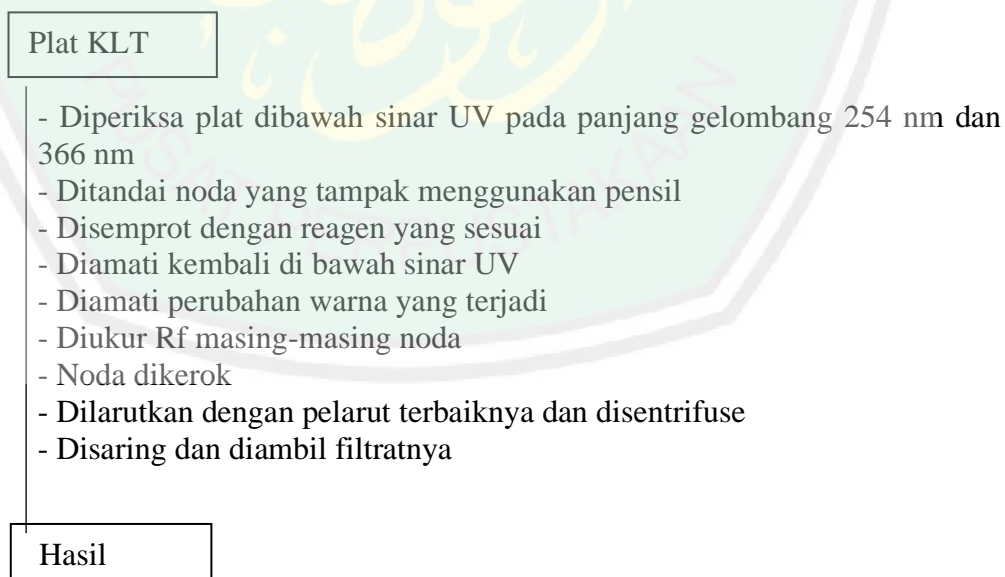
### L.2.6.3 Penotolan Sampel



### L.2.6.4 Proses Elusi



### L.2.6.5 Identifikasi Noda





## L.2.7 Uji Sitotoksik

### L.2.7.1 Penetasan Telur

Larva udang *Artemia salina*

- Dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan
- Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach
- Diaerasi dan diberi lampu
- Ditunggu hingga menetas selama 48 jam

Hasil

### L.2.7.2 Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT

Isolat senyawa steroid konsentrasi 15,625; 31,25; 62,5; 125; 500 ppm ppm

- Dimasukkan dalam vial
- Diupayakan pelarutnya
- Ditambahkan dengan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti
- Diberi air laut hingga volumenya 10 mL
- Ditambahkan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- Dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan

Hasil

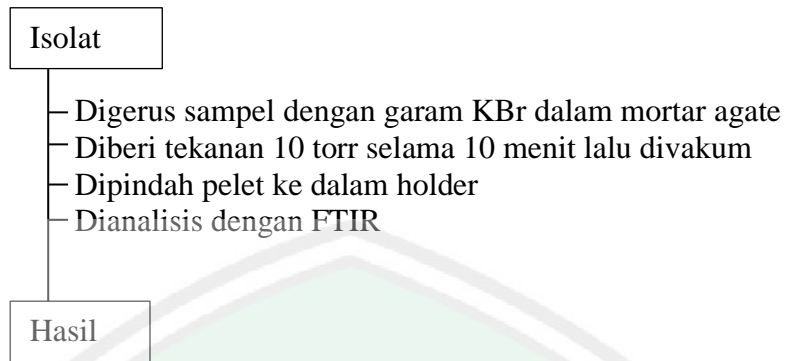
### L.2.8 Identifikasi Flavonoid dengan Spektrofotometer Uv-Vis

Isolat

- Dilarutkan dengan metanol p.a
- Dimasukkan dalam kuvet
- Diidentifikasi menggunakan spektrofotometer uV-Vis dengan panjang gelombang 200-500 nm

Hasil

### L.2.9 Identifikasi menggunakan FTIR



### Lampiran 3. Perhitungan Serta Cara Pembuatan Reagen dan Larutan

#### L.3.1 Pembuatan Larutan Etanol 70%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$96\% \times V_1 = 70\% \times 500 \text{ mL}$$

$$V_1 = 364,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yakni dipipet etanol 96% sebanyak 364,5 mL dan dimasukkan pada labu ukur 500 mL. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

#### L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$37\% \times V_1 = 2\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yakni HCl pekat (37%) dipipet sebanyak 0,5 mL dengan pipet volume dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang sudah berisi akuades  $\pm 5$  mL. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen. Pembuatan larutan ini dilakukan di dalam lemari asap.

#### L.3.4 Pembuatan Larutan HCl 1 N

$$\rho = 1,267 \text{ gr/mL}$$

$$\text{BM} = 36,5 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\% = \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g larutan}}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ gr HCl}}{36,5 \text{ gr/mol}} = 1,014 \text{ mol}$$

$$100 \text{ gr larutan} = \frac{100 \text{ gr}}{1,267 \text{ gr/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas} = n \times \text{Molaritas}$$

$$= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,85 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 7,8\text{mL}$$

Cara pembuatannya yakni HCl pekat 37% dipipet sebanyak 7,8 mL menggunakan pipet ukur dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi  $\pm$  50 mL akuades. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen. Pembuatan larutan dilakukan di lemari asap.

### L.3.5 Pembuatan Larutan Metanol 50%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$99,99\% \times V_1 = 50\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yakni metanol 99,99% dipipet sebanyak 5 mL menggunakan pipet volume dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi  $\pm$  3 mL akuades. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

### L.3.6 Pembuatan Larutan Stok 100 ppm Fraksi Daun Binahong untuk KLT

Berat fraksi = 1 mg

Volume pelarut = 10 mL (etil asetat)

Larutan stok sampel 100 ppm dibuat dengan melarutkan 1 mg fraksi etil asetat dalam 10 mL etil asetat lalu dihomogenkan.

### L.3.7 Pembuatan Eluen untuk KLTA

#### L.3.7.1 Eluen metanol:akuades (6:4)

Total eluen (v) = 15 mL

$$\text{Metanol} = \frac{6}{10} \times 15 \text{ mL} = 9 \text{ mL}$$

$$\text{Aquades} = \frac{4}{10} \times 15 \text{ mL} = 6 \text{ mL}$$

Volume eluen yang digunakan untuk metanol sebanyak 9 mL dan untuk akuades sebanyak 6 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

**L.3.7.2 Eluen *n*-butanol:asam asetat:air (4:1:5)**

Total eluen (v) = 15 mL

$$n - \text{butanol} = \frac{4}{10} \times 15 \text{ mL} = 6 \text{ mL}$$

$$\text{Asam asetat} = \frac{1}{10} \times 15 \text{ mL} = 1,5 \text{ mL}$$

$$\text{Air} = \frac{5}{10} \times 15 \text{ mL} = 7,5 \text{ mL}$$

Volume eluen yang digunakan untuk *n*-butanol sebanyak 6 mL, asam asetat sebanyak 1,5 mL, dan air sebanyak 7,5 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

**L.3.7.3 Eluen etanol:etil asetat:*n*-heksana (3:5:8)**

Total eluen (v) = 15 mL

$$\text{Etanol} = \frac{3}{16} \times 15 \text{ mL} = 2,8 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{5}{16} \times 15 \text{ mL} = 4,68 \text{ mL}$$

$$n - \text{heksana} = \frac{8}{16} \times 15 \text{ mL} = 7,5 \text{ mL}$$

Volume yang digunakan untuk etanol sebanyak 2,8 mL, etil asetat sebanyak 4,68 mL, dan *n*-heksana sebanyak 7,5 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

**L.3.7.4 Eluen etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26)**

Total volume (v) = 15 mL

$$\text{Etil asetat} = \frac{100}{148} \times 15 \text{ mL} = 10,13 \text{ mL}$$

$$\text{Asam asetat} = \frac{11}{148} \times 15 \text{ mL} = 1,11 \text{ mL}$$

$$\text{Asam formiat} = \frac{11}{148} \times 15 \text{ mL} = 1,11 \text{ mL}$$

$$\text{Air} = \frac{126}{148} \times 15 \text{ mL} = 2,635 \text{ mL}$$

Volume yang digunakan untuk etil asetat sebanyak 10,13 mL, asam asetat 1,11 mL, asam formiat 1,11 mL, dan air 2,635 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

#### L.3.7.5 Eluen *n*-heksana:etil asetat (7:3)

Total eluen (v) = 15 mL

$$N - \text{heksana} = \frac{7}{10} \times 15 \text{ mL} = 10,5 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{10} \times 15 \text{ mL} = 4,5 \text{ mL}$$

Volume yang digunakan untuk *n*-heksana sebanyak 10,5 mL dan etil asetat sebanyak 4,5 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

#### L.3.8 Pembuatan Eluen untuk KLTP

Total volume = 30 mL

Eluen yang digunakan metanol:aquades (6:4)

$$\text{Metanol} = \frac{6}{10} \times 30 \text{ mL} = 18 \text{ mL}$$

$$\text{Aquades} = \frac{4}{10} \times 30 \text{ mL} = 12 \text{ mL}$$

Volume yang digunakan untuk metanol sebanyak 18 mL dan aquades sebanyak 12 mL. Kemudian campuran eluen dijenuhkan ke dalam *chamber* KLT.

## Lampiran 4. Perhitungan Hasil Penelitian

### L.4.1 Rendemen Hasil Maserasi

Ekstraksi daun binahong dengan pelarut etanol 70%. Metode yang digunakan ialah ekstraksi ultrasonik dengan waktu ekstraksi 30 menit dan perbandingan sampel:pelarut (1:10). Hasil rendemen yang diperoleh ialah: **13,93%**

Berat beaker glass (A): 45,500 gram

Berat sampel + beaker glass (B): 46,6150 gram

Berat ekstrak = (B) – (A)

$$= 46,6150 \text{ gram} - 45,500 \text{ gram}$$

$$= 1,115 \text{ gram}$$

Rendemen ekstrak =  $\frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$

$$= \frac{1,115 \text{ gram}}{8 \text{ gram}} \times 100\% = \mathbf{13,93\%}$$

### L.4.2 Rendemen Hasil Fraksinasi

Berat ekstrak etanol 70%: 1 gram

Berat fraksi etil asetat: 0,153 gram

Rendemen fraksi =  $\frac{\text{berat fraksi etil asetat}}{\text{berat ekstrak etanol 70\%}} \times 100\%$

$$= \frac{0,153 \text{ gram}}{1 \text{ gram}} \times 100\% = \mathbf{15,3\%}$$

### L.4.3 Perhitungan Nilai R<sub>f</sub> untuk KLTA

Nilai R<sub>f</sub> KLTA dapat dihitung menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh fasa gerak}}$$

#### L.4.3.1 Rf Eluen *n*-heksana:etil asetat (7:3)

Tabel L.4.3.1 Data Rf Pemisahan KLTA eluen *n*-heksana: etil asetat (7:3)

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai Rf
1	4		0,53
2	4,8		0,64
3	5,4	7,5	0,72
4	6,3		0,84
5	6,9		0,92
6	7,4		0,98

#### L.4.3.2 Rf Eluen etanol:etil asetat:*n*-heksana (3:5:8)

Tabel L.4.3.2 Data Rf Pemisahan KLTA eluen etanol:etil asetat:*n*-heksana (3:5:8)

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai Rf
1	4,1		0,51
2	5,9	8	0,73

#### L.4.3.3 Rf Eluen metanol:aquades (6:4)

Tabel L.4.3.3 Data Rf Eluen metanol:aquades (6:4)

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai Rf
1	4,8		0,6
2	5,6		0,7
3	6,3	8	0,79
4	7,4		0,92

#### L.4.3.4 Rf Eluen etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26)



Tabel L.4.3.4 Data Rf Eluen etil asetat:asam asetat:asam formiat:air (100:11:11:26)

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai Rf
1	6,9		0,86
2	7,3	8	0,91

L.4.3.5 Rf Eluen *n*-butanol:asam asetat:air (4:1:5)Tabel L.4.3.5 Data Rf Eluen *n*-butanol:asam asetat:air (4:1:5)

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai Rf
1	5,5		0,7
2	7,1	7,8	0,91
3	7,6		0,97

## L.4.4 Uji Sitotoksik

Cara menghitung mortalitas =  $\frac{\text{modus}}{\text{jumlah larva}} \times 100\%$

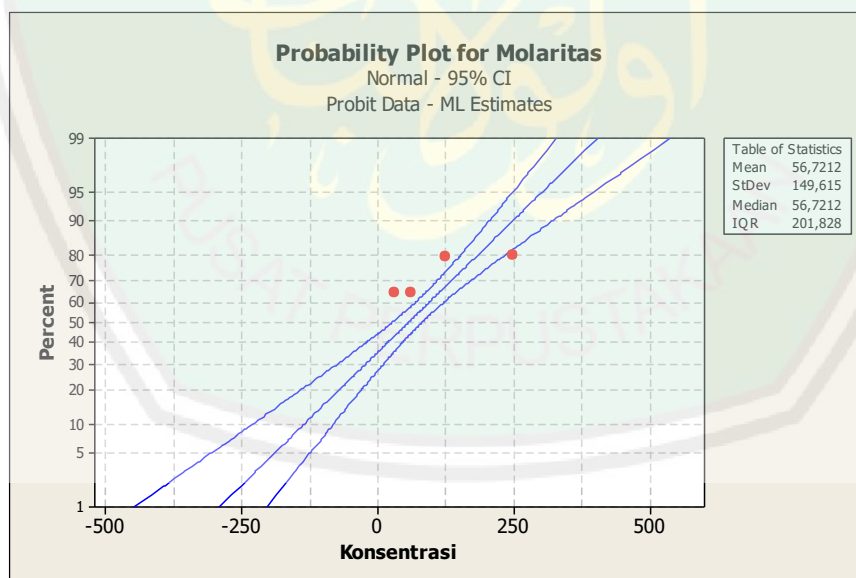
Cara menghitung mortalitas (%) =  $\frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah seluruh larva}$

#### L.4.4.1 Sampel Uji Ekstrak Kasar Etanol 70%

Konsentrasi ppm	Jumlah larva yang mati (ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0	0	1	1	0	0	0	0
31,25	7	6	6	7	7	7	70%
62,5	5	6	6	6	7	6	60%
125	6	9	8	7	8	8	80%
250	8	10	9	8	8	8	80%
500	8	9	10	10	10	10	100%

Konsentrasi (ppm)	Larva Mati (modus)	Mortalitas (%)	Mortalitas
0	0	0	0
31,25	7	70	35
62,5	6	60	30
125	8	80	40
250	8	80	40
500	10	100	50

#### Probability Plot for Mortalitas Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi



Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	195
	Non-event	105

N Total 300

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0,379114	0,118886	-3,19	0,001
Konsentrasi Natural Response	0,0066838	0,0009922	6,74	0,000

Log-Likelihood = -148,280

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	52,6565	4	0,000
Deviance	68,0929	4	0,000

#### Tolerance Distribution

##### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	56,7212	13,2826	30,6877	82,7547
StDev	149,615	22,2091	111,846	200,138

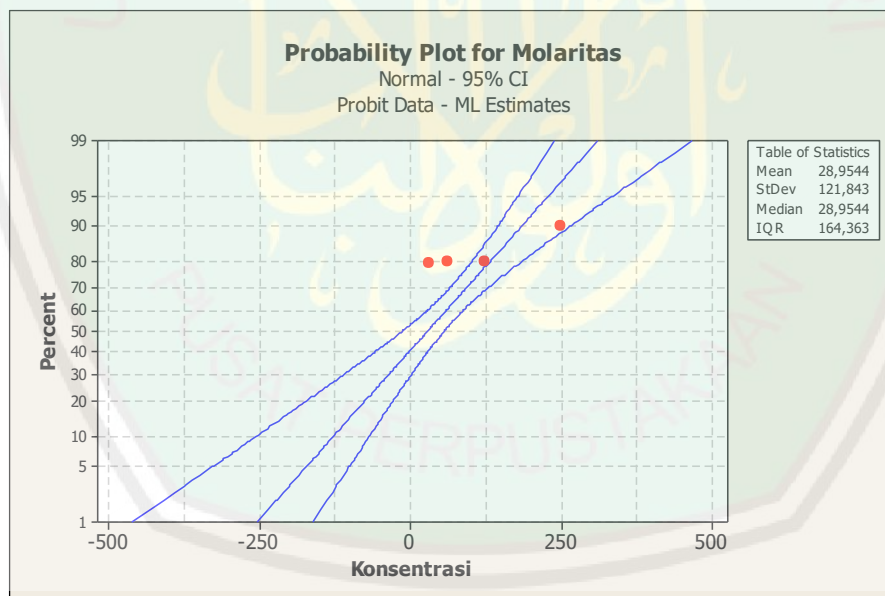
##### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-291,336	57,1805	-448,259	-203,894
2	-250,551	51,2934	-391,068	-171,973
3	-224,674	47,5800	-354,825	-151,676
4	-205,208	44,8007	-327,589	-136,380
5	-189,374	42,5508	-305,456	-123,917
6	-175,896	40,6447	-286,635	-113,290
7	-164,079	38,9813	-270,148	-103,957
8	-153,499	37,4989	-255,400	-95,5872
9	-143,876	36,1572	-242,000	-87,9619
10	-135,018	34,9282	-229,678	-80,9307
20	-69,1981	26,0600	-138,639	-28,1551
30	-21,7370	20,1891	-74,0539	10,9593
40	18,8167	15,9449	-20,4653	45,9784
<b>50</b>	<b>56,7212</b>	<b>13,2826</b>	<b>26,8360</b>	<b>81,4965</b>
60	94,6258	12,7254	69,4898	121,662
70	135,179	14,7153	109,370	170,390
80	182,640	19,3000	151,161	232,299
90	248,461	27,4420	205,407	321,866
91	257,318	28,6156	212,549	334,078
92	266,941	29,9039	220,281	347,371
93	277,522	31,3345	228,755	362,016
94	289,339	32,9474	238,188	378,402
95	302,816	34,8035	248,914	397,124
96	318,650	37,0035	261,477	419,157
97	338,116	39,7317	276,874	446,292
98	363,993	43,3907	297,278	482,427

#### L.4.4.2 Sampel Uji Fraksi Etil Asetat

Konsentrasi ppm	Jumlah larva yang mati (ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0	0	0	0	0	0	0	0
31,25	8	8	8	7	8	8	80%
62,5	8	8	9	8	8	8	80%
125	10	7	10	8	10	10	100%
250	9	9	9	8	8	9	90%
500	9	10	9	9	9	10	90%

Konsentrasi (ppm)	Larva Mati (modus)	Mortalitas (%)	Mortalitas
0	0	0	0
31,25	8	80	40
62,5	8	80	40
125	10	100	50
250	9	90	45
500	9	90	45



#### Probit Analysis: Molaritas; N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Molaritas	Event	129

	Non-event	51
N	Total	180

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0,237638	0,160365	-1,48	0,138
Konsentrasi Natural Response	0,0082073	0,0016171	5,08	0,000

Log-Likelihood = -79,771

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	39,2341	4	0,000
Deviance	49,9654	4	0,000

#### Tolerance Distribution

##### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	28,9544	16,0752	-2,55236	60,4612
StDev	121,843	24,0072	82,8103	179,273

##### Table of Percentiles

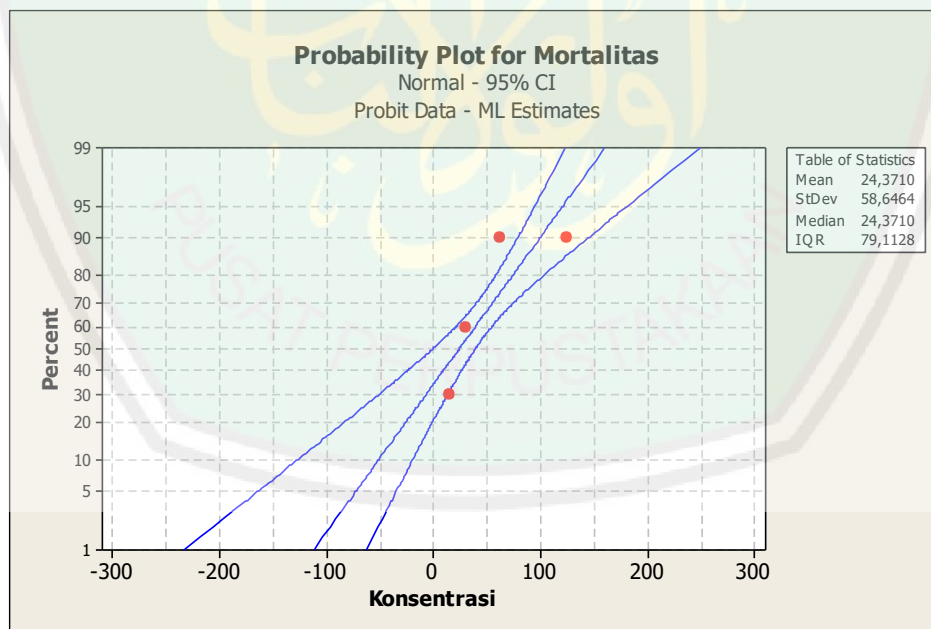
Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-254,494	65,3197	-461,206	-161,307
2	-221,280	58,9433	-407,427	-137,015
3	-200,207	54,9182	-373,346	-121,561
4	-184,354	51,9035	-347,735	-109,910
5	-171,459	49,4612	-326,922	-100,413
6	-160,483	47,3905	-309,223	-92,3136
7	-150,860	45,5820	-293,718	-85,1976
8	-142,243	43,9690	-279,849	-78,8136
9	-134,407	42,5077	-267,246	-72,9961
10	-127,193	41,1680	-255,656	-67,6303
20	-73,5910	31,4376	-169,988	-27,3030
30	-34,9400	24,8462	-109,089	2,64823
40	-1,91410	19,8049	-58,3020	29,4906
<b>50</b>	<b>28,9544</b>	<b>16,0752</b>	<b>-13,0095</b>	<b>56,7561</b>
60	59,8229	14,0916	28,1639	88,1406
70	92,8488	14,7131	65,4344	128,499
80	131,500	18,5736	101,452	183,333
90	185,102	26,7426	145,054	265,725
91	192,316	27,9646	150,661	277,074
92	200,152	29,3124	156,709	289,446
93	208,769	30,8157	163,316	303,093
94	218,392	32,5173	170,649	318,381
95	229,368	34,4828	178,961	335,867
96	242,263	36,8202	188,669	356,469
97	258,115	39,7280	200,534	381,866
98	279,189	43,6395	216,215	415,720

99 312,403 49,8837 240,770 469,236

#### L.4.4.3 Sampel Uji Isolat Flavono

Konsentrasi (ppm)	Larv	dus)	Mortalitas (%)	Mortalitas
0	0		0	0
31,25	3		30	15
62,5	6		60	30
125	9		90	45
250	9		90	45
500	10		100	50

Konsentrasi ppm	Jumlah larva yang mati (ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0	0	0	0	0	0	0	0
31,25	3	3	3	4	5	30	30%
62,5	6	6	5	6	7	60	60%
125	9	8	7	9	9	90	90%
250	10	9	9	9	10	90	90%
500	10	9	10	10	10	100	100%



#### Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

## Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	185
	Non-event	65
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

## Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0,415558	0,166237	-2,50	0,012
Konsentrasi Natural Response	0,0170513 0	0,0029100	5,86	0,000

Log-Likelihood = -104,467

## Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	15,0239	3	0,002
Deviance	15,5295	3	0,001

## Tolerance Distribution

## Parameter Estimates

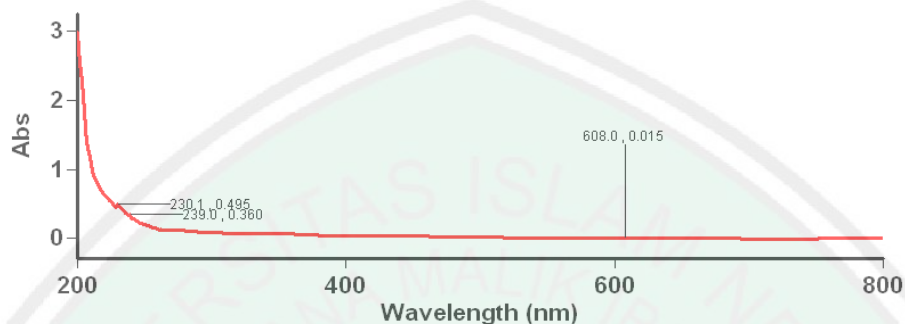
Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	24,3710	6,89910	10,8490	37,8930
StDev	58,6464	10,0085	41,1111	1,9418

## Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-112,061	27,5407	-192,547	-71,2991
2	-96,0740	24,8819	-168,662	-59,1825
3	-85,9308	23,2034	-153,524	-51,4783
4	-78,3004	21,9460	-142,148	-45,6721
5	-72,0937	20,9273	-132,901	-40,9412
6	-66,8109	20,0635	-125,038	-36,9079
7	-62,1788	19,3090	-118,149	-33,3658
8	-58,0314	18,6360	-111,986	-30,1892
9	-54,2594	18,0262	-106,385	-27,2957
10	-50,7874	17,4670	-101,234	-24,6279
20	-24,9871	13,4020	-63,1377	-4,62310
30	-6,38320	10,6392	-36,0089	10,1429
40	9,51310	8,50932	-13,3063	23,2380
<b>50</b>	<b>24,3710</b>	<b>6,89910</b>	<b>7,09964</b>	<b>36,2912</b>
60	39,2289	5,97038	25,9821	50,8679
70	55,1252	6,09066	43,6001	69,0475
80	73,7290	7,58201	61,1096	93,4329
90	99,5294	10,9147	82,6273	130,016
91	103,001	11,4187	85,4069	135,055
92	106,773	11,9754	88,4078	140,549
93	110,921	12,5971	91,6878	146,609
94	115,553	13,3016	95,3303	153,397

95	120,836	14,1163	99,4622	161,162
96	127,042	15,0860	104,291	170,310
97	134,673	16,2934	110,197	181,588
98	144,816	17,9191	118,006	196,620
99	160,803	20,5163	130,245	220,383

#### L.4.5 Identifikasi Isolat menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



#### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 15 Sep 02:11:28 PM 2020  
 Method:  
 Batch: D:\Atika Masrihanah\Lamdha Maks UV Isolat 1 (15-09-2020).DSW  
 Software version: 3.00 (339)  
 Operator: Rika

#### Sample Name: UV Isolat 1

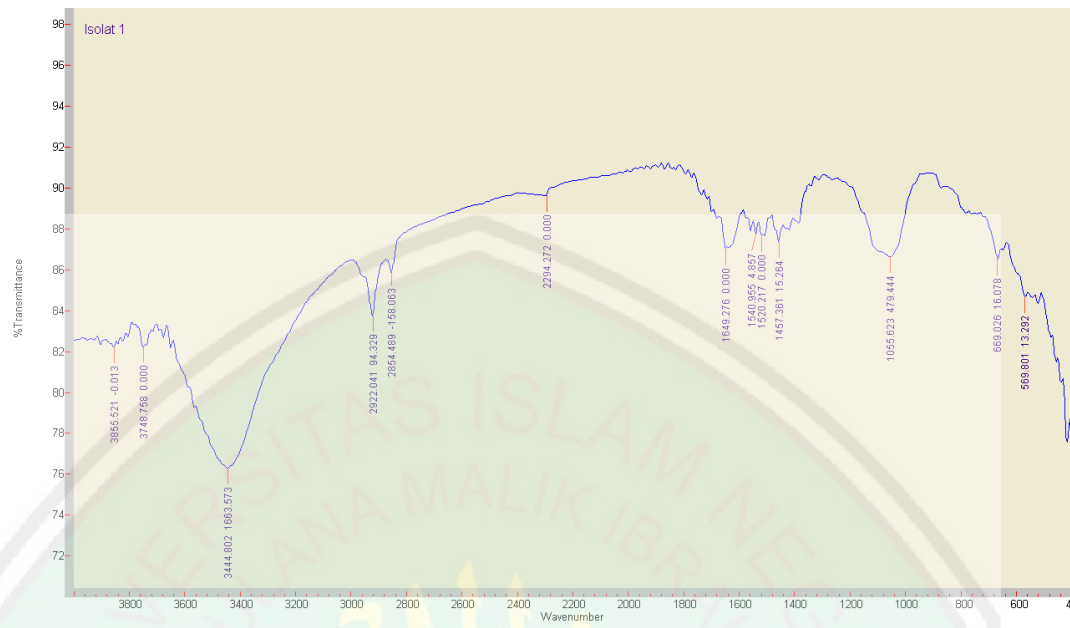
Collection Time 9/15/2020 2:11:34 PM

Peak Table  
 Peak Style Peaks  
 Peak Threshold 0.0100  
 Range 800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
608.0	0.015
239.0	0.360
230.1	0.495



#### L.4.6 Identifikasi Isolat menggunakan FTIR



Spektra FTIR Isolat Flavonoid Daun Binahong

## Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

### L.5.1 Preparasi sampel daun binahong (*Anredera cordifolia*)



Pemetikan daun binahong



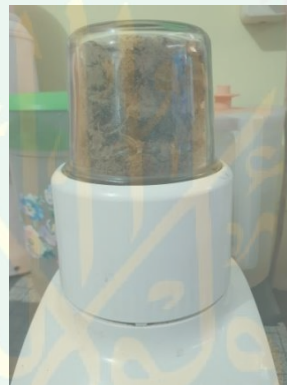
Pencucian daun binahong



Pengeringan



Pengeringan daun



Penggilingan daun



Serbuk sampel

### L.5.2 Analisis kadar air dan ekstraksi ultrasonik



Analisis Kadar Air



Ekstraksi Ultrasonik



Penyaringan hasil ekstraksi



Proses pemekatan hasil ekstraksi



Ekstrak kental etanol

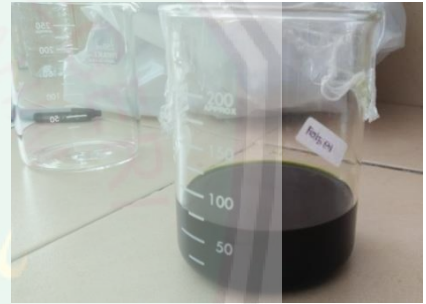
### L.5.3 Fraksinasi



Fraksinasi etil asetat

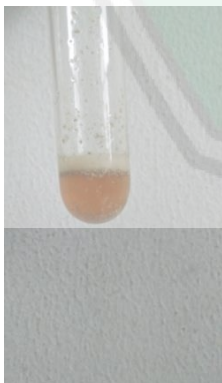


Fraksi ketiga etil asetat



Hasil fraksi etil asetat

### L.5.4 Uji Fitokimia



Uji flavonoid (+)  
steroid



Uji saponin (+)



(+) Tanin



(+)triter/(-)

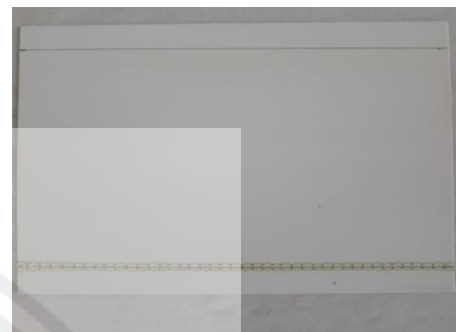
### L.5.5 Kromatografi lapis tipis analitik dan preparatif



Elusi KLTA



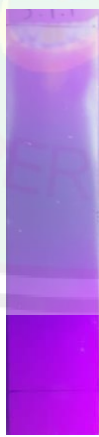
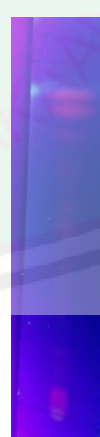
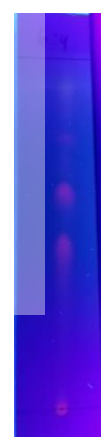
Elusi KLTP



Penotolan KLTP



BAA (4:1:5)

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOC(7:3)EtOH:EtOC: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (3:5:8)MeOH:H<sub>2</sub>O(6:4)EtOC:CH<sub>3</sub>COOH:  
CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O  
(100:11:11:26)EtOC:CH<sub>3</sub>COOH:  
CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O  
(100:11:11:26)  
366 nmC<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:EtOC(7:3)  
366 nmMeOH:H<sub>2</sub>O(6:4)  
366nm



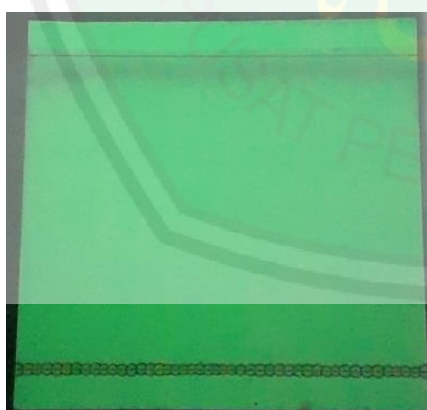
EtOH:EtOC: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (3:5:8)  
366 nm



BAA (4:1:5)  
366 nm

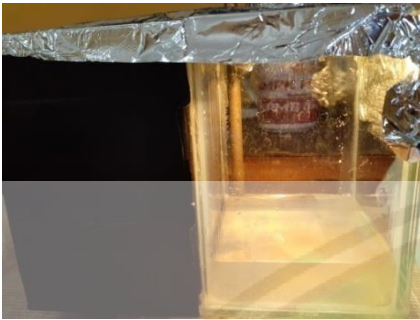


Hasil KLTP sebelum (kiri) dan sesudah (kanan) disemprot amonia

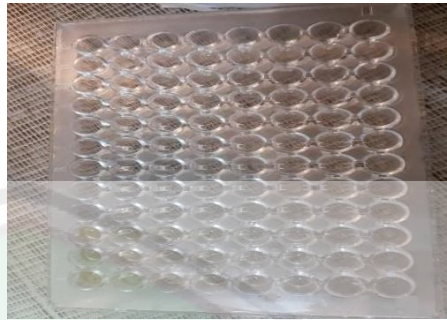


Hasil KLTP sesudah disemprot amonia sinar 254 nm (kiri) dan 366 nm (kanan)

### L.5.6 Uji Sitotoksik



Penetasan telur



Uji sitotoksik



Pendiaman 24 jam



Perhitungan larva