

**UJI TOKSISITAS DAN KARAKTERISASI ISOLAT DARI FRAKSI ETIL
ASETAT BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)
DENGAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

**Oleh :
SALMA IZA FADHILA
NIM. 17630007**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**UJI TOKSISITAS DAN KARAKTERISASI ISOLAT DARI FRAKSI ETIL
ASETAT BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)
DENGAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

**Oleh :
SALMA IZA FADHILA
NIM. 17630007**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Skripsi**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

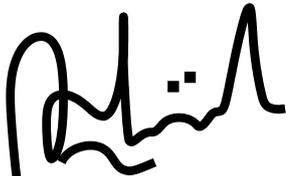
**UJI TOKSISITAS DAN KARAKTERISASI ISOLAT DARI FRAKSI ETIL
ASETAT BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)
DENGAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh :
SALMA IZA FADHILA
NIM. 17630007

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal : 24 Desember 2021

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPT. 201402011409

Mengetahui,
Ketua Program Studi



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

**UJI TOKSISITAS DAN KARAKTERISASI ISOLAT DARI FRAKSI ETIL
ASETAT BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)
DENGAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh :
SALMA IZA FADHILA
NIM. 17630007

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 24 Desember 2021**

Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M.Si
NIP. 19770720200312 2 001


(.....)

Ketua Penguji : Nur Aini, M.Si
NIP.19840608201903 2 009


(.....)

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


(.....)

Anggota Penguji : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I
NIPT. 201402011409


(.....)

Mengetahui
Ketua Program Studi,



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Salma Iza Fadhila
NIM : 17630007
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Toksisitas dan Karakterisasi Isolat Dari Fraksi
Etil Asetat Biji Anggur Bali (*Vitis Vinifera* L. Var.
Alphonso Lavallee) Dengan LC-MS/MS

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, 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, 20 Desember 2021
Yang membuat pernyataan



Salma Iza Fadhila
NIM. 17630007

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil'alamin dengan mengucapkan syukur kepada Allah Swt. Saya persembahkan skripsi ini kepada:

Bapak dan ibuku yang terbaik, tersayang, dan terhebat Anang Dahlan dan Dwi Susilowati

Terima kasih atas segala doa yang selalu kalian panjatkan, semangat yang selalu kalian berikan, raga yang selalu kalian pasang untuk menenangkan, dukungan dan motivasi yang selalu kalian beri agar tidak mudah menyerah dan selalu semangat menyelesaikan sesuatu yang telah dimulai. Serta lebih banyak lagi pengorbanan yang tidak bisa disebutkan dan tidak bisa membalasnya sampai kapanpun. Semoga proses pendewasaan diri selama proses perkuliahan ini dapat memberikan manfaat untuk ibu dan bapak kedepannya.

Kemudian tidak lupa saya ucapkan terima kasih banyak kepada adek Salwa Iza Fadhila dan semua keluarga besar Daud Abdul Ghani dan Somo Laman yang turut mendukung dan memberi semangat untuk segera menyelesaikan pendidikan S-1 ini.

Dosen-dosen yang telah memberikan ilmu selama perkuliahan dan banyak hal tentang kehidupan.

Kupersembahkan skripsi ini kepada bapak ibu dosen yang telah memberikan banyak ilmu bermanfaat, terkhusus Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Siselaku dosen dosen pembimbing skripsi yang sangat sabar dalam membimbing dan mengayomi saya, Bapak Dr. M.Mukhlis Fachrudin M.S.I selaku dosen pembimbing agama dan pemberi arahan, Ibu Diana Candra Dewi, M.Si dan Ibu Nur Aini, M.Si yang telah sabar membantu saya dalam proses penyusunan dan penulisan naskah menjadi lebih baik. Semoga semua arahan, nasehat dan motivasi selama perkuliahan ini dapat menjadi keberkahan dan menjadi ladang amal jariyah bagi bapak dan ibu sekalian, aamiin.

Sahabat-sahabat dan teman-temanku yang tersayang

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian yang selalu perhatian, motivasi, dukungan penuh, nasehat dan memberi semangat untuk terus berjuang. Khususnya untuk teman sebimbangan Analitik Squad, Trio wek-wek, Shauuma, Kimia A dan Kimia Angkatan 17. Semoga Allah selalu membersamai kita dan menjaga tali silaturahmi ini dalam ketaatan di dunia hingga akhirat, aamiin.

MOTTO

Dari Abu Hurairah ra, Nabi SAW, bersabda :

"Barang siapa yang melepaskan satu kesusahan seorang mukmin, pasti Allah akan melepaskan darinya satu kesusahan pada hari kiamat. Barang siapa yang menjadikan mudah urusan orang lain, pasti Allah akan memudahkannya di dunia dan di akhirat. Barang siapa yang menutupi aib seorang muslim, pasti Allah akan menutupi aibnya di dunia dan di akhirat. Allah senantiasa menolong hamba Nya selama hamba Nya itu suka menolong saudaranya."

(HR. Muslim)

"Barang siapa menuju kepada kebaikan, maka dia akan mendapatkan pahala seperti pahala orang yang mengerjakannya".

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

"Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan."

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penyusun panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan segala rahmat dan nikmatnya berupa kesehatan, kesempatan, serta kesabaran, sehingga penyusun dapat skripsi yang berjudul “Uji Toksisitas dan Karakterisasi Isolat Dari Fraksi Etil Asetat Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) Dengan LC-MS/MS” dengan semaksimal mungkin.

Sholawat serta salam tidak lupa selalu tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa kita, ummatnya dari zaman kegelapan menuju zaman yang terang benderang melalui cahaya iman dengan pedoman Al-Qur’an dan Al-hadits. Semoga kelak kita termasuk ummat yang mendapatkan syafaatnya. Aamiin

Penyusun menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak akan tersusun dan selesai dengan baik tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak terkait. Oleh karena itu, penyusun mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Anang Dahlan, Ibu Dwi Susilowati, Adik Salwa Iza Fadhila serta semua keluarga yang telah memberikan do’a, nasihat, perhatian, dukungan baik moril maupun materiil yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

5. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat tentang penelitian kepada penulis.
6. Bapak Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan mengenai integrasi kimia dan Al-Qur'an pada penelitian penulis.
7. Ibu Diana Chandra Dewi, M.Si dan Ibu Nur Aini, M.Si selaku penguji yang telah memberikan ilmu pengetahuan, bimbingan dan arahan dalam penulisan laporan hasil penelitian ini.
8. Teman-teman Kimia UIN Malang Angkatan 2017 khususnya kelas Kimia A yang telah banyak membantu memberikan dukungan dan semangat dalam penyelesaian proposal penelitian penulis.
9. Seluruh pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari dalam skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan dan keterbatasan. Oleh karena itu, penulis dengan lapang hati mengharapkan adanya kritik maupun saran untuk perbaikan dalam penyusunan selanjutnya. Terlepas dari semua itu, semoga skripsi ini dapat memberikan informasi dan ilmu yang bermanfaat serta kontribusi positif bagi kita semua. Aamiin yaa rabbal 'aalamiin.

Malang, 21 Desember 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
MOTTO	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT.....	xv
مستخلص البحث	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II PENDAHULUAN	
2.1 Anggur Bali (<i>Vitis vinifera</i> L. Var. Alphonso Lavallee)	10
2.1.1 Definisi Anggur Bali	10
2.1.2 Klasifikasi Anggur Bali	11
2.1.3 Morfologi Anggur Bali	12
2.1.4 Kandungan Anggur Hitam	12
2.2 Teknik Pemisahan Senyawa Aktif Biji Anggur Bali (<i>Vitis vinifera</i> L. Var. Alphonso Lavallee).....	15
2.2.1 Ekstraksi Ultrasonik	15
2.2.2 Ekstraksi Cair-Cair dengan Etil Asetat dan Air.....	17
2.2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	18
2.3 Spektrofotometri UV-Vis	19
2.4 LC-MS/MS	21
2.5 Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	24
2.5.1 Klasifikasi <i>Artemia salina</i> Leach.....	24
2.5.2 Morfologi.....	24
2.5.3 Penggunaan <i>Artemia salina</i> Leach dalam Penelitian.....	25
2.6 Uji Toksisitas	25
2.7 Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).....	26
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	28

3.2	Alat dan Bahan Penelitian	28
3.2.1	Alat Penelitian	28
3.2.2	Bahan Penelitian	28
3.3	Rancangan Penelitian.....	29
3.4	Tahap Penelitian	30
3.5	Cara Kerja	30
3.5.1	Preparasi Sampel	30
3.5.2	Analisis Kadar Air	30
3.5.3	Ekstraksi Ultrasonik Senyawa Aktif Biji Anggur Bali.....	31
3.5.4	Ekstraksi Cair-Cair/ Fraksinasi Etil Asetat.....	32
3.5.5	Uji Fitokimia	32
3.5.5.1	Uji Senyawa Aktif Flavonoid.....	32
3.5.5.2	Uji Senyawa Tanin Terkondensasi	33
3.5.6	Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP	33
3.5.7	Identifikasi dengan UV-Vis Metode <i>Bate-Smith</i>	33
3.5.8	Uji Toksisitas dengan Metode BSLT	34
3.5.8.1	Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	34
3.5.8.2	Uji Toksisitas	34
3.5.8.3	Pengolahan dan Analisis Data.....	35
3.5.9	Identifikasi Isolat KLTP dengan LC-MS/MS	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Preparasi Sampel	37
4.2	Analisis Kadar Air	37
4.3	Ekstraksi Ultrasonik Biji Anggur Bali.....	38
4.4	Hidrolisis dan Fraksinasi	40
4.5	Uji Fitokimia Flavonoid dan Tanin Terkondensasi	42
4.6	Pemisahan Senyawa Dugaan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	44
4.7	Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	46
4.8	Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dengan Metode BSLT	50
4.9	Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS	53
4.10	Pemanfaatan Biji Anggur Bali dalam Perspektif Islam	57
BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	63
5.2	Saran	63
DAFTAR PUSTAKA		65
LAMPIRAN.....		74

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Nilai m/z berbagai jenis senyawa monomer dan polimer flavonoid.....	23
Tabel 3.1 Kondisi instrumentasi LC-MS/MS	36
Tabel 4.1 Data dugaan jenis flavonoid hasil pemisahan noda fraksi etil asetat biji anggur Bali pada sinar UV 366 nm.....	45
Tabel 4.2 Data dugaan jenis flavonoid hasil pemisahan noda fraksi etil asetat biji anggur Bali pada sinar UV 366 nm.....	51
Tabel 4.3 Massa Flavonoid Isolat 3 Hasil KLTP yang terdeteksi oleh LC-MS/ MS	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Anggur Bali	12
Gambar 2.2 Struktur flavonoid	13
Gambar 2.3 Struktur katekin	14
Gambar 2.4 Struktur proantosianidin.....	14
Gambar 2.5 Hasil identifikasi KLT ekstrak Biji Anggur.....	19
Gambar 2.6 Identifikasi LC-MS/MS ekstrak Biji Anggur.....	22
Gambar 2.7 <i>Artemia salina</i> Leach	24
Gambar 4.1 Filtrat hasil ekstraksi ultrasonik dengan pelarut metanol : air : HCl (MAH).....	40
Gambar 4.2 Reaksi netralisasi asam	40
Gambar 4.3 Hasil fraksi etil asetat biji anggur Bali	41
Gambar 4.4 Hasil uji flavonoid fraksi etil asetat (A) sebelum; (B) sesudah.....	42
Gambar 4.5 Hasil uji tanin terkondensasi fraksi etil asetat.....	43
Gambar 4.6 Reaksi polifenol dengan formaldehid	44
Gambar 4.7 Visualisasi KLTP (a) hasil pemisahan KLTP ekstrak MAA dan (b) ilustrasinya	45
Gambar 4.8 Warna larutan (a) ekstrak MAH, (b) fraksi EA, (c) isolat 3 KLTP setelah proses pemanasan.....	48
Gambar 4.9 Reaksi <i>Bate-Smith</i> dalam mengidentifikasi proantosianidin.....	48
Gambar 4.10 Ilustrasi hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis	48
Gambar 4.11 Hasil kromatogram isolat 3 hasil KLTP.....	54
Gambar 4.12 Dugaan fragmentasi senyawa hasil identifikasi LC-MS/MS	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian	75
Lampiran 2. Diagram Alir.....	76
Lampiran 3. Perhitungan.....	82
Lampiran 4. Data pengamatan dan hasil perhitungan.....	87
Lampiran 5. Data Hasil KLTP	89
Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas.....	89
Lampiran 7. Spektrum UV-Vis	95
Lampiran 8. Kromatogram dan spektra hasil identifikasi LC-MS/MS.....	97
Lampiran 9. Dokumentasi.....	102

ABSTRAK

Fadhila, Salma Iza. 2021. **Uji Toksisitas dan Karakterisasi Isolat Dari Fraksi Etil Asetat Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) Dengan LC-MS/MS.** Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Elok Kamilah Hayati, M. Si.; Pembimbing II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

Kata Kunci : biji anggur hitam, flavonoid, UV-Vis, LC-MS/MS

Biji Anggur Hitam (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) merupakan tanaman herbal yang banyak mengandung polifenol flavonoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas toksisitas dan karakterisasi isolat dari fraksi etil asetat biji anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan LC-MS/MS. Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan metode ultrasonik dengan menggunakan komposisi pelarut metanol : air : HCl (70 : 29 : 1) (v/v) pada frekuensi 20 kHz selama 20 menit. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian difraksinasi menggunakan etil asetat. Kemudian fraksi etil asetat dipisahkan dengan KLT-P untuk mendapatkan isolat. Setelah itu, fraksi etil asetat dan isolat KLT-P diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya, isolat dikarakterisasi menggunakan LC-MS/MS yang digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa yang terkandung dalam isolat KLT-P.

Toksisitas fraksi etil asetat memberikan hasil nilai LC_{50} sebesar 6,422 ppm dan isolat KLT-P sebesar 8,531 ppm. Nilai LC_{50} ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan isolat KLT-P berpotensi untuk dikembangkan sebagai antikanker. KLT-P menghasilkan isolat 3 yang diduga flavonoid antosianidin pada R_f 0,663 dengan warna merah jingga. Hasil spektrum UV-Vis fraksi etil asetat memberikan λ_{max} pada 549,9 nm yang menunjukkan adanya kandungan flavonoid proantosianidin, sedangkan isolat KLT-P tidak menunjukkan λ_{max} pada rentang 540-550 nm yang diduga tidak mengandung flavonoid proantosianidin. Hasil LC-MS/MS dari isolat KLT-P menghasilkan senyawa flavonoid jenis catechin, prodelphinidin A1, flavonols, 2-hydroxyflavanone, nilai m/z secara berurutan adalah 290,2648; 608,3788; 238,1430; dan 240,0308.

ABSTRACT

Fadhila, Salma Iza. 2021. **Toxicity Test dan Characterisation of Isolate Compounds From Ethyl Acetate Fraction Of Bali Grape Seeds (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) Using LC-MS/MS Method.**Departement of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I : Elok Kamilah Hayati, M. Si.; Supervisor II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

Keywords : black grape seed, flavonoids, UV-Vis, LC-MS/MS

Black Grape Seed (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) is a herbal plant that contains many polyphenol such as flavonoids compounds. The purpose of this study was to determine the toxicity activity of proanthocyanidin isolate from ethyl acetate fraction of Bali grape seeds (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The extraction of the active compound was carried out by the ultrasonik method using a solvent composition of methanol: water: HCl (70: 29: 1) (v/v) at frequency of 20 kHz for 20 minutes. The crude extract obtained then fractionated using ethyl acetate. Then, ethyl acetate fraction separated by PTLC to obtain isolate. After that, ethyl acetate fraction and isolate of PTLC were tested using a UV-Vis spectrophotometer, and LCMS/MS was used to analyze the presence of flavonoid in PLTC isolate.

The toxicity of ethyl acetate fraction give LC_{50} value result is 6,422 ppm and PTLC isolate is 8,531 ppm. This LC_{50} value indicates that ethyl acetate fraction and PTLC isolate has the potential as anticancer. PTLC resulted in isolate 3 of suspected flavonoids proanthocyanidin at an R_f of 0.663 with orange red color. UV-Vis spectrum results of ethyl acetate fraction give λ_{max} at 549,9 nm which indicated that there was proanthocyanidin content, while PTLC isolate did not show λ_{max} in the 540-550 nm range. The LC-MS/MS results of PTLC isolate produce an another type of flavonoids such as catechin, prodelfinidin A1, flavonols, 2-hydroxyflavanone, m/z value sequentially are 290,2648; 608,3788; 238,1430; and 240,0308.

مُلخَصُ البَحْثِ

فَضِيلَةٌ، سَلَمَى عِرَّةَ. ٢٠٢١. اِخْتِبَارُ السَّمِيَّةِ الْمُنْفَصِلِ جِزْءِ خِلَاتِ الْإِيثِيلِ لِبَدُورِ عِنَبِ بَالِي (Vitis vinifera L.Var. Alphonso Lavallee) بِاسْتِخْدَامِ LC-MS /MS. قَسْمُ الْكِيمِيَاءِ بِكَلْبَةِ الْعُلُومِ وَالتَّكْنَوُلُوجِيَا الْجَامِعَةِ الْإِسْلَامِيَّةِ الْحُكُومِيَّةِ مَوْلَانَا مَالِكِ إِبْرَاهِيمِ مَالَانَج. الْمَشْرِفَةُ الْأُولَى: إِيْلُوكُ كَامِلَةٌ حَيَاتِي الْمَاجِسْتِير. الْمَشْرِفُ الثَّانِي: دُكْتُورُ م مُخْلِصُ فَحْرُ الدِّينِ الْمَاجِسْتِير.

الكَلِمَةُ الْمِفْتَاحِيَّةُ: بَدُورُ الْعِنَبِ الْأَسْوَدِ، الْفَلَاوُونِيْدُ، LC-MS /MS، UV-Vis،

بَدُورُ الْعِنَبِ الْأَسْوَدِ (Vitis vinifera L.Var. Alphonso Lavallee) هِيَ نَبَاتَاتٌ عُشْبِيَّةٌ تَحْتَوِي عَلَى الْكَثِيرِ مِنْ مُرَكَّبَاتِ الْبُولِيْفِينُولِ الْفَلَاوُونِيْدِ. كَانَ الْعَرَضُ مِنْ هَذَا الْبَحْثِ هُوَ تَحْدِيدُ نَشَاطِ السَّمِيَّةِ وَتَوْصِيْفِ الْعُرْلَاتِ مِنْ جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ مِنْ بَدُورِ عِنَبِ بَالِي (Lavallee Vitis vinifera L.Var.Alphonso) بِوَاسِطَةِ LC-MS /MS. تَمَّ إِجْرَاءُ اسْتِخْلَاصِ الْمُرَكَّبِ النَّشِطِ بِطَرِيقَةِ الْمَوْجَاتِ فَوْقَ الصَّوْتِيَّةِ بِاسْتِخْدَامِ تَرَكِيْبَةِ مُذِيبٍ مِنَ الْمِيْنَانُولِ: الْمَاءُ: HCl (١:٢٩:٧٠) (v / v) بِتَرْدُدٍ ٢٠ كِيْلُو هَرْتِزٍ لِمُدَّةٍ ٢٠ دَقِيْقَةً. تَمَّ بَعْدَ ذَلِكَ بَحْثُهُ الْمُسْتَخْلَصِ الْحَامِ النَّاتِجِ بِاسْتِخْدَامِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ. ثَمَّ تَمَّ فَصْلُ جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ بِوَاسِطَةِ KLTP لِلْحُصُولِ عَلَى عُرْلَاتٍ. بَعْدَ ذَلِكَ، تَمَّ تَحْدِيدُ جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ وَعُرْلِ KLTP بِاسْتِخْدَامِ مَقْيَاسِ الطَّيْفِ الصَّوْتِيِيِّ UV-Vis. عِلَاوَةً عَلَى ذَلِكَ، تَمَّ تَمْيِيزُ الْعُرْلَاتِ بِاسْتِخْدَامِ LC-MS /MS الَّذِي تَمَّ اسْتِخْدَامُهُ لِتَحْلِيلِ الْمُرَكَّبَاتِ الْمَوْجُودَةِ فِي عُرْلَةِ KLTP.

يَنْبُجُ عَنْ سَمِيَّةِ جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ قِيْمَةٌ LC. تَبْلُغُ ٦٤٢٢ جِزْءٍ فِي الْمِيْلِيُونِ وَنَعْرُلُ KLTP الْبَالِغِ ٨.٥٣١ جِزْءٍ فِي الْمِيْلِيُونِ. قِيْمَةُ LC. هَذَا تُشِيرُ إِلَى أَنَّ جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ وَعُرْلِ KLTP هُمَا الْقُدْرَةُ عَلَى تَطْوِيرِهَا كَمُضَادٍ لِلسَّرْطَانِ. اُنْتَجَتْ KLTP الْعُرْلَةُ ٣ الَّتِي يَسْتَبِيهِ فِي أَنَّهَا أَنْثُوسِيَانِيْدِيْنِ فَلَافُونِيْدِ عِنْدَ Rf ٠,٦٦٣، بِلَوْنِ أَحْمَرَ بُرْتُقَالِيٍّ. تُعْطِي نَبِيْجَةً جِزْءِ أَسِيْنَاتِ الْإِيثِيلِ مِنْ طَيْفِ الْأَشْعَةِ الْبَنْفَسَجِيَّةِ عَلَى ٥٤٩,٩ λ_{max} الْمَرِيئِيَّةِ وَفَوْقَ عِنْدَ ٥٤٩,٩ نَانُومَتْرٍ مِمَّا يَدُلُّ عَلَى أَنَّهُ يَحْتَوِي عَلَى فَلَافُونِيْدِ بَرُوانْتُوسِيَانِيْدِيْنِ، بَيْنَمَا أَظْهَرَتْ عُرْلَاتُ KLTP λ_{max} فِي النَّطَاقِ ٥٤٠-٥٥٠ نَانُومَتْرٍ وَالَّذِي يُزَعَمُ أَنَّهُ لَا يَحْتَوِي عَلَى فَلَافُونِيْدِ بَرُوانْتُوسِيَانِيْدِيْنِ. اُنْتَجَتْ

نتائج LC-MS /MS من عزلات KLTP مركبات الفلافونويد من نوع كاتشين، بروديلفينيدين 1A
فلافونول، 2-هيدروكسي فلافانول، وكانت قيم m/z على التوالي 290.2648 ؛ 608.3788 ؛
238.1430 ؛ و 240.0308

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini dunia farmasi dan kesehatan telah banyak berfokus pada pencarian obat-obat baru dari metabolit sekunder tanaman herbal sebagai zat aktif untuk menyembuhkan berbagai penyakit (Sochorova *et al.*, 2020). Dalam salah satu studi Organisasi Kesehatan Dunia, diperkirakan 80 persen populasi negara berkembang bergantung pada obat-obatan tradisional. Bahkan banyak juga diantara obat-obatan modern yang memiliki komposisi dasar yang berasal dari tumbuhan herbal dan obat-obatan ini lebih disukai karena berbagai alasan antara lain ketersediaan mudah, efek sampingnya paling sedikit, harga murah, ramah lingkungan dan khasiat penyembuhannya yang tahan lama (Kumar & Nautiyal, 2013).

Limbah biji anggur yang dihasilkan dari industri pembuatan minuman anggur sebesar $\pm 15\%$. Limbah biji anggur dapat diolah lebih lanjut untuk dimanfaatkan (Canbay dan Belgin, 2011). Anggur (*Vitis vinifera*) adalah salah satu tanaman buah di dunia yang memiliki tingkat produksi tinggi, yaitu sekitar 75 juta ton/tahun (FAO-OIV, 2016). Anggur diketahui sebagai salah satu tanaman yang mengandung beberapa polifenol berkhasiat. Sekitar 60-70% polifenol dari anggur terdapat pada bijinya (Shi *et al.*, 2003). Biji anggur mengandung berbagai komponen monomer fenolik seperti katekin, epikatekin, dan epikatekin-3-Ogallat (Kim *et.al.*, 2006). Polifenol yang banyak terdapat pada biji anggur diantaranya adalah proantosianidin, antosianin dan resveratrol. Pada umumnya biji anggur

mengandung 74-78% oligometrik proantosianidin (Canbay dan Belgin, 2011).

Polifenol yang terdapat pada ekstrak biji anggur mempunyai aktivitas biologi yang bermanfaat untuk kesehatan yaitu dapat menghambat berbagai penyakit dan mempunyai efek yang berpotensi sebagai zat efek mutagenik antioksidan, antikanker, antiinflamasi, anti-aging, antivirus antimikroba dan antikanker (Xia *et al.*, 2010). Biji anggur sebagai salah satu dari keanekaragaman hayati yang dapat digunakan dan dimanfaatkan sebagai bahan obat oleh masyarakat baik untuk menjaga kesehatan, mencegah ataupun mengobati penyakit adalah karunia Allah yang patut disyukuri. Firman Allah SWT yaitu :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْزَلْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya : *“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. As-Syu'ara' : 7).*

Ayat Al-Qur'an diatas menerangkan bahwasanya Allah SWT telah menciptakan bumi yang didalamnya terdapat beranekaragam tumbuh-tumbuhan dengan segala manfaat dan khasiatnya masing-masing. Dalam tafsir Al-Misbah (2001) dijelaskan bahwa manusia akan terus mempertahankan kekufuran dan pendustaan serta tidak merenungi dan mengamati sebagian ciptaan Allah yang ada di bumi. Padahal sebenarnya, jika manusia bersedia merenungi dan mengamati hal itu, niscaya mereka akan mendapatkan petunjuk dan bersyukur atas segala yang telah Allah ciptakan. Kamilah yang mengeluarkan daribumi ini beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Dan itu semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Maha Esa dan Maha Kuasa.

Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavalle) dipilih dikarenakan merupakan salah satu varietas unggul yang terdapat di Indonesia. Anggur Bali (*Vitis vinifera* L.Var Alphonso Lavalle) diketahui memiliki kandungan fenolik, katekin,antosianin, dan prosianidin yang tinggi (Lestari, 2017). Anggur tersebut dibudidayakan di Buleleng, Bali. Buleleng merupakan sentra produksi anggur terbesar di Indonesia yang memiliki luas lahan sebesar \pm 808 ha dan hasil produksi sekitar \pm 10.000 ton pertahun (Sumiarta, 2013).

Selama ini proses ekstraksi biji tanaman banyak dilakukan dengan metode maserasi karena dianggap sebagai metode konvensional yang paling mudah untuk dilakukan. Namun, kuantitas dan kualitas ekstrak yang diperoleh masih tergolong rendah serta waktu yang dibutuhkan cukup lama. Perolehan kadar fenol dan flavonoid dapat ditingkatkan menggunakan *ultrasonic assisted extraction*. Metode ekstraksi ultrasonik dipilih berdasarkan keunggulan yang dimiliki seperti efisiensi ekstraksi tinggi, mampu meningkatkan reprodutifitas jumlah rendemen kasar, konsumsi pelarut rendah, pengoperasian mudah, rendahbiaya dan rendah polusi terhadap lingkungan (Tao, *et al.*, 2014). Metode ini telah terbukti meningkatkan rendemen serta kadar fenolik dan flavonoid pada ekstraksi biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee).

Berdasarkan penelitian Xu, Changmou., *et al* (2010) hasil ekstraksi biji Anggur Bali (*Vitis vinifera*) menggunakan ekstraksi biji anggur untuk mengetahui kuantitas total polifenol dengan metode maserasi menghasilkan asam galat 77,4 mg/g sampel selama 100 menit dan metode ultrasonik menghasilkan asam galat 82,2 mg/g sampel selama 20 menit. Asam galat pada penelitian ini sebagai ukuran suatu kuantitatif total fenol (total polifenol), sedangkan hubungannya dengan

flavonoid yaitu dimana flavonoid merupakan golongan dari senyawa fenol (polifenol). Penelitian lain yang menunjukkan keunggulan ultrasonik juga ditunjukkan dari hasil penelitian oleh Centeno, *et al* (2014) ekstraksi ultrasonik dengan waktu 3, 4 dan 8 kali lebih singkat dari proses ekstraksi konvensional maserasi (60 menit) pada biji dan kulit anggur diperoleh hasil total polifenol biji anggur melalui hasil ekstraksi ultrasonik (99,7 mg GAE/g sampel) sebanding dengan ekstraksi maserasi dari (99,0 mg GAE/g sampel).

Faktor utama untuk optimasi metode ekstraksi ultrasonik dipengaruhi oleh pemilihan pelarut dan waktu ekstraksi dalam mensintesis senyawa flavonoid dalam biji anggur. Pada penelitian Eguez, *et al* (2021) menyebutkan bahwa pada variasi waktu ekstraksi 5-20 menit diperoleh kondisi yang memungkinkan untuk ekstraksi yang menghasilkan total senyawa fenolik tertinggi adalah pada waktu 20 menit yaitu sebesar 3.61 mg GAE/g. Penelitian oleh Wijaya (2021) yang melakukan ekstraksi menggunakan metode ultrasonik pada biji Anggur Bali dengan variasi pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1), aseton: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) dan etanol: air: asam asetat (70: 29,5: 0,5) menghasilkan randemen ekstrak terbaik pada pelarut metanol: air: HCl (70: 29: 1) yaitu sebesar 42,18%.

Hasil dari ekstrak ultrasonik biji anggur dimungkinkan masih mengandung berbagai senyawa yang sifatnya polar sesuai dengan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi yaitu metanol: air: HCl (70: 29: 1). Pemisahan senyawa metabolit sekunder pada penelitian ini dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2N, dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan etil asetat. Senyawa katekin yang merupakan jenis monomer flavonoid, proantosianidin dan oligomernya memiliki polaritas lemah yang sama dengan etil asetat (Yin, *et al.*, 2011). Sifat kepolaran

yang sama ini memungkinkan senyawa-senyawa tersebut dapat larut ke fase etil asetat secara maksimal.

Pemisahan senyawa flavonoid dalam fraksi biji anggur dapat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pemisahan dilakukan dengan metode KLT sebab metode ini merupakan metode yang mudah, cepat, serta dapat memisahkan senyawa multi komponen secara kualitatif dan kuantitatif (Oktaviantari dkk., 2019). Berdasarkan penelitian Wijaya (2021) komposisi eluen fase gerak KLT yang menghasilkan pemisahan terbaik pada ekstrak biji anggur adalah toluena : asam asetat : aseton (3:1:3). Komposisi eluen yang digunakan memiliki perbandingan sama antara toluena yang bersifat nonpolar dengan struktur hidrokarbon aromatik dan aseton yang bersifat semipolar dengan gugus alkil dan ketonnya sehingga menjadikan eluen bersifat semipolar ke arah nonpolar. Hal ini menyebabkan senyawa flavonoid yang bersifat polar-semipolar akan lebih terdistribusi ke fase diam (plat silika gel) yang memiliki sifat polar.

Nilai toksisitas merupakan salah satu parameter awal yang harus diketahui di dalam topik penelitian pengembangan bahan alam sebagai bahan biofarmaka. Hasil penelitian Mutia (2010) menyatakan bahwa senyawa-senyawa golongan flavonoid dari tanaman anggur memiliki potensi toksisitas. Salah satu metode yang sering digunakan untuk uji toksisitas adalah dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Uji toksisitas menggunakan metode BSLT digunakan untuk menentukan nilai potensial suatu senyawa sebagai racun dengan melihat tingkat toksisitas suatu ekstrak (Puspitasari dkk., 2018). Metode yang umum digunakan untuk perhitungan BSLT adalah menggunakan *Lethal*

Concentration 50 (LC_{50}) yaitu suatu cara untuk menentukan keaktifan suatu ekstrak atau senyawa dengan melihat presentase kematian pada hewan uji larva udang *Artemia salina* sebanyak 50%. Apabila diperoleh nilai $LC_{50} < 30$ ppm pada fraksi etil asetat biji anggur maka dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat biji anggur bersifat sangat toksik, sehingga dapat dikembangkan sebagai obat antikanker (Lestari dkk., 2019).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wijaya (2021) tentang uji toksisitas ekstrak kasar metanol: air: asam asetat (70:29,9:0,1) secara ultrasonik selama 20 menit pada biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan metode BSLT didapatkan hasil nilai LC_{50} dari ekstrak biji Anggur Bali sebesar 15,67 ppm. Penelitian oleh Atolani *et al.*, (2012) yang melakukan uji toksisitas dengan metode BSLT pada ekstrak soxhlet selama 5 jam pada biji anggur menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 12,76 ppm. Penelitian Mutia (2010) menguji toksisitas dari ekstrak soxhlet buah anggur lokal menggunakan metode BSLT dengan waktu inkubasi selama 1 hari menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 648.004 ppm.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait pemisahan senyawa flavonoid dan aktivitas toksisitas biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh potensi toksisitas dari isolat fraksi etil asetat biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) yang diuji dengan metode BSLT untuk dikembangkan sebagai bahan alam obat herbal. Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi ultrasonik dengan komposisi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) dengan waktu ekstraksi 20 menit. Kemudian, ekstrak pekat yang diperoleh

dilakukan fraksinasi untuk pemisahan senyawa aktif flavonoid dengan pelarut etil asetat. Lalu, dilakukan isolasi senyawa aktif dengan KLT Preparatif sehingga dihasilkan isolat fraksi etil asetat. Isolat fraksi etil asetat selanjutnya akan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan dilakukan uji toksisitas pada isolat fraksi etil asetat hasil ekstrak ultrasonik biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee). Selanjutnya, dilakukan karakterisasi isolat dengan LC-MS/MS.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah :

1. Berapa nilai aktivitas toksisitas isolat hasil KLTP dan fraksi etil asetat biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa pada fraksi etil asetat biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis?
3. Bagaimana hasil identifikasi senyawa pada isolat KLTP biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini berdasarkan rumusan masalah tersebut adalah :

1. Mengetahui aktivitas toksisitas isolat hasil KLTP dan fraksi etil asetat biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan metode

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).

2. Mengetahui hasil identifikasi senyawa pada fraksi etil asetat biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
3. Mengetahui hasil identifikasi senyawa pada isolat KLTP biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS/MS.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel Anggur yang dianalisis berasal dari Buleleng, Bali.
2. Senyawa yang akan dianalisis dan diidentifikasi hanya senyawa golongan flavonoid yang ada pada biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee).
3. Ekstraksi secara ultrasonik menggunakan komposisi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (v/v) selama 20 menit.
4. Ekstraksi cair-cair dilakukan menggunakan metode fraksinasi dengan pelarut etil asetat.
5. Metode yang digunakan untuk uji aktivitas toksisitas adalah dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).
6. Instrumen yang digunakan untuk identifikasi isolat adalah LC-MS/MS

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang isolat fraksi etil asetat senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid biji Anggur Bali

(*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) yang memiliki aktivitas toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach sehingga kedepannya dapat dikembangkan lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)

2.1.1 Definisi Anggur Bali

Buah Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) memiliki ciri-ciri berwarna biru kehitaman, kulit yang tebal dan rasanya yang asam. Jenis anggur ini memiliki buah dengan warna hitam keunguan dan tergolong ke dalam *black variety* (varietas anggur hitam). Anggur Bali ini juga dikenal dengan nama “*Ribier*” dan dapat dimanfaatkan sebagai buah segar (*table grape*) ataupun wine (*wine grape*) (Astawa dkk, 2008). Buah Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) banyak ditanam di daerah dataran rendah seperti di daerah Jawa Timur (Probolinggo, Pasuruan, Situbondo), Bali dan Kupang (NTT) (Zubaidah dan Veronica, 2014).

Anggur Var Alphonso Lavallee adalah salah satu varietas unggul yang ada di Indonesia. Kandungan *phenolic*, *antocyanin*, *catechin*, dan *procyanidin* pada anggur varietas ini tinggi dan banyak terdistribusi pada biji anggurnya. Hasil penelitian Lestari dkk., (2017) menunjukkan bahwa biji anggur Var Alphonso Lavallee mengandung fenol sebanyak $105,3 \pm 6,1$ mg GAE (*Gallic Acid Equivalents*)/g.

Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tanaman yang memiliki beraneka ragam bentuk serta jenisnya, salah satunya yaitu anggur. Berbagai bentuk, warna, dan rasa pada anggur membuktikan keagungan ciptaan Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam QS. An-Nahl ayat 11 :

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّعَٰقِلِينَ (١١)

Artinya : “*Dengan (air hujan) itu Dia menumbuhkan untukmu tumbuh-tumbuhan, zaitun, kurma, anggur, dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berpikir.*” (QS. An-Nahl : 11).

Dalam tafsir Al-Azhar oleh Hamka, Buya (2007) ayat tersebut memiliki makna bahwa tumbuhan ditumbuhkan oleh Allah untuk kamu dengan perantara air. Dari air tumbuh berbagai tumbuh-tumbuhan, buah zaitun, kurma, anggur-anggur dan dari tiap-tiap macam buah-buahan. Semua buah-buahan itu tumbuhnya sangat bergantung pada air. Dan aneka ragam buah-buahan itu sangat diperlukan oleh manusia. Sebab itu “*Sesungguhnya pada yang demikian itu adalah tanda bagi kaum yang berpikir.*” Buah-buahan yang beraneka ragam, di barat dan di timur, semuanya tumbuh diatas bumi dan disiram oleh hanya sebuah air, namun dia menjadi buah-buahan yang memiliki berbagai ragam jenis dan rasa. Kita memikirkan kekuasaan Allah dari sudut ini dan dengan melihat segala ciptaan-Nya kita dapat meyakini akan kekuasaan-Nya, bahwasanya segala sesuatu tidaklah terjadi dengan kebetulan. Setelah disebutkan hubungan air hujan dengan segala yang hidup di bumi, manusia, kayu dan pohon, tumbuh-tumbuhan, binatang ternak, kita diminta untuk berpikir lebih mendalam atas segala kuasa Allah.

2.1.2 Klasifikasi Anggur Bali

Anggur Bali memiliki klasifikasi sebagai berikut (Setiadi, 2005) :

Kingdom : Plantae

Division : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Vitales
Family : Vitaceae
Genus : Vitis
Species : *Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee

2.1.3 Morfologi Anggur

Jenis *Vitis vinifera* memiliki daun tipis, berbentuk bulat, berwarna merah kehitaman dan tidak berbulu. Bentuknya seperti berry yang tumbuh menjuntai dan dapat langsung dimakan. Kulit buahnya tipis dan halus karena dilapisi dengan lapisan lilin halus. Dagingnya seperti bulir yang mengandung banyak air dengan 4 buah biji atau lebih di dalamnya (Liang dan Drohojowski, 2008). Bentuk buah Anggur Bali hitam dapat dilihat pada Gambar 2.1.



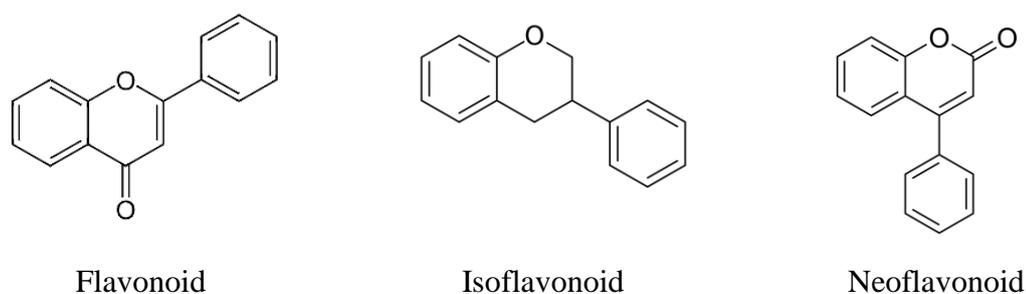
Gambar 2.1 Anggur Bali

2.1.4 Kandungan Senyawa pada Biji Anggur

Biji anggur kaya akan sumber senyawa flavonoid. Flavonoid mempunyai kerangka dasar 15 atom karbon yang terdiri dari dua cincin benzena (C_6) yang

terikat pada suatu rantai propana (C_3) membentuk susunan $C_6-C_3-C_6$. Susunan tersebut dapat menghasilkan tiga jenis struktur yaitu 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid dan 1,1- diarlilpropan atau neoflavonoid. Flavonoid merupakan senyawa fenol terbesar yang ditemukan dengan tingkat hidroksilasi, alkoksilasi dan glikosilasi pada strukturnya (Kristanti, dkk., 2008).

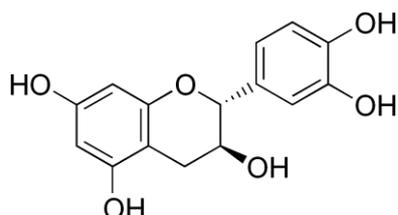
Pengelompokan senyawa flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksilnya. Struktur senyawa flavonoid ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Flavonoid

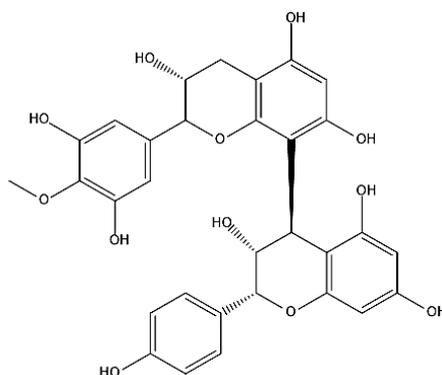
Senyawa golongan flavonoid yang banyak terkandung pada biji anggur adalah senyawa katekin monomerik, epikatekin, gallic acid, polimerik dan oligomerik prosianidin (Arnous dan Mayer, 2008; Fine, 2000). Senyawa katekin merupakan salah satu senyawa yang terdapat pada biji anggur. Katekin biasanya disebut juga dengan asam katekoat dengan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$. Katekin merupakan senyawa yang sangat larut dalam air panas (Fakhri, A. 2010). Katekin, juga disebut flavanol atau flavan-3-ols, adalah sub-kelompok flavonoid yang ditemukan dalam beberapa tumbuhan. Katekin yang umum ditemukan antara lain catechin, epicatechin (EC), epicatechin gallate (EKG), epigallocatechin (EGC),

dan epigallocatechin gallate (EGCG). Katekin banyak menarik minat karena tingginya aktivitas biologisnya. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa katekin juga memiliki aktivitas antikarsinogenik di banyak sistem eksperimental (Chen, *et.al*, 2020). Struktur katekin dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur Katekin

Katekin dapat membentuk oligomer maupun polimer yang biasa disebut dengan senyawa proantosianidin. Proantosianidin juga merupakan salah satu senyawa yang banyak terdapat pada biji anggur. Proantosianidin (PACs) adalah konjugat oligomer kombinasi keempat isomer (\pm) -catechin dan (\pm) -epicatechin (Villani, 2015). Proantosianidin memiliki oligomer dan polimer dari 2 sampai 50 unit flavonoid yang dihubungkan oleh rantai karbon sehingga tidak mudah terhidrolisis. Prosianidin terdiri dari epikatekin dan katekin sedangkan prodelfinidin terdiri dari epigalokatekin dan galokatekin (Handaya, 2008). Struktur proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur Proantosianidin

Berdasarkan penelitian Zhang, *et.al.* (2017) tentang analisis flavonoid mulai dari monomer hingga polimernya dalam bentuk proantosianidin pada beberapa tanaman yang salah satunya merupakan biji anggur (*Vitis vinera*). Diperoleh nilai total konsentrasi mono, di, tri, tetra, penta, hexa, oktameternya yaitu diperoleh nilai tertinggi pada monomernya yang dimungkinkan adalah monomer katekin sebesar 13109 mg/100 g. Kandungan tertinggi lainnya ditunjukkan pada dimer yaitu prosianidin yaitu sebesar 8894 mg/100 g.

2.2 Teknik Pemisahan Senyawa Aktif Flavonoid Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee)

2.2.1 Ekstraksi Ultrasonik

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan kelarutannya. Sifat kelarutan zat didasarkan pada prinsip *like dissolves like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2008). Pemilihan pelarut yang sesuai merupakan faktor penting dalam proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah pelarut yang dapat melarutkan sebagian besar metabolit sekunder yang diinginkan dalam sampel (Lenny, 2006).

Akhir-akhir ini telah dikembangkan teknik baru untuk ekstraksi padat-cair suatu produk yaitu dengan menggunakan bantuan gelombang ultrasonik. Teknik ini dikenal dengan sonokimia yaitu pemanfaatan efek gelombang ultrasonik. Ekstraksi ultrasonik merupakan sebuah metode ekstraksi yang menggunakan energi gelombang ultrasonik pada frekuensi antara 20-100 kHz yang merambat pada media cairan sehingga menimbulkan efek kavitasi. Efek kavitasi adalah proses pembentukan gelembung-gelembung mikro yang mampu memecah dinding

sel sehingga pelarut akan berdifusi dalam sel dan senyawa yang ada didalam sel akan keluar dan terekstraksi (Tzanova, 2020).

Keuntungan utama dari ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik dibandingkan dengan ekstraksi konvensional menggunakan maserasi yaitu efisiensi lebih besar dan waktu operasinya lebih singkat (Fuadi, 2012). Teknologi maserasi umumnya berjalan lambat dan menghasilkan rendemen dan kualitas yang rendah. Diperlukan metode ekstraksi yang lebih cepat salah satunya dengan ekstraksi berbantu ultrasonik (*ultrasonic-assisted extraction* (UAE)). UAE sudah dikenal luas dan efektif dalam meningkatkan efektifitas dan efisiensi proses ekstraksi. Baihaki (2017) membuktikan bahwa UAE sonikasi langsung mampu meningkatkan rendemen dan efisiensi proses ekstraksi pala. Ekstraksi berbantu ultrasonik pada biji pala menghasilkan ekstrak komponen yang lebih banyak (62-79 komponen) dibandingkan dengan ekstraksi maserasi (42 komponen) (Budiastra, 2018).

Perolehan kadar fenol dan flavonoid dapat ditingkatkan menggunakan *ultrasonik assisted extraction*. Metode ini telah terbukti meningkatkan rendemen serta kadar fenolik dan flavonoid pada ekstraksi biji anggur (*Vitis vinifera* L.) Berdasarkan penelitian Xu, Changmou *et.al* (2010) hasil ekstraksi biji anggur (*Vitis vinifera* L.) menggunakan metode ekstraksi ultrasonik dengan waktu 20 menit menggunakan pelarut metanol/air/HCl (70:29:1) dikatakan merupakan komposisi paling efektif untuk ekstraksi pada biji anggur yang menghasilkan kadar *yield* total phenol sebesar 84,7 mg GAE/gDM; 73,9 mg PAE/gDM untuk total flavonol, dan 69,8 mgPAE/g DM untuk proantosianidin.

2.2.2 Ekstraksi Cair-Cair dengan Etil Asetat

Ekstraksi cair-cair merupakan salah satu metode fraksinasi. Fraksinasi adalah proses pemisahan komponen-komponen dalam ekstrak berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran. Tujuannya dari ekstraksi ini adalah memperoleh ekstrak yang lebih spesifik sifat kepolarannya. Prinsip metode ekstraksi cair-cair didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu. Hasil ekstraksi yang baik diperoleh dengan dilakukannya ekstraksi secara berulang-ulang dengan penambahan jumlah pelarut sedikit demi sedikit (Khopkar, 2008). Kelebihan metode ekstraksi cair-cair adalah dapat memperoleh komponen bioaktif yang lebih spesifik dan waktunya ujinya cepat (Dewi, dkk., 2010).

Senyawa flavonoid banyak yang mudah larut dalam air sehingga pengekstraksian kembali larutan dalam air tersebut dapat dilakukan dengan pelarut organik yang tidak bercampur dengan air tetapi sifatnya agak polar (semi-polar). Pelarut organik yang dipilih untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai kelarutan rendah dalam air (< 10 %) dan dapat menguap sehingga memudahkan penghilangan pelarut organik setelah dilakukan ekstraksi. Pelarut untuk pengekstraksian kembali senyawa flavonoid yang terlarut dalam air salah satunya adalah etil asetat (Sari dan Taufiqurrohmah, 2006).

Ekstraksi cair-cair adalah salah metode utama untuk mengisolasi flavonoid dari biji anggur. Semakin tinggi jumlah gugus hidroksil yang ditemukan pada suatu jenis golongan flavonoid, menyebabkan senyawa tersebut semakin mudah diekstraksi dengan menggunakan jenis ekstraksi cair-cair. Etil asetat adalah pelarut yang paling umum digunakan dalam metode ekstraksi ini. Metode ekstraksi lainnya yang menggunakan pelarut metanol, etanol, dan aseton telah terbukti

efektif, tetapi tidak seefektif menggunakan etil asetat dalam mengekstrak senyawa golongan flavonoid pada biji anggur (Liu dan White, 2012). Hal ini dikarenakan sifat etil asetat yang mudah menguap dan memiliki kelarutan dalam air 8,7% sehingga pada konsentrasi etil asetat yang tinggi kadar air yang terkandung dalam etil asetat rendah (Ocktaviandini, 2015).

2.2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu jenis kromatografi yang digunakan untuk mendapatkan isolat senyawa yang diinginkan dengan menggunakan eluen terbaik. Menurut (Gritter, 1991) Kromatografi lapis tipis adalah kromatografi serapan yang memiliki fasa tetap (diam) berupa zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fasa gerak berupa zat cair yang disebut larutan pengembang. Penyerap untuk KLT ialah silika gel, alumina, kiselgur, dan selulosa.

Kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan tujuannya dibedakan menjadi 2 yaitu untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa organik dalam jumlah kecil. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, selanjutnya fraksi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan digunakan untuk analisa berikutnya (Sastrohamidjojo, 2005). Pemisahan KLT didasarkan pada perbedaan kecepatan laju beberapa zat terlarut yang berbeda yang dibawa naik oleh eluen. Analisis secara kualitatif KLT digunakan untuk uji identifikasi senyawa. Identifikasi senyawa akan diambil dari jarak yang ditempuh oleh senyawa yang dipisahkan dibandingkan dengan laju pelarutnya. Parameter

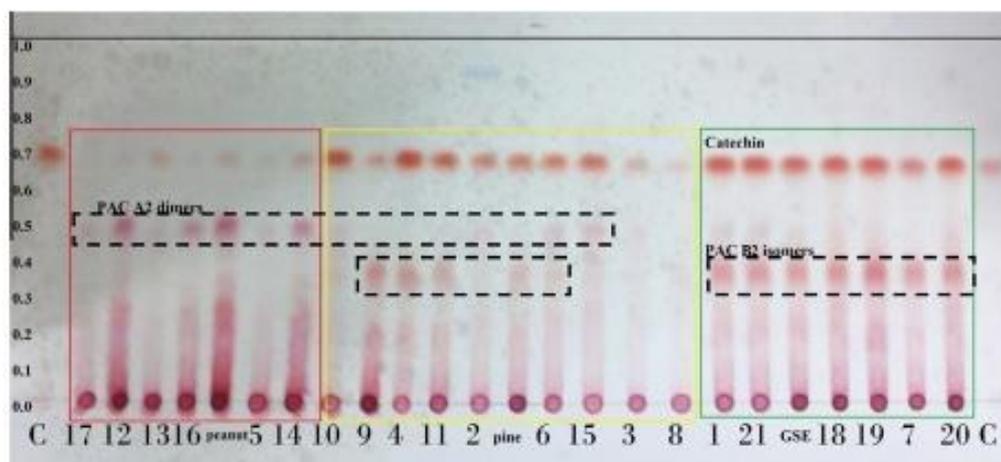
yang digunakan untuk uji identifikasi adalah nilai Rf (Gandjar dan Rohman, 2007).

Harga Rf untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga Rf standart.

Harga Rf dapat dihitung dengan rumus berikut (Sastrohamidjojo, 2005) :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \quad (2.1)$$

KLT merupakan teknik yang cepat, sederhana, dan murah untuk digunakan untuk membedakan ekstrak biji anggur murni dari campurannya. Metode KLT dalam hal ini diterapkan untuk memisahkan senyawa flavonoid. Gambar 2.4 menunjukkan bahwa beberapa noda terbentuk pada pemisahan senyawa menggunakan KLT dengan eluen aseton: asam asetat: toluena yaitu pada Rf 0,4 diduga dimer B2 antosianidin, pada Rf 0,5 diduga dimer A2 dan pada Rf 0,7 diduga senyawa katekin (Villani, 2015).



Gambar 2.5 Hasil Pemisahan Senyawa dengan KLT pada Ekstrak Biji Anggur menggunakan eluen aseton: asam asetat: toluene (Villani, 2015).

2.3 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultra violet (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer.

Spektrofotometer UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis. Sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibanding kualitatif (Khasanudin, 2018).

Absorpsi cahaya ultraviolet atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Absorpsi radiasi UV oleh senyawa aromatik yang terdiri dari cincin benzena terpadu bergeser ke panjang gelombang yang lebih panjang dengan bertambah banyaknya cincin itu, karena bertambahnya konjugasi dan membesarnya stabilisasi resonansi dari keadaan eksitasi (Fessenden dan Fessenden, 1982).

Metode *Bate-Smith* menggunakan UV-Vis dapat digunakan untuk deteksi senyawa yang mengandung bentuk oligomer dan polimer flavonoid yaitu senyawa proantosianidin. Reaksi *Bate-Smith* didasarkan pada depolimerisasi oksidatif proantosianidin untuk menghasilkan antosianin merah seperti sianidin, delphinidin dan sebagainya. Adanya ion logam transisi selama reaksi alkoholisis adalah faktor kunci untuk meningkatkan intensitas warna yang muncul. Fe^{3+} adalah ion logam transisi yang paling efisien dalam mengkatalis pembentukan warna dalam reaksi butanol-HCl (Wijaya, 2021).

Jumlah gugus fenolik pada cincin A dan B pada struktur flavonoid proantosianidin mempengaruhi panjang gelombang absorbansi maksimum dan koefisien produk antosianidin. PAs menghasilkan pigmen antosianidin dengan reaksi butanol-HCl di mana PAs jenis (epi)katekin dan gallo(epi)katekin menghasilkan sianidin pada λ_{max} pada 547 nm dan delphinidin pada λ_{max} 558 nm. Variasi absorpsi maksimal pada reaksi butanol-HCl antara 540 dan 550 nm. Hal ini

disebabkan oleh jumlah relatif antosianidin (rasio delphinidin terhadap sianidin) yang terbentuk selama hidrolisis asam. Berdasarkan penelitian Ku dan Mun (2007) didapatkan nilai λ_{\max} kulit kayu pinus pada 546 nm, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.6 dapat dianggap sebagai indikasi bahwa unit jenis utama PA sebagian besar terdiri dari sianidin daripada delphinidin.

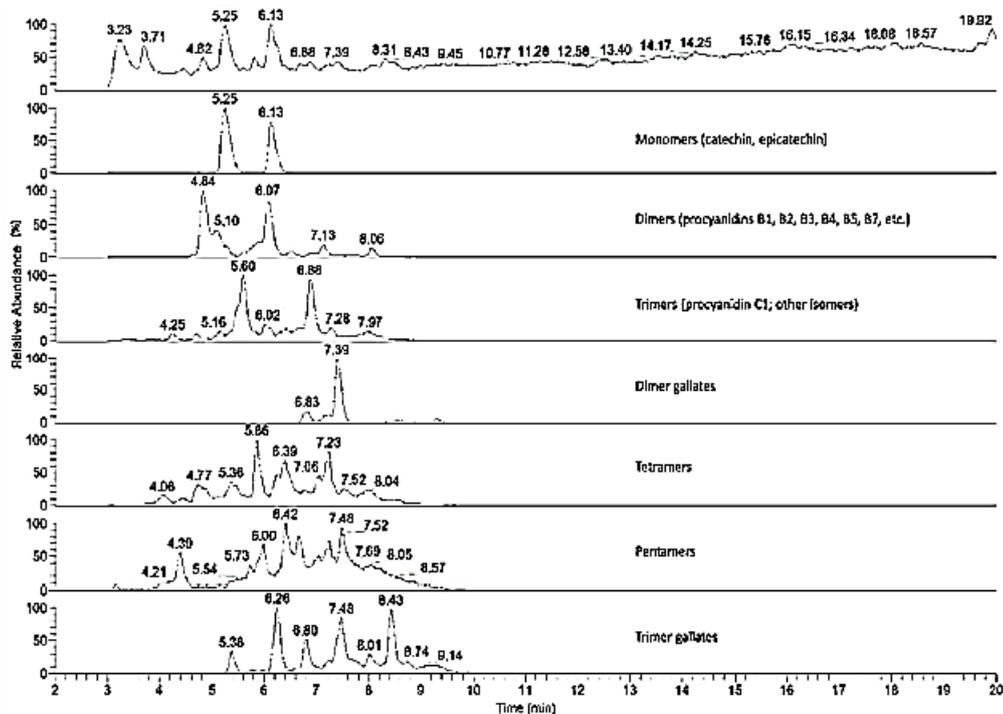
2.4 LC-MS/MS

Analisis data LC-MS/MS akan didapatkan hasil kromatogram berupa alur tinggi peak dan juga didapatkan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak sehingga dapat di ketahui jumlah senyawa yang dikandung setiap sampel. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa.

Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS/MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak). Keuntungan dari LC-MS/MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein (Mangurana dkk., 2019).

Nallathambi *et, al* (2020) telah melakukan karakterisasi polifenol yang ada dalam sediaan ekstrak biji anggur. Analisis spektrum LC-MS/MS mengungkapkan

adanya monomer flavonoid (catekin, epicatekin), dimer (prosyaniidin B1, B2, B3, B4, B5, B7 dll.), trimers, tetramers, pentamers dan galat yang sesuai Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Hasil identifikasi LC-MS/MS ekstrak biji anggur

Zhang *et.al.* (2017) melaporkan hasil identifikasi bentuk monomer flavonoid jenis epiafzelechin, catechin/epicatechin, epiafzelechin gallate dan catechin/epicatechin-gallate. Terdapat juga identifikasi oligomer dan polimer flavonoid jenis proantosianidin. Setiap senyawa memiliki *retention time* yang berbeda. Nilai ion m/z dari tiap jenis mono, di, tri, tetra, penta, hexa, dan oktamer flavonoid dalam berbagai jenis berbeda-beda ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Nilai m/z dari berbagai jenis senyawa flavonoid.

DP	proanthocyanidin	[M-H] ⁻ (m/z)	mol. formula
monomer	epiafzelechin	273.0762	C ₁₅ H ₁₃ O ₅
	catechin/epicatechin	289.0712	C ₁₅ H ₁₃ O ₆
	epiafzelechin gallate	425.0873	C ₂₂ H ₁₇ O ₉
	catechin/epicatechin-gallate	441.0821	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀
dimer	EA/EF—A—EC	559.1240	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₁
	EA/EF—EC	561.1397	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₁
	EC—A—EC	575.1189	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂
	EC—EC	577.1346	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂
	EC—A—EG	591.1139	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₃
	EC—EG	593.1295	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃
	EG—A—EG	607.1088	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₄
	(EA/EF—A—EA/EF)g	695.1401	C ₃₇ H ₂₇ O ₁₄
	(EA/EF—EA/EF)g	697.1557	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₄
	(EA/EF—A—EC)g	711.1350	C ₃₇ H ₂₇ O ₁₅
(EA/EF—EC)g	713.1506	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₅	
trimer	EA—EA—EC	833.2082	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₆
	EA—A—EC—EC	847.1874	C ₄₅ H ₃₅ O ₁₇
	EA/EF—EC—EC	849.2031	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₇
	EC—A—EC—A—EC	861.1666	C ₄₅ H ₃₃ O ₁₈
	EC—EC—A—EC	863.1823	C ₄₅ H ₃₅ O ₁₈
	EC—EC—EC	865.1979	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈
tetramer	EA/EF—EA/EF—EC—EC	1121.2715	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₂
	EA/EF—EC—A—EC—EC	1135.2508	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₃
	EA/EF—EC—EC—EC	1137.2664	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₃
	EC—A—EC—A—EC—EC	1149.2301	C ₆₀ H ₄₅ O ₂₄
	EC—EC—A—EC—EC	1151.2457	C ₆₀ H ₄₇ O ₂₄
	EC—EC—EC—EC	1153.2614	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄
pentamer	EC—EC—A—EC—EC—EC	1439.3091	C ₇₅ H ₅₉ O ₃₀
	EC—EC—EC—EC—EC	1441.3248	C ₇₅ H ₆₁ O ₃₀
hexamer*	EA/EF—EA/EF—EC—EC—EC—EC	1697.3983	C ₉₀ H ₇₃ O ₃₄
	EC—EC—EC—EC—EC—EC	1729.3881	C ₉₀ H ₇₃ O ₃₆
	EC—EC—EC—EC—EG—EG	1761.3780	C ₉₀ H ₇₃ O ₃₈
	(EC—EC—EC—EC—EC—EC)2g	2033.4101	C ₁₀₄ H ₈₁ O ₄₄
octamer*	EC—EC—EC—EC—EG—EG—EG—EG	2305.5149	C ₁₂₀ H ₉₇ O ₄₈

2.5 Larva Udang *Artemia salina* Leach

2.5.1 Klasifikasi *Artemia salina* Leach

Filum : Arthropoda

Class : Crustaceae

Subclass : Branchiopoda

Bangsa : Anostraca
Famili : Artemiidae
Suku : Artemia
Jenis : *Artemia salina* Leach (Sepadan, 2014).



Gambar 2.7 *Artemia salina* Leach

2.5.2 Morfologi

Artemia hidup di danau-danau garam (berair asin) yang ada di seluruh dunia. *Artemia* hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-300 per mil). Suhu yang dikehendaki berkisar antara 25-30°C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3-8,4 (Hafidloh, 2014). *Artemia* merupakan golongan zooplankton yang hidup sebagai planktonik yaitu melayang dalam air. *Artemia* termasuk jenis udang-udangan yang mempunyai ukuran relatif kecil dengan sistem osmoregulasi yang efisien sehingga mampu beradaptasi pada kisaran salinitas yang luas (5-150 ppt) (Harli, 2016).

2.5.3 Penggunaan *Artemia salina* Leach dalam Penelitian

Artemia salina Leach dapat digunakan untuk uji toksisitas dalam ekstrak tanaman yang bersifat toksik. Penelitian menggunakan *Artemia salina* Leach memiliki beberapa keuntungan antara lain cepat, murah, mudah dan sederhana. Penetasan telur *Artemia salina* Leach yang baik perlu memperhatikan beberapa

faktor yaitu: hidrasi, aerasi, penyinaran, suhu, derajat keasaman (pH), dan kepadatan telur dalam media penetasan. Penelitian dengan *Artemia salina* Leach menunjukkan hubungan yang signifikan dari sampel yang bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ternyata juga mempunyai aktifitas sitotoksik. Berdasarkan hal tersebut maka larva *Artemia salina* Leach dapat digunakan untuk uji sitotoksik (Harli, 2016).

2.6 Uji Toksisitas

Toksisitas merupakan kemampuan suatu molekul atau senyawa kimia yang dapat menimbulkan kerusakan pada bagian yang peka didalam maupun dibagian luar tubuh mahluk hidup (Harli, 2016). Uji toksisitas merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendekati tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggraini, 2008).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter LC_{50} (*Lethal Concentration*). Nilai LC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga LC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel

secara spesifik (Amalina, 2008). Uji toksisitas secara kuantitatif dapat ditinjau dari lamanya waktu, yang dapat diklasifikasikan menjadi toksisitas akut, sub akut, dan kronis. Toksisitas akut adalah efek total yang didapat pada dosis tunggal dalam 24 jam setelah pemaparan. Toksisitas akut bersifat mendadak, waktu singkat, biasanya reversibel. Uji toksisitas atas dasar dosis dan waktu spesifik toksisitas akut. Dosis merupakan jumlah racun yang masuk ke dalam tubuh. Besar kecilnya dosis menentukan efek secara biologi (Harli, 2016).

2.7 *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Metode ini memiliki beberapa kelebihan, antara lain biaya relatif murah, sederhana, waktu pelaksanaan cepat, praktis, dan tidak memerlukan teknik perawatan khusus. Jumlah sampel yang digunakan relatif sedikit dan tidak memerlukan peralatan khusus untuk melakukan uji ini (Hafidloh, 2014).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach dapat digunakan sebagai uji sederhana untuk meneliti sitoksisitas suatu senyawa yaitu dengan cara menentukan nilai LC_{50} yang dinyatakan dari komponen aktif suatu simplisia maupun bentuk sediaan ekstrak dari suatu tanaman (Hafidloh, 2014). Penentuan besarnya nilai LC_{50} pada metode BSLT dilakukan selama 24 jam. Data tersebut dianalisis menggunakan probit analisis untuk mengetahui nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi suatu bahan uji yang dapat menyebabkan 50% kematian jumlah hewan uji setelah

perlakuan 24 jam. Uji toksisitas ini dapat diketahui dari jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach. karena pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam pada konsentrasi yang diberikan (Purwanto dkk., 2015).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Juni 2021 - Agustus 2021 di Laboratorium Riset Kimia Analitik, Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan diantaranya seperangkat alat gelas, pisau, spatula, blender, gunting, ayakan 90 mesh, bola hisap, corong pisah, desikator, kertas saring, lemari asam, penggaris, pensil, *cutter*, plat kromatografi lapis tipis (KLT), oven, loyang, neraca analitik, penjepit kayu, penyaring buchner, *rotary evaporator*, vortex, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *sentrifuge*, *96-yellow tip*, *blue tip*, seperangkat lampu UV, ultrasonik frekuensi 20 kHz, seperangkat alat penetasan udang, instrumen spektrofotometer UV-Vis dan instrumen LC-MS/MS.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji anggur sebagai sampel yang berasal dari perkebunan di Kabupaten Buleleng, Bali. Tahap ekstraksi ultrasonik, hidrolisis dan uji fitokimia menggunakan komposisi pelarut ekstraksi meliputi metanol, aquades, HCl pekat, HCl 2N, natrium bikarbonat,

serbuk Mg. Fraksinasi menggunakan etil asetat dan aquades. Bahan yang digunakan pada tahap pemisahan dengan metode KLT adalah pelat silika gel F₂₅₄ dengan eluen aseton, asam asetat, dan toluena. Bahan UV-Vis bate-smith adalah methanol, butanol, HCl pekat, dan FeSO₄ 2%. Bahan uji toksisitas adalah telur udang *Artemia salina* Leach air laut dan DMSO.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian dilaksanakan dengan penelitian eksperimental di laboratorium. Sampel biji anggur diambil dan dibersihkan dengan cara dicuci untuk menghilangkan kotoran. Biji anggur dicuci dengan air untuk menghilangkan pengotor. Kemudian, dikeringkan pada rumah kaca tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Setelah kering, biji anggur tersebut dihaluskan dengan mesin dengan ayakan 90 mesh, sehingga diperoleh sampel berupa serbuk biji anggur. Selanjutnya, dihitung kadar airnya. Ekstraksi ultrasonik dilakukan dengan komposisi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (v/v) serta lama 20 menit pada suhu kamar dan frekuensi 20 kHz. Sehingga, diperoleh ekstrak kasar melalui proses penyaringan dan dihitung rendemennya.

Lalu, dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat. Setelah itu, diuji fitokimia golongan senyawa aktifnya dengan menggunakan reagen. Dilakukan pemisahan dengan metode KLTP menggunakan eluen aseton : asam asetat : toluena (3:2:3), serta reagen vanillin-HCl untuk menghasilkan isolat hasil KLTP. Hasil isolat KLTP selanjutnya diuji toksisitas isolat KLTP dan fraksi etil asetat dengan metode BSLT pada larva *Artemia salina* Leach. Kemudian dihitung nilai LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit, nilai terendah yang menunjukkan

aktivitas toksik yang terbaik dan untuk mengetahui senyawa dugaan akan diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS.

3.4 Tahap Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air
3. Ekstraksi senyawa aktif biji Anggur Bali dengan metode ultrasonik
4. Ekstraksi cair-cair/ fraksinasi etil asetat
5. Uji fitokimia kandungan senyawa aktif flavonoid
6. Pemisahan senyawa aktif menggunakan KLTP
7. Alkoholisis *Bate-Smith* dan Analisis dengan UV-Vis
8. Uji toksisitas dengan metode BSLT
9. Identifikasi menggunakan LC-MS/MS

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel

Biji anggur sebanyak 200 gram dicuci bersih selanjutnya dikeringkan di suhu ruang. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggiling hingga halus (serbuk) dan diayak dengan ayakan 90 mesh. Hasilnya berupa serbuk biji anggur yang akan digunakan sebagai sampel penelitian.

3.5.2 Analisis Kadar Air

Langkah awal yang dilakukan untuk analisis kadar air yaitu dipanaskan

cawan pada suhu 105°C selama ±15 menit. Kemudian didinginkan di dalam desikator selama 10 menit. Cawan ditimbang dan diulangi perlakuan sampai diperoleh berat konstan. Sampel kering ditimbang sebanyak 0,5 g dan dipanaskan pada suhu 105°C selama 1 jam. Sampel kering kemudian didinginkan dalam desikator selama ± 15 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus 3.1 berikut (AOAC, 1995).

$$\text{Kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan :

a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.3 Ekstraksi Ultrasonik Senyawa Aktif Biji Anggur Bali

Ekstraksi senyawa aktif pada sampel dilakukan dengan cara ekstraksi ultrasonik dengan komposisi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1). Sebanyak 30 gram serbuk biji anggur dimasukkan ke dalam erlenmeyer, ditambah komposisi pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (v/v) pada erlenmeyer sebanyak 500 mL dengan perbandingan bahan : pelarut yaitu 1 : 10 (b/v). Kemudian dimasukkan ke dalam alat ekstraksi ultrasonik dengan frekuensi 20 kHz pada suhu kamar dan waktu ekstraksi yang digunakan yaitu 20 menit. Kemudian disaring hasil ekstraksi ultrasonik menggunakan kertas saring. Selanjutnya, diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya dengan Persamaan 3.2.

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

3.5.4 Ekstraksi Cair-Cair/ Fraksinasi Etil Asetat

Fraksinasi untuk mengambil senyawa proantosianidin dari biji Anggur Hitam dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Ekstrak kasar hasil ultrasonik sebanyak 5 gram diasamkan atau dihidrolisis terlebih dahulu dengan HCl 2N hingga pH larutan menjadi 3. Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam dan dihomogenkan dengan magnetik stirrer pada suhu ruang, kemudian ditambah natrium bikarbonat jenuh sampai pH netral.

Hasil hidrolisis kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat. Sebanyak 25 mL pelarut etil asetat ditambahkan dalam corong pisah, lalu dikocok selama 15 menit hingga tidak terdapat gas udara pada corong pisah, perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali. Kemudian, didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan dan diambil lapisan organiknya. Hasil fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya. Hasil fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian dilakukan uji fitokimia serta dilakukan pemisahan dengan KLTP.

3.5.5 Uji Fitokimia

3.5.5.1 Uji Senyawa Aktif Flavonoid

Sampel sebanyak 1 mg dicampur dengan 3 mL metanol 70%, lalu dikocok, dipanaskan, dan dikocok lagi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh, kemudian ditambah serbuk Mg 0,1 g dan 2 tetes HCl pekat. Terbentuknya warna merah pada lapisan etanol menunjukkan adanya flavonoid (Harbone, 1987).

3.5.5.2 Uji Senyawa Tanin Terkondensasi

Hasil fraksi etil asetat dilarutkan pada pelarutnya dan dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL. Ditambahkan formaldehid 3 % : asam klorida (2:1), dan dipanaskan dalam air panas suhu 90 °C. Jika terbentuk endapan merah muda menunjukkan positif senyawa tanin terkondensasi.

3.5.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTP

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dilakukan untuk menentukan isolat senyawa yang diinginkan. Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel F₂₅₄ dengan ukuran 10x20 cm. Ekstrak fraksi etil asetat hasil ekstraksi yang sudah dilarutkan pada pelarutnya ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah. Sampel dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan eluen fase gerak berupa toluena : asam asetat : aseton (3:1:3) (Afrianto, 2000). Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas atas, elusi dihentikan.

Plat silica gel lalu dikeringkan, noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing spot yang terbentuk. Noda senyawa flavonoid dihitung nilai Rf nya. Masing-masing noda dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarutnya, selanjutnya divortex untuk melarutkan, dan disentrifugasi untuk mengendapkan silikanya. Dipisahkan silika dari supernatannya dan diulangi sampai tiga kali, kemudian diuapkan pelarutnya.

3.5.7 Identifikasi dengan UV-Vis Metode Bate-Smith (*Vivas et al., 2006*).

Sebanyak 1 mg ekstrak, fraksi, dan isolat KLTP dimasukkan dalam suatu

tabung reaksi penutup. Kemudian, ditambahkan 1 mL metanol (p.a) dan dikocok hingga larut. Lalu, ditambahkan 6 ml butanol: HCl (95: 5) dan 0,2 ml larutan FeSO₄ 2%. Tabung ditutup rapat, dikocok dan reaksi dibiarkan berkembang selama 40 menit dalam penangas air pada suhu 95⁰C. Setelah itu, didinginkan dalam air es. Intensitas warna yang dikembangkan diukur pada rentang panjang gelombang 400-800 nm.

3.5.8 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

3.5.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina*. Selanjutnya diaerasi dan telur akan menetas dalam waktu ± 48 jam dengan bantuan sinar lampu pijar/neon 3-20 watt agar suhu penetasan 25-30 °C tetap terjaga, dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

3.5.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas isolat hasil KLTP dan fraksi etil asetat terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Konsentrasi larutan uji masing-masing ekstrak dibuat 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 0 ppm sebagai kontrol, kemudian larutan uji tersebut dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan 100 µL dimetil sulfoksida (DMSO) dan dikocok sampai sampel kira-kira dapat larut, ditambahkan 1 mL air laut, setetes larutan ragi roti kemudian dikocok kembali, dan ditanda bataskan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* dan air laut sampai

volumenya 5 mL, dan dilakukan pengamatan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang. Perhitungan konsentrasi menggunakan persamaan dibawah ini :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan:

V_1 = Volume Awal

M_1 = Konsentrasi Awal

V_2 = Volume Akhir

M_2 = Konsentrasi Akhir

Kematian larva udang diamati selama 24 jam, dengan dibandingkan terhadap beberapa kontrol yaitu kontrol pelarut, kontrol DMSO, dan kontrol air laut. Kontrol pelarut dibuat tanpa penambahan isolat KLTP, fraksi etil asetat dan DMSO yaitu diambil 100 μ L etil asetat. Kontrol DMSO dibuat tanpa penambahan isolat KLTP dan pelarut (etil asetat), yaitu diambil 100 μ L DMSO. Selanjutnya, kontrol air laut dilakukan dengan penambahan air laut tanpa penambahan lainnya seperti pelarut (etil asetat) dan DMSO. Ketiga kontrol tersebut masing-masing ditambahkan satu tetes ragi roti dan 10 ekor larva udang. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang, kemudian dianalisa probit untuk menunjukkan nilai LC_{50} (Mawaddah, 2019).

3.5.8.3 Pengolahan dan Analisis Data

Proses pengolahan dan analisis data untuk mendapatkan nilai LC_{50} adalah menentukan terlebih dahulu besarnya nilai mortalitas kematian larva untuk setiap

konsentrasi. Untuk mendapatkan nilai mortalitas adalah dengan cara mencari nilai % mortalitas terlebih dahulu. Hasil nilai mortalitas dari masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabel dan dicari nilai LC_{50} menggunakan aplikasi Minitab 19.

3.5.9 Identifikasi dengan LC-MS/MS

Isolat yang memiliki sifat paling toksik atau nilai LC_{50} terendah akan dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Uji LC-MS/MS dilakukan di PRIMKOPPOL PUSLABFOR Bareskrim Polri, Bogor, Indonesia. Spesifikasi kondisi instrumentasi LC-MS/MS tertera pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kondisi Instrumentasi LC-MS/MS

Nama	Kondisi
Kolom	ACQUITY UPLC® HSS (<i>High Strength Silica</i>) C18 (1.8 μ m 2.1x100 mm) (<i>waters, USA</i>)
UPLC	ACQUITY UPLC®H-Class System (<i>waters, USA</i>)
Fasa gerak	5 mM ammonium format dalam asetonitril (fasa A) 0,05 % asam format dalam air (fase B)
Laju alir	0,2 ml/min (step gradien) <i>running</i> 23 menit
Volume Injeksi	5 μ L
MS type	Xevo G2-S QToF (<i>waters, USA</i>)
Sumber ionisasi	ESI (<i>Electrospray Ionization</i>) mode positif
Software	MassLynx V4.1
Kontrol suhu kolom	50°C

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel biji anggur Bali pada penelitian ini diperoleh dari perkebunan di Kabupaten Buleleng, Bali. Proses preparasi diawali dengan pencucian sampel untuk membersihkan kotoran yang ada pada sampel, berat sampel basah yang diperoleh yaitu sebanyak 400 gram. Proses selanjutnya yaitu pengeringan yang dilakukan di *Materia Medica* Batu pada rumah kaca tanpa sinar matahari langsung dengan suhu 25-30°C yang berfungsi untuk mengurangi kandungan air dalam sampel. Kemudian, sampel dihaluskan menggunakan pengayak berukuran 90 mesh untuk menyeragamkan ukuran dan memperluas permukaan partikel sampel. Penghalusan sampel dimaksudkan untuk memperbesar luas permukaan partikel (Deskawi, dkk., 2015). Hal ini bertujuan untuk mempermudah dan mempercepat kontak pelarut dengan sampel yang akan diekstrak (Tambun dkk., 2016). Semakin kecil ukuran partikel sampel maka semakin besar luas permukaannya yang dapat mempercepat proses ekstraksi, hal ini terjadi karena kontak antara sampel dengan pelarut akan semakin besar. Serbuk biji anggur Bali kering diperoleh sebanyak 200 gram.

4.2 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan air yang terdapat dalam sampel serbuk biji Anggur Bali. Tujuan dilakukannya analisis kadar air adalah untuk memberi batasan minimal besarnya kandungan air dalam

sampel baik ekstrak maupun simplisia. Dikarenakan semakin tinggi kadar air, maka semakin mudah sampel tersebut untuk ditumbuhi jamur dan kapang sehingga dapat menurunkan aktivitas biologi maupun kandungan senyawa aktif ekstrak dalam masa penyimpanan. Hasil pengukuran kadar air biji anggur Bali pada penelitian ini yaitu sebesar 7,85%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada biji anggur Bali memenuhi ketentuan BPOM Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional termasuk serbuk sediaan simplisia dengan batas maksimum yang disyaratkan sebesar 10%.

4.3 Ekstraksi Ultrasonik Biji Anggur Bali

Senyawa-senyawa aktif dari dalam sampel dapat diambil oleh pelarut melalui ekstraksi ultrasonik. Ekstraksi dengan jenis alat *probe system* dilakukan pada frekuensi 20 kHz. Suhu yang dihasilkan selama 20 menit proses ekstraksi sebesar 56-58°C. Senyawa aktif seperti polifenol dan proantosianidin dalam sampel biji anggur Bali tidak rusak pada suhu tersebut. Senyawa polifenol terdegradasi pada suhu 60°C (Diaconeasa, Z., 2018) dan proantosianidin terdegradasi pada suhu 100-140,8°C (Unusan, 2020).

Ekstraksi pada penelitian ini dibantu oleh gelombang ultrasonik yang kemungkinan manfaat penerapannya dalam ekstraksi adalah intensifikasi perpindahan massa dan peningkatan penetrasi pelarut ke dalam jaringan tanaman. Adanya efek ini memudahkan akses pelarut ke sel tumbuhan. Runtuhnya gelembung kavitasi di dekat dinding sel diharapkan menghasilkan gangguan sel bersama dengan penetrasi pelarut yang baik ke dalam sel tanaman melalui pancaran ultrasonik (Da Porto, *et al.*, 2013).

Proses ekstraksi ultrasonik pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol: air: HCl (70:29:1) (MAH). Komposisi pelarut ini digunakan karena telah diperoleh hasil toksisitas terbaik dari penelitian yang dilakukan oleh Wijaya (2021). Penggunaan komposisi pelarut bertujuan agar senyawa flavonoid terekstrak lebih optimal dalam bentuk aglikonnya yang bersifat polar. Senyawa dalam sampel yang bersifat polar maupun nonpolar dapat terlarut dalam pelarut metanol. Hal ini karena metanol memiliki gugus hidroksil yang bersifat polar dan juga memiliki gugus alkil yang bersifat non polar. Penggunaan HCl berfungsi untuk mempercepat pemutusan ikatan peptida glikosida antara senyawa glikon (gula) dan aglikon (bukan gula) (Anggraeni, 2014). HCl yang merupakan asam kuat diduga lebih cepat membantu pelepasan ikatan glikosida dari senyawa metabolit sekunder dalam sampel sehingga pelarut dapat bereaksi dengan metabolit sekunder dan dapat melarutkannya lebih cepat. HCl dapat menurunkan pH dan menghasilkan ekstraksi senyawa fenol tambahan.

Filtrat yang diperoleh berwarna merah bata keruh yang ditunjukkan pada Gambar 4.1 Filtrat ekstrak MAH tersebut kemudian dipekatkan dan diperoleh hasil akhir berupa ekstrak pekat berwarna coklat kehitaman. Berat ekstrak pekat tersebut kemudian ditimbang untuk mendapatkan persentase rendemennya. Hasil penimbangan ekstrak pekat MAH yaitu sebesar 6,7081 gram dan diperoleh hasil rendemen yang cukup tinggi yaitu sebesar 33,5405%. Ekstraksi sokletasi selama 6 jam pada biji anggur Bali yang dilakukan oleh Da Porto (2013) diperoleh randemen sebesar 14,64%. Hasil ini membuktikan bahwa ekstraksi ultrasonik lebih efektif digunakan untuk ekstraksi biji anggur Bali karena memerlukan waktu yang lebih singkat serta randemen yang diperoleh lebih tinggi.



Gambar 4.1. Filtrat hasil ekstraksi ultrasonik dengan pelarut metanol : air : HCl (MAH)

4.4 Hidrolisis dan Fraksinasi

Ekstrak pekat metanol selanjutnya dihidrolisis untuk memutus ikatan glikon dan aglikon pada senyawa metabolit sekunder yang masih dalam bentuk glikosidanya. Hidrolisis dilakukan dengan penambahan HCl 2 N sebagai katalis. Sifat reaksi hidrolisis adalah *reversible* atau bolak-balik sehingga dilakukan penetralan menggunakan natrium bikarbonat (NaHCO_3) untuk menghentikan reaksi hidrolisis. Proses penambahan ini akan menghasilkan busa yang menunjukkan gas CO_2 sudah terbentuk dan terjadi reaksi HCl dengan NaHCO_3 , selanjutnya proses ini dihentikan sampai pH netral. Proses hidrolisis yang dilakukan bersifat reversibel, sehingga diperlukan penghentian reaksi yaitu dengan reaksi netralisasi. Kondisi asam oleh HCl dinetralisasi oleh NaHCO_3 , reaksinya yaitu (Day dan Underwood, 2002) :



Gambar 4.2 Reaksi netralisasi asam

Hidrolisat yang didapat selanjutnya dipartisi (ekstraksi cair-cair) menggunakan pelarut etil asetat. Proses partisi menghasilkan dua lapisan yang

tidak saling bercampur, yaitu fasa organik yang mengandung senyawa flavonoid dan fasa air yang mengandung glikon dan garam hasil hidrolisis. Fasa organik pelarut etil asetat berada pada lapisan atas dan fasa air berada pada lapisan bawah. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan massa jenis dari air (air = 0,997 g/mL) yang lebih besar daripada pelarut etil asetat = 0,902 g/mL. Hasil fraksi etil asetat biji anggur Bali ditunjukkan pada Gambar 4.3.

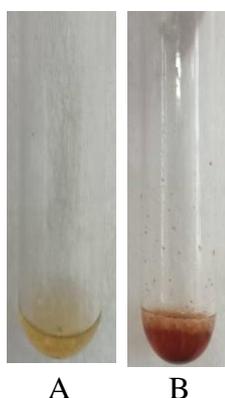


Gambar 4.3 Hasil fraksi etil asetat biji anggur Bali

Hasil partisi etil asetat menghasilkan warna merah bata kecoklatan dengan berat fraksi pekat sebesar 0,1547 gram. Dari perhitungan didapatkan randemen sebesar 3,094%. Penelitian yang dilakukan oleh Catalano, *et al* (2013) yang melakukan ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat sebagai pelarut organik untuk menghilangkan senyawa lain yang mengganggu, seperti lipid, protein, gula, dan senyawa yang sangat terpolimerisasi. Senyawa oligomer proantosianidin akan lebih terdistribusi ke fase etil asetat dan sedangkan senyawa polimernya akan lebih terdistribusi ke fase air. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak MAH yang didapatkan spesifik ke senyawa yang diinginkan yaitu oligomer proantosianidin. Hal ini akan dibuktikan dengan hasil uji fitokimia yang menunjukkan hasil positif untuk senyawa flavonoid dan tanin terkondensasi.

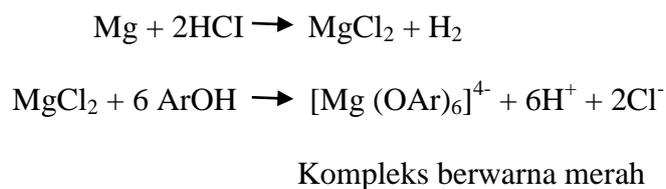
4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Flavonoid dan Tanin Terkondensasi

Uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa flavonoid dan tanin terkondensasi pada fraksi etil asetat. Uji fitokimia flavonoid dilakukan dengan mengambil 0,5 mL sampel. 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 uji flavonoid fraksi etil asetat ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil uji flavonoid fraksi etil asetat (A) sebelum; (B) sesudah.

Uji flavonoid pada fraksi etil asetat didapatkan hasil yang positif karena menghasilkan larutan berwarna merah kecoklatan. Kompleks yang terbentuk menghasilkan warna merah kecoklatan karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion magnesium dengan gugus OH fenolik (gugus aril) senyawa flavonoid. Persamaan reaksinya sebagai berikut (Suyatno dkk, 2014) :



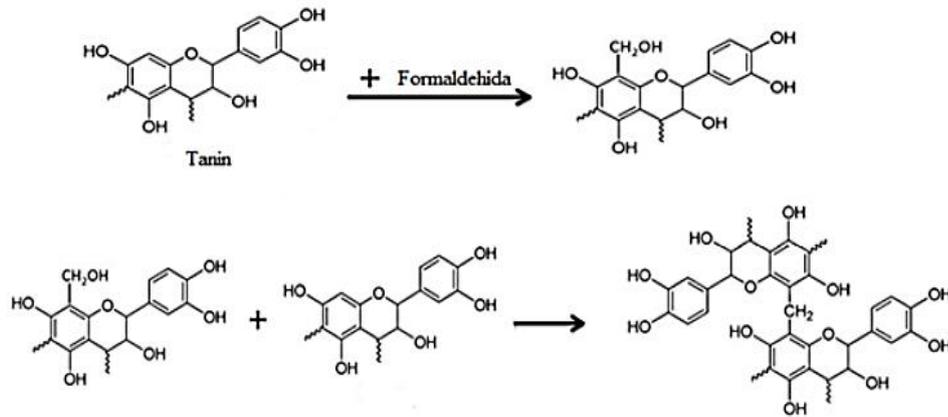
Uji tanin terkondensasi dilakukan dengan penambahan formaldehid 3 % : HCl pekat (2:1) pada sampel yang dilakukan dengan pemanasan, adanya endapan merah menunjukkan bahwa dalam sampel positif mengandung tanin katekol atau proantosianidin. Hasil uji tanin terkondensasi pada fraksi etil asetat ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil Uji Tanin Terkondensasi Fraksi Etil Asetat

Uji tanin terkondensasi pada fraksi etil asetat didapatkan hasil yang positif karena menghasilkan endapan merah. Tanin adalah senyawa fenol yang dapat berkondensasi dengan formaldehid. Nama lain tanin terkondensasi adalah proantosianidin, karena bila direaksikan dengan asam panas, beberapa ikatan karbon-karbon penghubung satuan terputus dan dibebaskanlah monomer antosianidin. Reaksi antara tanin dan formaldehid dimulai dengan bereaksinya 1 monomer tanin dengan 1 molekul formaldehida. Molekul hasil reaksi tersebut akan mengalami reaksi berkelanjutan dengan monomer-monomer tanin lainnya menghasilkan suatu polimer yang bersifat tidak larut di dalam air (Fangidae, dkk. 2020). Penambahan HCl panas pada sampel tumbuhan digunakan untuk mendeteksi katekin dan leukoantosianidin, terbentuknya warna coklat kuning menunjukkan adanya katekin sedangkan timbulnya warna merah menunjukkan

adanya leukoantosianidin (Harborne, 1996). Reaksi yang terjadi antara formaldehid dengan ditunjukkan pada Gambar 4.6 sebagai berikut.

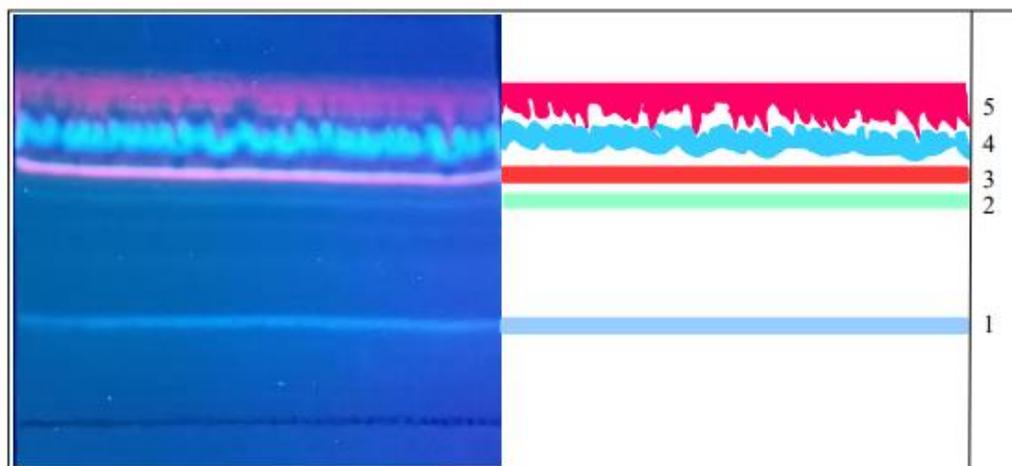


Gambar 4.6 Reaksi senyawa polifenol dengan formaldehid

4.6 Pemisahan Senyawa Dugaan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

KLT-Preparatif pada penelitian ini digunakan sebagai uji kualitatif untuk memastikan bahwa terdapat senyawa flavonoid pada fraksi etil asetat biji anggur bali. Eluen yang digunakan untuk mengelusi fraksi etil asetat biji anggur Bali yaitu aseton: asam asetat: toluene (3:1:3). Jarak tempuh eluen pada penelitian ini adalah 8 cm. Perbandingan komposisi eluen toluena dan asetot dibuat sama dimana toluena lebih bersifat nonpolar dengan struktur hidrokarbon aromatik sedangkan aseton bersifat semipolar dengan gugus alkil dan ketonnya sehingga eluen yang digunakan bersifat semipolar ke arah nonpolar. Berdasarkan penelitian yang dilakukan (Wijaya, 2021) menggunakan eluen aseton: asam asetat: toluena (3:1:3) dalam menganalisis flavonoid pada biji anggur dan menunjukkan bahwa flavonoid yang bersifat polar akan lebih terdistribusi ke fase diam (plat silika gel) yang

bersifat polar. Hasil pemisahan menggunakan KLTP dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Gambar (a) hasil pemisahan KLTP ekstrak MAA dan (b) ilustrasinya

Pemisahan KLTP menghasilkan 5 noda yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Data hasil pemisahan noda senyawa flavonoid fraksi etil asetat biji Anggur Bali dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3:1:3) di lampu UV 366 nm ditunjukkan pada tabel berikut.

Tabel 4.1 Data dugaan jenis flavonoid hasil pemisahan noda fraksi etil asetat biji anggur Bali pada sinar UV 366 nm (Markham, 1988).

Nomor Noda	Jarak tempuh noda (cm)	Nilai Rf	Warna noda pada sinar UV 366 nm	Dugaan senyawa flavonoid
1	2,2	0,275	Biru muda	Flavon, Flavanon
2	3,9	0,488	Hijau-kuning	Auron
3	5,3	0,663	Merah jingga-kuning	Antosianidin
4	6,2	0,775	Biru muda	Flavon, Flavanon
5	7,1	0,888	Merah jambu	Sebagian besar Antosianidin 3,5-diglikosida

Noda flavonoid yang muncul pada pemisahan menggunakan KLT dengan eluen aseton: asam asetat: toluena (3:1:3) memiliki Rf kisaran 0,275-0,888. Markham (1988) melaporkan bahwa flavonoid jenis antosianidin 3-glikosida akan menghasilkan warna bercak dengan sinar UV berwarna merah jingga redup sesuai dengan noda ketiga.

Isolat hasil KLTP yang didapatkan akan digunakan dalam identifikasi lanjut senyawa menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LCMS/MS. Isolat dikerok dan dilarutkan dalam etil asetat. Setelah itu divortex yang 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. Isolat 3 ini kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS/MS.

4.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Penggunaan spektrofotometer UV-Vis metode *Bate-Smith* bertujuan untuk mengidentifikasi adanya kandungan oligomer flavonoid jenis proantosianidin pada ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan untuk mengidentifikasi isolat hasil KLTP yaitu isolat nomor 3. Identifikasi ini dilakukan dengan metode *Bate-Smith* yang akan menghasilkan larutan warna merah setelah penambahan reagen dan proses pemanasan menggunakan *waterbath*. Warna larutan setelah proses pemanasan dapat dilihat pada Gambar 4.8.

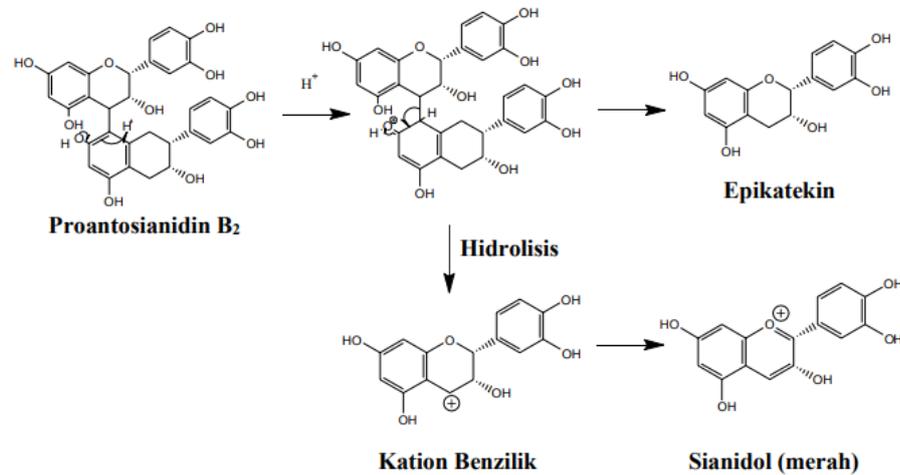


Gambar 4.8. Warna larutan (a) Ekstrak MAH, (b) Fraksi EA, (c) Isolat 3 KLTP setelah proses pemanasan

Berdasarkan Gambar 4.8 hasil yang diperoleh dari metode *Bate-Smith* pada ekstrak MAH dan fraksi EA setelah proses pemanasan diperoleh perubahan warna larutan dari tidak berwarna menjadi berwarna merah. Sementara itu, pada hasil isolat 3 KLTP setelah proses pemanasan tidak terjadi perubahan warna menjadi merah, akan tetapi terjadi perubahan warna menjadi kuning bening. Analisis UV-Vis menggunakan metode *Bate-Smith* akan menunjukkan hasil positif apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi merah muda-kemerahan. Hal ini menandakan sampel mengandung proantosianidin. Metodenya didasarkan pada depolimerisasi oksidatif dengan panas dalam media asam.

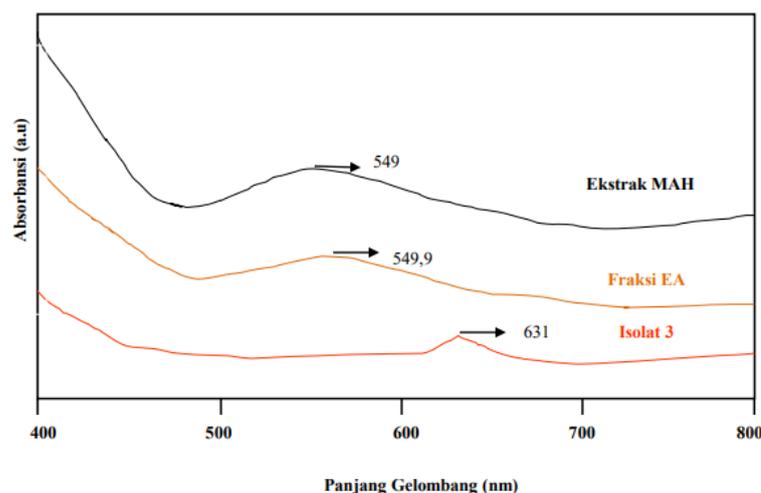
Proses depolimerisasi dalam lingkungan asam dilakukan dengan menggunakan pereaksi butanol dan FeSO_4 pada suhu 100°C . Ion Fe^{3+} berfungsi untuk mengkatalisis pembentukan warna pada reaksi butanol-HCl. Saat proses pemanasan, proantosianidin di dalam sampel akan mengalami depolimerisasi dengan katalis asam. Depolimerisasi proantosianidin menghasilkan antosianin berwarna merah seperti sianidin dan delphinidin. Hidrolisis ikatan interflavanik akan membentuk kation benzilik yang sangat mudah teroksidasi. Kation benzilik

tersebut dengan cepat berubah menjadi kation pirilium berwarna merah. Reaksinya adalah sebagai berikut (Rayess *et al.*, 2014).



Gambar 4.9 Reaksi *Bate-Smith*

Larutan sampel yang telah diuji dengan metode *Bate-Smith* tersebut kemudian di analisis panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sampel yang mengandung proantosianidin akan memunculkan serapan maksimal di sekitar 540-550 nm. Spektra UV-Vis dari ekstrak MAH, fraksi EA, isolat 3, dan isolat 5 KLTP ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Ilustrasi Hasil Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Berdasarkan gambar diatas dapat diketahui bahwa ekstrak MAH menghasilkan panjang gelombang maksimal sebesar 549 nm, fraksi EA sebesar 549,9 nm, isolat 3 sebesar 631 nm. Ku dan Mu (2007) melaporkan bahwa proantosianidin menghasilkan pigmen sianidin (λ_{maks} 540-550 nm). Hasil ini menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat kandungan senyawa proantosianidin dalam ekstrak MAH dan fraksi EA. Sejumlah metode untuk mengukur kandungan total proantosianidin atau tanin dalam ekstrak anggur masih banyak dicari tahu oleh banyak peneliti, karena senyawa ini sangat beragam jenisnya. Terdapat beberapa fakta yang memiliki dampak kuat pada kemampuan prinsip-prinsip analitis untuk memperkirakan konsentrasi yang terkandung didalamnya (Aleixandre-Tudo *et al.*, 2017). Nilai absorbansi dari ekstrak MAH yang diperoleh sebesar 1,083 sedangkan fraksi EA sebesar 0,426. Metode *bate-smith* ini diketahui memiliki beberapa keterbatasan salah satunya yaitu reaksi hidrolisis asam pada metode *bate-smith* ini hanya memberikan perkiraan kandungan total proantosianidin atau tanin yang dapat dilihat dari nilai absorbansi yang telah diperoleh tanpa mempertimbangkan struktur kimia atau jenis tanin yang ada dalam sampel anggur yang dianalisis (Wilhelmy *et al.*, 2021). Sehingga, kemampuan toksisitas dari senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi akan dibuktikan dengan nilai LC_{50} yang diperoleh dari uji toksisitas.

Isolat KLTP tidak membentuk larutan berwarna merah namun menghasilkan larutan berwarna kuning yang menunjukkan serapan pada panjang gelombang 631 nm. Hal ini disebabkan oleh Fe^{2+} yang telah teroksidasi menjadi Fe^{3+} dalam larutan asam (Porter *et al.*, 1985) tanpa membentuk formasi kompleks dengan senyawa proantosianidin. Berdasarkan Chen, *et.al* (2019) menyebutkan

bahwa ion Fe^{3+} memunculkan spektrum pada 600-700 nm dengan λ_{maks} pada penelitiannya sebesar 607 nm. Dari hasil identifikasi menggunakan UV-Vis metode *Bate-Smith* ini diduga bahwa isolat hasil KLTP tidak mengandung golongan dimer proantosianidin. Hasil identifikasi isolat KLTP akan dipastikan dengan hasil karakterisasi senyawa menggunakan LC-MS/MS.

4.8 Uji Toksisitas Senyawa Flavonoid dengan Metode BSLT

Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach ditetaskan dalam air laut dibantu dengan aerator dan penerangan. Aerator berguna untuk memasok oksigen. Selama penetasan larva udang kadar oksigennya harus lebih dari 3 mg/L, oleh karena itu media air laut harus diberi udara dengan aerator. Sedangkan penerangan dilakukan guna merangsang pertumbuhan larva. Pada waktu 24-36 jam, biasanya telur-telur yang ada pada media air laut sudah menetas menjadi larva yang disebut nauplii. Nauplii aktif yang sudah berumur 48 jam siap digunakan sebagai hewan uji dalam percobaan (Khasanah, dkk., 2020).

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui efek toksik dari fraksi etil asetat biji anggur Bali serta isolat hasil KLTP. Hasil uji toksisitas ini berupa nilai LC_{50} yaitu dihitung dari 50% kematian larva udang. Hasil LC_{50} yang diperoleh nantinya akan digunakan sebagai gambaran dalam uji bioaktivitas lainnya. Kontrol yang digunakan dalam uji toksisitas ini yaitu kontrol tanpa fraksi ataupun isolat yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh kematian larva selain dari fraksi maupun isolat. Selain itu terdapat juga kontrol pelarut dan kontrol DMSO yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya kematian larva oleh pelarut ataupun DMSO yang digunakan untuk uji. DMSO mempunyai gugus S=O bersifat

polar dan dua alkil –CH₃ bersifat kurang polar. Gugus polar akan melarutkan air laut, sementara gugus yang kurang polar akan melarutkan ekstrak yang bersifat kurang polar. Sepuluh larva uji dimasukkan pada masing-masing konsentrasi dan dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Banyaknya kematian larva dinyatakan dari nilai yang sering muncul (modus) pada 5 kali ulangan. Hasil uji toksisitas fraksi etil asetat, dan isolat 3 dapat dilihat pada Lampiran 6.1. Nilai LC₅₀ dari fraksi etil asetat dan isolat biji anggur Bali ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai LC₅₀ sampel uji

Sampel Uji	Nilai LC₅₀ (ppm)	Kategori
Ekstrak MAH*	15,673	Sangat Toksik
Fraksi Etil Asetat	6,422	Sangat Toksik
Isolat 3	8,531	Sangat Toksik

Ekstrak MAH* : Hasil Penelitian Wijaya (2021).

Hasil LC₅₀ untuk fraksi etil asetat biji anggur Bali dan isolat 3 yang ditunjukkan pada tabel termasuk dalam kategori sangat toksik, yaitu 6,422 ppm dan 8,531 ppm. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wijaya (2021) masih menguji variasi pelarut ekstrak biji anggur bali, dan mendapatkan nilai LC₅₀ ekstrak metanol : air : HCl sebesar 15,673 ppm. Nilai toksisitas ekstrak ultrasonik biji anggur yang dihasilkan oleh Wijaya (2021) lebih rendah dibandingkan dengan nilai toksisitas ekstrak soxhlet biji anggur yang dilakukan oleh Atolani (2012) yaitu sebesar 12,76 ppm. Hal ini dimungkinkan karena ekstraksi dengan alat soxhlet merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan menggunakan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor). Cara ini memiliki beberapa kelebihan dibanding yang lain, yaitu sampel kontak dengan pelarut yang murni secara berulang, kemampuan mengekstraksi sampel lebih tanpa tergantung jumlah pelarut yang banyak (Tiwari *et al.*, 2011). Faktor lain yang menyebabkan nilai toksisitas biji

anggur pada penelitian Atolani (2012) lebih toksik juga dimungkinkan dipengaruhi oleh jenis dan daerah pengambilan sampel biji anggur yang berbeda. Faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder adalah kondisi lingkungan. Austen *et al* (2019) menyatakan bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi produksi metabolit sekunder dalam suatu sampel tanaman adalah suhu dan intensitas cahaya pada lingkungan tempat pengambilan sampel, semakin tinggi suhu maka akan semakin tinggi produksi metabolit sekunder yang dihasilkan yang menyebabkan lebih toksik.

Nilai LC_{50} menunjukkan urutan tingkat toksisitas dari yang tertinggi ke terendah yaitu fraksi etil asetat > isolat 3 > ekstrak MAH. Hasil ini diduga karena kemungkinan fraksi etil asetat mengandung senyawa yang lebih spesifik yaitu dalam bentuk oligomer flavonoid. Seperti yang dibahas pada subbab sebelumnya yaitu fraksinasi etil asetat mampu memisahkan polimer-polimer yang akan lebih terdistribusi ke fase air. Senyawa flavonoid yang lebih terdistribusi dalam fraksi etil asetat ini dimungkinkan kandungannya saling bersinergi sehingga didapatkan nilai LC_{50} rendah yang menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung semakin toksik.

Pada isolat 3 diperoleh hasil LC_{50} lebih tinggi dibanding dengan fraksi etil asetat. Hal ini dimungkinkan karena senyawa yang diduga sebagai proantosianidin kuantitasnya sedikit beberapa senyawanya hilang bersamaan dengan proses pemisahan saat KLTP. Aktivitas yang dimiliki ekstrak maupun fraksi biji anggur secara langsung terkait dengan kandungan total polifenol dan secara khusus dianggap berasal dari efektivitas komponen lain yang masih terkandung. Akan tetapi, efek sitotoksik dari fraksi biji anggur secara keseluruhan lebih tinggi

daripada isolatnya, hal ini diduga karena terdapat sinergisme antara polifenol dan beberapa senyawa lain yang masih terkandung pada fraksi biji anggur meliputi senyawa-senyawa yang terdeteksi pada saat pengujian KLTP fraksi etil asetat yaitu senyawa flavon, flavanon, auron, antosianidin, dan antosianidin 3,5-diglikosida.

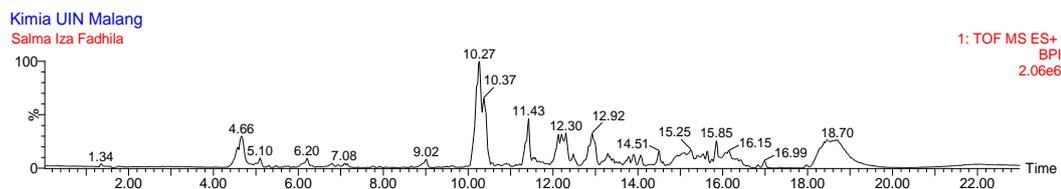
Dari hasil penelitian ini terbukti nilai LC_{50} dari fraksi etil asetat lebih toksik dibandingkan dengan hasil ekstrak dari biji anggur bali. Nilai LC_{50} yang <30 ppm pada fraksi etil asetat dan isolat bisa dikembangkan menjadi antikanker maupun antitumor.

4.9 Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS

Identifikasi menggunakan LC-MS/MS bertujuan untuk memperkuat dugaan adanya atau tidak adanya senyawa flavonoid jenis oligomer proantosianidin pada hasil isolat KLTP. Preparasi sampel dilakukan dengan metode Ekstraksi Fase Padat (SPE) dilakukan terlebih dahulu sebelum sampel diinjeksikan kedalam instrumen LC-QToFMS/MS. Keuntungan preparasi sampel dengan SPE ini yakni memisahkan senyawa pengotor atau senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih murni sehingga menghasilkan sensitivitas spektra yang dihasilkan lebih tinggi (Simpson, 2000).

Isolat yang telah dipreparasi dengan metanol dan diklorometan diinjeksikan ke dalam instrumen LC-MS/MS sebanyak 5 μ l menggunakan *micro syringe*. Hasil pertama yang diperoleh yakni berupa kromatogram. Kromatogram diperoleh setelah sampel memasuki kolom dan terjadi proses pemisahan senyawa kimia yang terdapat dalam isolat hingga senyawa-senyawa tersebut melewati detektor. Fase diam atau kolom yang digunakan pada instrumen ini berupa

C18/ODS (*octadecyl silane*), sedangkan fase gerak/eluen yang digunakan pada instrumen ini berupa kombinasi eluen A (air : asam format 99,9:0,1 [v/v]) dan eluen B (asetonitril : asam format 99,9:0,1 [v/v]). Kromatografi pada penelitian ini menggunakan sistem “*reversed phase*” yakni fase diam yang bersifat non-polar dan fase gerak yang bersifat polar sehingga senyawa yang muncul pada kromatogram di awal waktu retensi adalah senyawa yang bersifat polar dan semakin lama waktu retensi maka senyawa yang muncul akan semakin non-polar (Venn, 2008). Berikut ini merupakan hasil kromatogram dari isolat dengan preparasi metanol.



4.11 Hasil kromatogram isolat 3 hasil KLTP

Sampel yang telah dipisahkan pada UPLC akan memasuki sistem MS dengan diionisasi terlebih dahulu menggunakan metode ESI positif. Selanjutnya molekul-molekul yang telah terionisasi akan diseleksi dan dipisahkan menggunakan mass analyzer jenis *Quadrupole dan Time of Flight*. Hasil dari pemisahan sampel tersebut akan ditampilkan dalam bentuk spektra pada tiap peak yang terdeteksi.

Hasil identifikasi pada isolat 3 hasil KLTP positif mengandung senyawa jenis catechin, prodelphinidin A1, flavonol dan dihidroflavon. Waktu retensi pada hasil spektra massa menunjukkan kepolaran suatu senyawa, fasa diam pada kolom LC bersifat nonpolar sedangkan fasa geraknya bersifat polar. Semakin besar ukuran molekul suatu senyawa dan merupakan rantai panjang maka memiliki sifat

lebih nonpolar. Berdasarkan hasil LC-MS/MS pada Tabel 4.3 urutan kepolaran dari jenis senyawa steroid pada isolat 3 hasil KLTP (polar-semipolar) yaitu 2-Hydroxyflavanone > flavonols > Prodelphinidin A1 > Catechin.

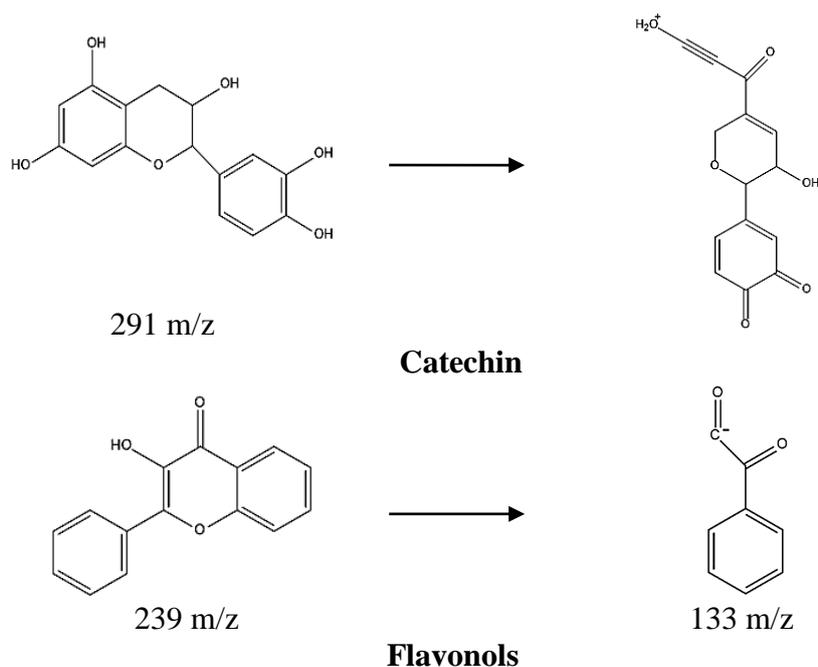
Tabel 4.3 Massa Flavonoid Isolat 3 Hasil KLTP yang terdeteksi oleh LC-MS/MS

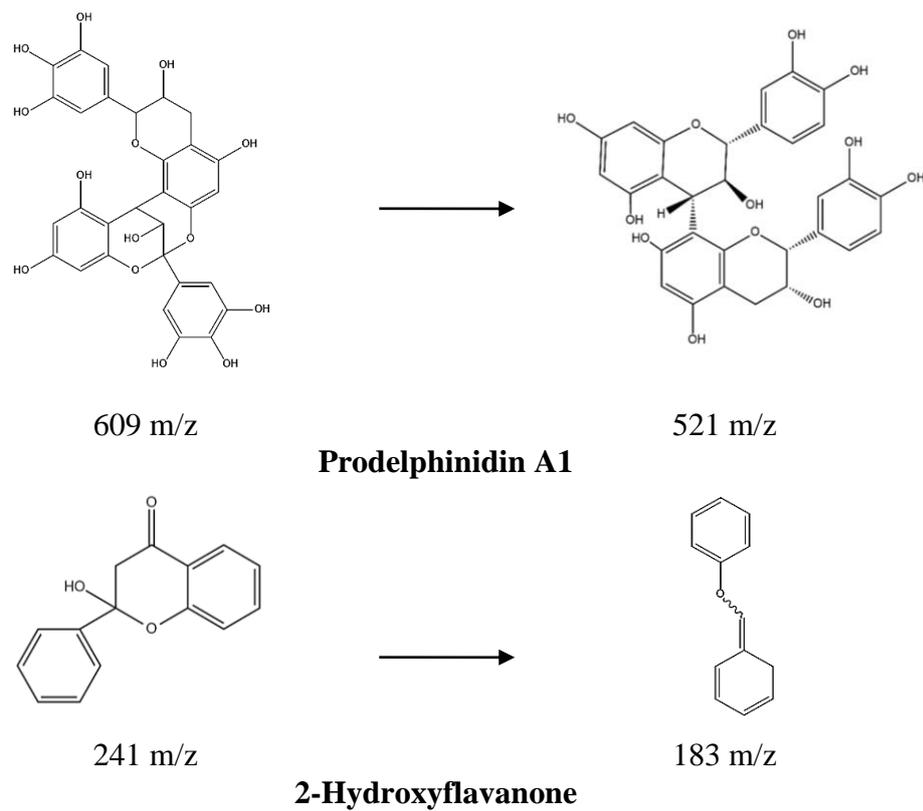
Waktu retensi (menit)	% Area	Flavonoid	Rumus Molekul	Massa (m/z)	
				Measured Mass	Calculated Mass
10,27	23,28 %	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,2648	290,2681
5,08	1,02%	Prodelphinidin A1	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₄	608,3788	608,5032
4,02	0,01%	Flavonol	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	238,1430	238,0630
1,83	0,12%	2-Hydroxyflavanone	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	240,0308	240,0786

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa terdapat % luas area (Lampiran 8.6) yang digambarkan sebagai kelimpahan dari masing-masing jenis senyawa sesuai dengan puncak dan waktu retensinya pada Gambar 4.12. Kelimpahan senyawa flavonoid pada isolat 3 hasil KLTP dari tertinggi hingga terendah yaitu Catechi > Prodelphinidin A1 > Flavonols > 2-Hydroxyflavanone. Catechin memiliki % luas area 23,28 yang menunjukkan kelimpahan senyawa terbesar pada sampel dibandingkan dengan jenis senyawa yang lainnya. Kromatogram yang diperoleh tersebut kemudian diolah menggunakan aplikasi Masslynx 4.1 sehingga dapat diketahui dan dapat diprediksi rumus molekul tiap senyawa. Dianalisis waktu retensi dengan % area tertinggi dan beberapa senyawa yang telah ditargetkan. Setiap satu puncak kromatogram mengindikasikan satu senyawa (Lampiran 8.1). Selanjutnya, diatur *display range* nilai m/z ion sesuai dengan senyawa yang ditargetkan (Lampiran 8.2) dan didapatkan nilai m/z ion (*measured mass*) dan *base peak* (Lampiran 8.3).

Berdasarkan nilai *measured mass* dan *calculated mass* pada spektra maka dapat diketahui prediksi rumus molekul dari spektra tersebut. *Measured mass* merupakan massa yang ditemukan dari senyawa yang diidentifikasi, sedangkan *calculated mass* merupakan massa tepat dari suatu rumus formula. Nilai dari *measured mass* harus dikurangi massa 1 atom H yaitu 1,0078 disebabkan pada saat pemisahan menggunakan kolom terjadi penambahan atom H yang berasal dari penembakan ion ESI (+). Prediksi rumus molekul yang telah dipilih selanjutnya dicari dengan bantuan *website* HMDB (Lampiran 8.4 dan 8.5). Dicocokkan spektra *m/z* ion dan *base peak* yang diperoleh dengan senyawa target spektra pada *library website* HMDB (Lampiran 8.6 dan 8.7). Adapun spektra yang terdeteksi pada LC-MS/MS terlampir dalam Lampiran 8.8.

Berdasarkan Lampiran 8.8 dapat dinyatakan bahwa yang terdeteksi LCMS/MS pada isolat 3 KLTP adalah Catechin, Prodelphinidin A1, Flavonols dan 2-Hydroxyflavanone. Adapun pola fragmentasi senyawa yang terdeteksi pada LC-MS/MS seperti pada Gambar 4.12.





Gambar 4.12 Dugaan fragmentasi senyawa hasil identifikasi LC-MS/MS

4.10 Pemanfaatan Biji Anggur Bali dalam Perspektif Islam

Penelitian ini mengkaji tentang senyawa flavonoid yang diisolasi dari biji anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee). Zhou dan Raffoul (2012) menyatakan bahwa antosianin adalah kandungan utama flavonoid dalam anggur merah dan ekstrak bijinya memiliki potensi besar sebagai zat antikanker. Penelitian merupakan salah satu cara dalam mencari ilmu pengetahuan. Hakikat ilmu pengetahuan adalah untuk mencari kebenaran secara ilmiah, namun dalam Al-Qur'an dan Hadits hakikat ilmu pengetahuan bukan semata-mata untuk mencari kebenaran yang bersifat ilmiah, melainkan untuk mencari tanda-tanda, kekuasaan dan rahmat Allah SWT untuk mencari hakikat ilmu pengetahuan yang sebenarnya.

Islam adalah agama yang mewajibkan umatnya untuk senantiasa menuntut ilmu, bahkan Al-Qur'an kitab pedoman bagi umat Islam merupakan sumber ilmu dan sumber inspirasi berbagai disiplin ilmu pengetahuan sains dan teknologi. Betapa tidak, Al-Qur'an sendiri mengandung banyak konsep-konsep sains, ilmu pengetahuan dan teknologi. Ilmu pengetahuan merupakan salah satu isi pokok kandungan kitab suci Al-Qur'an. Bahkan kata *'ilm* itu sendiri disebut dalam Alquran sebanyak 105 kali, tetapi dengan kata jadiannya ia disebut lebih dari 744 kali (Rahardjo, 2002). Dalam al-Quran banyak sekali disebutkan ayat-ayat yang mendorong umat Islam untuk mengembangkan ilmu pengetahuan. Allah telah meletakkan garis-garis besar sains dan ilmu pengetahuan dalam Alquran, kita hanya perlu menelaah, mengembangkan konsep dan teori yang sudah ada, antara lain sebagaimana terdapat dalam Surat Ar-Rad :4.

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ وَصِنَوَانٌ وَعَيْرٌ صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ

وَّوَحِيدٍ وَنُفْضِلٌ بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي الْأَكْمَلِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya :*“Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir.”* (QS. Ar-Rad :4)

Berdasarkan Tafsir Muyassar oleh Al-Qarni Aidh (2007) ayat tersebut menjelaskan bahwa di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan satu

sama lain, diantaranya ada tanah yang subur yang bisa menumbuhkan tanaman yang bermanfaat bagi manusia, dan ada pula tanah gersang yang tidak bisa menumbuhkan tanaman apapun. Pada tanah yang baik terdapat kebun-kebun anggur, dan Dia menjadikan padanya tanaman bermacam-macam, pohon-pohon kurma yang berhimpun di satu tempat dan tidak berhimpun di satu tempat. Semua itu dalam perawatan yang sama, dan minum dari air yang sama, tetapi berbeda buah, ukuran, rasa dan selainnya. Ini manis dan ini asam. Sebagiannya lebih baik daripada sebagian yang lain dalam hal rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda bagi siapa yang memiliki hati yang memahami perintah dan larangan-Nya.

Air selalu berubah dari satu bentuk ke bentuk lainnya dan bergerak dari satu tempat ke tempat lainnya, hal tersebut berkat adanya aliran arus air dan pergerakan angin. Pergerakan dan perubahan ini berjalan terus menerus dan suatu saat akan kembali lagi kepada bentuk semula. Proses tersebut biasa disebut dengan siklus air/hidrologi. Berkenaan dengan proses terjadinya air atau siklus air, Al-Qur'an dalam firman-Nya menyatakan :

وَهُوَ الَّذِي يُرْسِلُ الرِّيحَ بُشْرًا بَيْنَ يَدَيْ رَحْمَتِهِ ۗ حَتَّىٰ إِذَا أَقْلَّتْ سَحَابًا ثِقَالًا سُقْنَاهُ لِبَلَدٍ مَّيِّتٍ فَأَنْزَلْنَا بِهِ
الْمَاءَ فَأَخْرَجْنَا بِهِ ۖ مِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ ۗ كَذٰلِكَ نُخْرِجُ الْمَوْتَىٰ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ (٥٧)

Artinya : *“Dan Dialah yang meniupkan angin sebagai pembawa berita gembira sebelum kedatangan rahmat-Nya (hujan); hingga apabila angin itu telah membawa awan mendung, Kami halau ke suatu daerah yang tandus, lalu Kami turunkan hujan di daerah itu, maka Kami keluarkan dengan sebab hujan itu pelbagai macam buah-buahan. Seperti itulah Kami membangkitkan orang-orang yang telah mati, mudah-mudahan kamu mengambil pelajaran.”* (QS. Al-A'raf :57)

Dari firman Allah di atas jelaslah bahwa hujan turun berdasarkan kehendak Allah, dan adalah wajar apabila dalam musim kering yang panjang orang-orang beriman memohon kemurahan Allah untuk menurunkan hujan. Menurut Abu Hafis Sirajuddin an-Nu'mani, setelah Allah menguraikan benda-benda angkasa seperti langit, bintang, matahari, bulan sebagai tanda-tanda kebesarannya, Allah Swt. mengiringinya dengan menyebutkan benda-benda atau peristiwa-peristiwa yang terjadi di bagian bawah (Lajnah Penashihan Al-Qur'an, 2011), tepatnya di atas bumi ini. Siklus air, menurut ayat di atas terjadi dalam tiga fase yang melibatkan ar-riyah (angin), sahab (awan), dan rahmatih (kasih sayang-Nya, yakni Hujan). Al-Qur'an menjelaskan bahwa hujan itu turun dari langit, kemudian jatuh ke bumi, sehingga bumi tempat manusia, hewan dan tumbuh-tumbuhan hidup menjadi tempat penampungan dan penyimpanan air yang turun dari langit. Oleh sebab itu bumi, menurut Al-Qur'an bumi harus senantiasa difungsikan sebagai reservoir air yang menjamin ketersediaan air bagi kepentingan makhluk hidup di musim kemarau dan mengendalikan air di musim hujan.

Keberadaan tumbuhan sangat diperlukan demi keberlangsungan makhluk hidup sebagai bahan makanan dan minuman, sumber oksigen dan obat-obatan. Tumbuhan dan air seringkali dibahas secara bersama karena satu dengan yang lainnya tidak bisa dipisahkan. Tumbuhan hanya ditemukan di bumi yang mempunyai cadangan air dan tumbuhan menjadi dasar terjadinya kehidupan di bumi. Hal ini sesuai dengan Firman Allah SWT dalam Surah Al-Mu'minuun :

19.

فَأَنْشَأْنَا لَكُمْ بِهِ جَنَّاتٍ مِّنْ نَّجِيلٍ وَأَعْنَابٍ لَّكُمْ فِيهَا فَوَكِهٌ كَثِيرٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ

Artinya : *“Lalu dengan air itu, Kami tumbuhkan untuk kamu kebun-kebun kurma dan anggur; di dalam kebun-kebun itu kamu peroleh buah-buahan yang banyak dan sebagian dari buah-buahan itu kamu makan.”* (Q.S. Al-Mu’minun : 19)

Berdasarkan Tafsir Ibnu Katsir, mengutip dari ayat 19 Surah Al-Mu’minun, Kata نَخِيلٍ وَأَعْنَابٍ kurma atau anggur merupakan salah satu buah yang diberikan kepada penduduk hijaz dan juga dikawasan lainnya. Semua buah-buahan yang ada pada mereka termasuk sebagian dan nikmat Allah yang membuat mereka tidak mampu mensyukurinya dengan syukur yang sebenar-benarnya. Kata مِنْهَا تَأْكُلُونَ seakan-akan kata ini *di-ataf-kan* kepada sesuatu yang diperkirakan keberadaannya. Bentuk lengkapnya seakan-akan dikatakan, kalian dapat memandang keindahan, kemasakannya sehingga sebagiannya dapat kalian makan dan dimanfaatkan.

Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran (2011) melalui buku Tumbuhan Dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains mentafsirkan kata *“... Anggur,... sebagian dari buah-buahan itu kamu makan”* pada surah Al-Mu’minun ayat 19 diatas sebagai petunjuk bahwa buah Anggur yang rasanya enak dan bisa kita makan ternyata memiliki banyak manfaat. Hal ini membuktikan bahwa Allah menciptakan sesuatu bukan karena tanpa adanya sebab. Anggur biasanya dapat berbuah lebat dan dapat dipanen pada musim kemarau. Manfaat buah ini juga sangat banyak. Kandungan di dalamnya cukup memadai untuk memenuhi kebutuhan vitamin dan mencegah berbagai penyakit khususnya di saat musim kemarau ketika anggur berbuah lebat. Jika dikorespondesikan buah anggur merupakan sumberglukosa, fruktosa, dan beberapa mineral seperti sodium,

potasium, kalsium dan besi. Senyawa aktif yang ada di buah maupun biji anggur salah satunya adalah polifenol.

Senyawa polifenol ini termasuk kelompok antioksidan alami. Antioksidan itu sendiri bertugas memperlambat dan mencegah kerusakan sel, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai zat pencegah kanker. Sejak 1980-an, penelitian memperlihatkan bahwa kandungan antioksidan (dalam hal ini *oligomeric proanthocyanidins*) ditemukan dalam jumlah yang signifikan pada biji buah anggur. Kombinasi antara tanin, polyphenol, dan asam lemak *polyunsaturated* menjadi zat pecegahan yang menghambat munculnya beberapa penyakit semisal kanker, gagal jantung, dan lain-lain. Kandungan zat yang terdapat pada anggur ini berpotensi untuk dijadikan obat. Disebutkan dalam hadits shahih riwayat Imam Bukhari, bahwa Rasulullah *shallallahu 'alaihi wa sallam* bersabda :

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya : “Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya.” (HR Bukhari).

Hadits ini menjelaskan bahwa setiap penyakit ada obatnya dari sisi Allah *subhanahu wa ta'ala*. Penyakit dalam urusan-urusan badan manusia Allah pasti turunkan obatnya, kita hanya perlu menggali potensi obat-obatan yang Allah turunkan sehingga dapat dimanfaatkan. Hal tersebut dapat dibuktikan pada penelitian ini, bahwa fraksi etil asetat dan isolat biji anggur bali berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker dan antitumor dengan nilai LC_{50} secara urut sebesar 6,422 ppm dan 8,531 ppm.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Nilai LC₅₀ fraksi etil asetat dan isolat KLTP biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavallee) masing-masing memiliki nilai LC₅₀ sebesar 6,422 ppm dan 8,531 ppm. Fraksi etil asetat dan isolat KLTP memiliki toksisitas dengan kategori sangat toksik.
2. Identifikasi UV-Vis fraksi etil asetat biji Anggur Bali dengan metode *batesmith* menghasilkan serapan λ_{maks} pada daerah 549,9 nm yang menandakan kemungkinan adanya senyawa flavonoid jenis proantosianidin.
3. Identifikasi UV-Vis isolat KLTP biji Anggur Bali menggunakan metode *batesmith* diduga tidak terdapat senyawa flavonoid jenis proantosianidin. Hasil identifikasi tidak ditemukan λ_{maks} pada rentang panjang gelombang 540-550 nm. Namun, hasil identifikasi LCMS/MS menunjukkan adanya senyawa flavonoid jenis catechin, prodelfinidin A1, flavonols, 2-hydroxyflavanone.

5.2 Saran

Perlu dilakukan uji metode lain untuk proses isolasi pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid biji Anggur Bali selain dengan KLTP yaitu misalnya dengan cara kromatografi kolom sehingga dapat dapat diketahui efek dari penggunaan metode pemisahan terhadap kandungan senyawa yang diperoleh.

Selanjutnya, perlu dilakukan uji bioaktivitas lainmisalnya uji antikanker dan antitumor pada fraksi etil asetat hasil ekstraksi ultrasonik dengan pelarut metanol: air: HCl untuk pengembangan pemanfaatan biji Anggur Bali dalam bidang biofarmaka karena memiliki nilai toksisitas dengan kategori sangat toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, Karta R.A. 2020. Optimasi Metode Kestabilan Senyawa Proantosianidin Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavalley) Didasarkan Jenis Pelarut Dan Waktu Ekstraksi Ultrasonik Pada Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Al-Qarni Aidh. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Aleixandre-Tudo, J.L., Buica, A., Nieuwoudt, H., Aleixandre, J.L. and du Toit, W., 2017. Spectrophotometric analysis of phenolic compounds in grapes and wines *J. Agric. Food Chem.* 65, 20, 4009–4026.
- Amalina, N. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70 % Buah Merica Hitam (*Piper nigrum* L) Terhadap Sel Hela. Surakarta : Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., dan Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY*. (1), 173-188.
- Anggraini, P. 2008. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Terhadap Sel Hela. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- AOAC. 1995. *Official Method International of Analysis of AOAC International 16th ed.* AOAC International. Arlington Virginia.
- Arnous A, Meyer AS. 2008. Comparison of methods for compositional characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins. *Food Bioprod Process* 86:79–86.
- Ar-Rifa'i, M., dan Nasib. 1999. *Ringkasan Tafsir Ibnu Katsir*. Jakarta: Gema Insani.
- Astawa, I N.G., dkk. 2015. Perbaikan Kualitas Buah Anggur Bali (*Vitis Vinifera* L.. Var. Alphonso Lavalley) melalui Aplikasi GA3 sebelum Bunga Mekar. *AGROTROP*, 5 (1): 37 – 42.
- Atolani, O., Omere, J., Otuechere, C. A., & Adewuyi, A. 2012. Antioxidant and Cytotoxicity Effects of Seed Oils From Edible Fruits. *Journal of Acute Disease*, 1(2), 130-134.

- Austen, N., J. Walker Heather, Ann Lake Janice, K. Phoenix Gareth, and Drummond Cameron Duncan. 2019. The Regulation of Plant Secondary Metabolism in Response to Abiotic Stress: Interactions Between Heat Shock and Elevated CO₂. *Front Plant Sci* Vol. 10.
- Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia. 2014. Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Jakarta : Peraturan Kepala BPOM RI.
- Baihaki, 2017. Peningkatan Efektivitas Ekstraksi Oleoresin Pala (Myristica Fragrans) Menggunakan Metode Berbantuan Ultrasonik. [Tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Budiastra, I.W., Sutrisno, dan Abdulazis, A. 2018. Pengaruh Amplitudo Dan Lama Eksitasi Gelombang Ultrasonik Terhadap Produktivitas Ekstraksi Oleoresin Pala. *Prosiding Seminar Nasional PERTETA* Institut Pertanian STIPER, Yogyakarta – Indonesia ISBN : 978-602-51151-6-5.
- Canbay, H.S., dan Belgin, B. (2011). Determination of Fatty Acid, C, H, N and Trace Element Composition in Grape Seed by GC/MS, FTIR, Elemental Analyzer and ICP/OES. *SDU journal of Science (E-Journal)* 6(2): 140- 14.
- Catalano, D., Fontana, S., Roda, G., Dell'Acqua, L., La Forgia, F., Mustich, G., Sorrenti, G., Suriano, S., Visconti, G.L., dan Gambaro, V. 2013. Methods for the Evaluation of Polyphenolic Content in UV Troia Canosina Grape and Seeds at the Different Maceration Stages. *ISRN Analytical Chemistry Research Article*, Article ID 548296, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/548296>.
- Centeno, G.M.R. , Comas-Serra, F. A. Femenia, C. Rosselló, S. Simal. 2014. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry* Volume 22.
- Chen, L., Tian, X., Xia, D., Nie, Y., Lu, L., Yang, C., dan Zhou, Z. 2019. Novel Colorimetric Method for Simultaneous Detection and Identification of Multimetal Ions in Water: Sensitivity, Selectivity, and Recognition Mechanism. *ACS Omega* (4) : 5915–5922.
- Chen, J., Thilakarathna, W.P.D., Astatkie, T., Rupasinghe, H.P.V. 2020. Optimization of Catechin and Proanthocyanidin Recovery from Grape Seeds Using Microwave-Assisted Extraction. *Biomolecules* 10 (243).

- Da Porto, C., Porretto, E., dan Decorti, D. 2013. Comparison of Ultrasound-Assisted Extraction with Conventional Extraction Methods of Oil and Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonic Sonochemistry*. Volume 20, Nomor 4.
- Day, R. A. dan Underwood, A. L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Erlangga.
- Deskawi, O., Ningsih, R., Avisena, N., dan Hastuti, E. 2015. Potensi Ekstrak Kasar The Hitam (*Camellia sinensis* O.K var. *Assamica*) sebagai Pewarna (Dye) pada Pembuatan Sela Surya Tersensitilasi (SSPT). *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 4(1), 50-59.
- Dewi, S., Rahman, F., Handayani, N., dan Rahmawati, R. 2010. Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus sconoideus* Lam.). *Skripsi*. Lampung: Universitas Lampung.
- Diaconeasa, Zorita. 2018. Time-Dependent Degradation of Polyphenols from Thermally-Processed Berries and Their In Vitro Antiproliferative Effects against Melanoma. *Molecules* 23 : 2534.
- Eguez, I., Ramos, F.H., Rivilla, I., Labidi, J. 2021. Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Apple Pomace. *Molecules* 26 : 3783.
- Fakhri, A. (2010). Kultur In Vitro Tanaman *Theobroma cacao* dengan Variasi Penelitian Glikol (PEG) 6000 dan Potensinya untuk Produksi Metabolit Sekunder Katekin. Padang: Universitas Andalas.
- Fangidae, T.S., Bage, T.M.P., Anggorowati, A.A., dan Sudaryanto Y. 2020. Study of Malachite Green Adsorption using Tannin-Based Adsorbent (TBA) from Mangrove Bark (*Rhizophora mucronata*). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"* ISSN 1693-4393 Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia Yogyakarta.
- FAO-OIV. 2016. *Table and Dried Grapes*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the International Organisation of Vine and Wine.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S. 1982. *Kimia Organik*. Diterjemahkan oleh Pudjastmakan, A. H., Edisi Ketiga, Jilid 1, Penerbit Erlangga : Jakarta.

- Fuadi, Anwar. 2012. Ultrasonik Sebagai Alat Bantu Ekstraksi Oleoresin Jahe. *Jurnal Teknologi*, Vol. 12, No. 1.
- Gandjar, I. B., dan Rohman. A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter , R.J, Bobbic, J.N., dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi II, hal 107, ITB Press Bandung.
- Hafidloh, Dewi. 2014. Sitotoksik Ekstrak Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L) Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hamka, Buya. 2007. Tafsir Al-Azhar jilid ke V. Singapura: Pustaka Nasional PTE LTD.
- Handaya, A. 2008. *Daya Antimikroba Infusum Jambu Air Semarang (Syzygium Semarangense) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Stretococcus Mutans, In Vitro*. Universitas Indonesia
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Terjemahan: Padmawinata K. dan Soedira, I*. Bandung: Institut Teknologi Bandung Press.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan oleh Padmawinata K dan Soedira I. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Harli, A.S. 2016. Uji Toksisitas Fraksi Ekstrak Etanol Daun Pedang-Pedang (*Sansevieria trifasciata* Prain) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Khasanah, N.W., Karyadi, B., Sundaryono, A. 2020. Uji Fitokimia dan Toksisitas Ekstrak Umbi *Hydnophytum sp.* terhadap *Artemia salina* Leach. *PENDIPA Journal of Science Education* 4 (1) : 47-53 ISSN 2086-9363.
- Khasanudin, A. 2018. Sintesis Basa Schiff Dari Vanilin Dan P-Anisidin Dengan Variasi Jumlah Katalis Asam Dari Jus Jeruk Nipis. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.

- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kim, D., Lee, J., Yu, K. & Yoon, T. J. 2006. Innate Immune Stimulation of polysaccharide Fraction from Grape Peel. *Food Sci.Biotechnol*, 20(1), 107-113.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurnia, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Ku, C. S., dan Mun, S. P. 2007. Characterization of Proanthocyanidin In Hot Water Extract Isolated from Pinus Radiata Bark. *Wood Science and Technology*. 41(3), 235.
- Kumar, N., Nautiyal, S. 2013. An Inventory of Medicinal Wealth of Jhil-Mil Jheel Conservation Reserve. *International Journal Of Herbal Medicine* Volume: 1, Issue: 2.
- Lajnah Pentashihan Mushaf Al Quran. 2011. *Tumbuhan dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains*. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an ISBN: 978-602-9306-07-1.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil flavonoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Lestari, D., Kartika, R., Marliana, E. 2019. Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) Dan Uji Toksisitas Akut Fraksi Aktif. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia* Vol.1 No.1.
- Lestari, Mira W., Isbandiyah, Hasanah, A. 2017. Pengaruh Ekstrak Biji Anggur (*Vitis vinifera*) Var Alphonso Lavallee Terhadap Fungsi Ginjal Mencit Jantan (Mus Musculus) Model Hiperurisemia. *E-Journal UMM* Volume 13 Nomor 1.
- Liang, C., and Drohojowski, N. 2008. Grape in College Seminar 235 Food for Thought: The Science, Culture, & Politics of Food Spring. *Academics hamilton edu*.
- Liu, S.X. dan White, E. 2012. Extraction and Characterization of Proanthocyanidins from Grape Seeds. *The Open Food Science Journal* 6, 5-11.

- Mangurana, W.O.I., Yusnaini., Sahidin. 2019. Analisis LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) dan metabolit sekunder serta potensi Antibakteri ekstrak n-heksana spons *Callispongia aerizusa* yang diambil pada kondisi tutupan terumbu karang yang berbeda di perairan teluk staring. *Jurnal Biologi Tropis*. 19 (2): 131-141.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung : Penerbit ITB.
- Mawaddah. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi N-Heksana *Hydrilla verticillat*. *Skripsi*. Malang : Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Min Lv, Ji. 2021. Ultrasound-Assisted Extraction Optimization of Proanthocyanidins from Kiwi (*Actinidia chinensis*) Leaves and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Antioxidants* 10 : 1317.
- Mutia, Dita. 2010. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Anggur (*Vitis Vinifera*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Artikel Karya Tulis Ilmiah* Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
- Nallatambi, R., Poulev, A., Joshua, B., Zuk dan Raskin, I. 2020. Proanthocyanidin Rich Grape Seed Extract Reduces Inflammation and Oxidative Stress and Restores Tight Junction Barrier Function in Caco-2 Colon Cells. *Journal Nutrients* Volume 12.
- Ocktaviandini, Mayang. 2015. Kajian Perbedaan Konsentrasi Pelarut Etil Asetat Terhadap Karakteristik Ekstrak Zat Warna Dari Sabut Kelapa (*Cocos nucifera* L). *Jurnal Artikel Skripsi* Jurusan Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Pasundan.
- Porter, L. J., Hrstich, L. N., dan Chan, B. G. 1985. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25(1), 223-230.
- Purwanto, N., Rismawati, E., Sadiyah, E.R. 2015. Uji Sitotoksik Ekstrak Biji Salak (*Salacca Zalacca* (Gaert) Voss) dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Prosiding Penelitian* Farmasi UNISBA ISSN 2460-6472 616.
- Puspitasari, E., Rozirwan., Hendri, M. 2018. Uji Toksisitas dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Pada Ekstrak Mangrove (*Avicennia marina*, *Rhizophora mucronata*, *Sonneratia alba* dan

Xylocarpus granatum) yang Berasal dari Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Biologi Tropis*, Volume 18 (1).

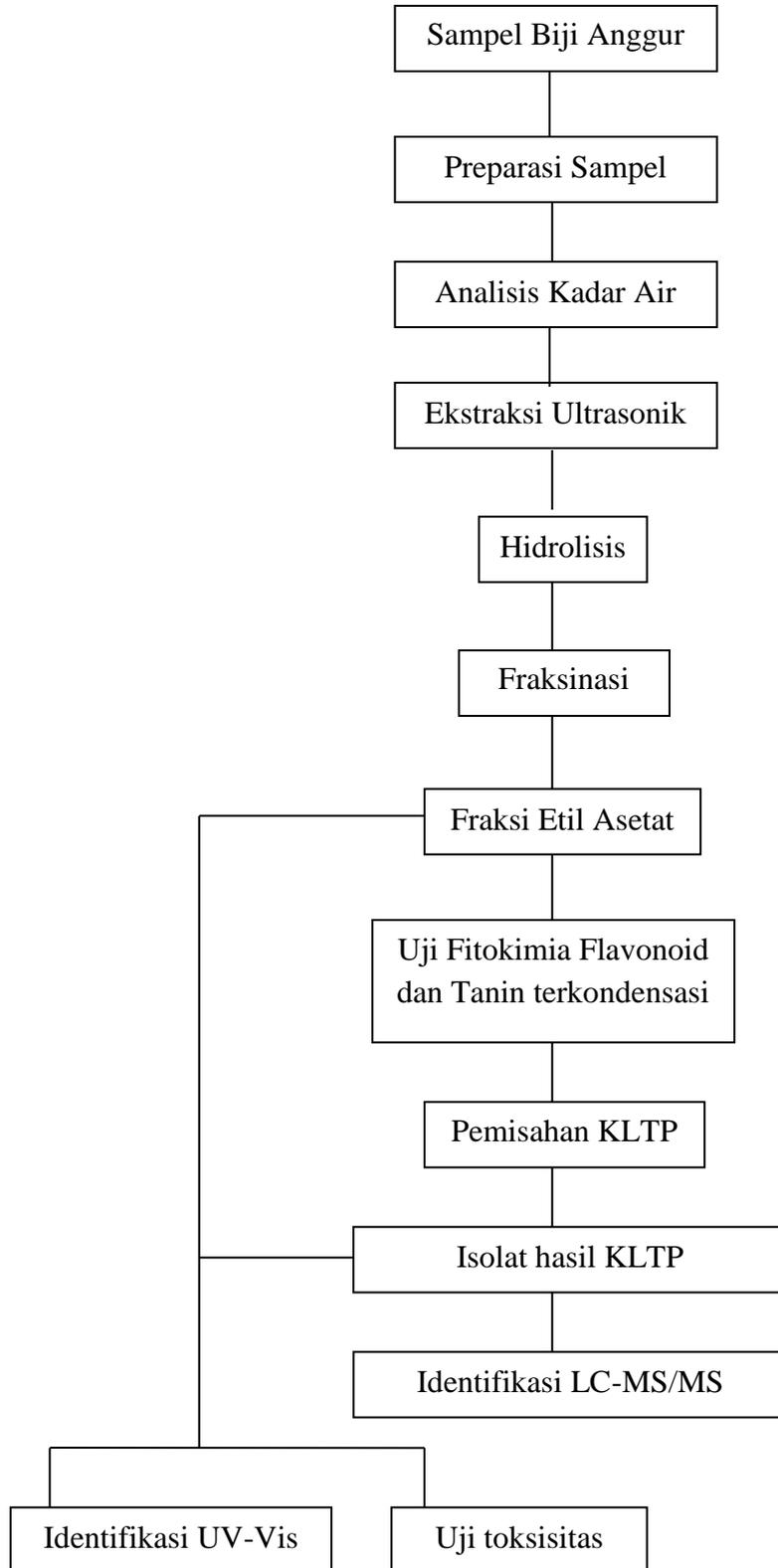
- Rahardjo, M. D. (2002). *Ensiklopedi Alquran tafsir sosila berdasarkan konsep-konsep kunci*. Jakarta: Paramadina.
- Rayess, Y.R., Barbar, R., Wilson, E. A., dan Bouajila, J. 2014. Analytical Methods for Wine Polyphenols Analysis and for Their Antioxidant Activity Evaluation. *Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits*. 71-101.
- Sari, O.P., dan Taufiqurrohmah, T. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Fraksi Etil Asetat Rimpang Tumbuhan Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schelecht) (*Zingiberaceae*). *Indo J. Chem.*, 6 (2), 219-223.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sepadan, Akbar. 2014. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol 96% Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Setiadi. 2005. *Bertanam Anggur*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J.E., Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in Grape Seed Biochemistry and Functionality. *Journal Medical Food* 6 (4).
- Shihab, M. Q. 2001. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Simpson, Nigel, J. K. 2000. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. New York: CRC Press.
- Sochorova, L., Prusova, B., Cebova, M., Jurikova, T., Mlcek, J., Adamkova, A., Nedomova, S., Baron, M. dan Sochor, J. 2020. Health Effects of Grape Seed and Skin Extracts and Their Influence on Biochemical Markers. *Journal Molecules* Volume 25.
- Sumiarta, I. M. 2013. Kelompok Tani Anggur. *Dinas Pertanian Dan Peternakan Kabupaten Buleleng*. Bali.

- Suyatno, Rizky Ayu. 2014. Aktivitas Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Metanol Tumbuhan Paku *Adiantum Philippensis* L. *J. Chemistry* Vol.3 (1).
- Tambun, R., Limbong, Harry P., Pinem, C., Manurung, E. 2016. Pengaruh Ukuran Partikel, Waktu Dan Suhu Pada Ekstraksi Fenol Dari Lengkuas Merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*, Vol. 5, No. 4.
- Tao, Yang., Wu, Di., Zhang, Qing-An., Sun, Da-Wen. 2014. Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry* 21 : 706–715.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical Screening and Extraction : A Review. *International Pharmaceutical Sciencia* Vol. 1 : 98-106.
- Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., Dinev, T. 2020. Selectivity of Current Extraction Techniques for Flavonoids from Plant Materials. *Processes* (8) : 1222; doi:10.3390/pr8101222.
- Unusan, Nurhan. 2020. Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry. *Journal of Functional Foods* : 67.
- Venn, R. F. 2008. *Principles and Practice of Bioanalysis: Second Edition*. New York: CRC Press
- Villani, T.S., Reichert, W., Ferruzzi, M. G., Pasinetti, G.M., Simon, J.E., Qingli, Wu. 2015. Chemical Investigation of Commercial Grape Seed Derived Products To Assess Quality and Detect Adulteration. *Journal ELSEVIER Food Chemistry*.
- Vivas, N., Nonier, M. F., Pianet, I., de Gaulejac, N. V., dan Fouquet, É. 2006. Proanthocyanidins from *Quercus Petraea* and *Q. Robur* Heartwood: Quantification and Structures. *Comptes Rendus Chimie*. Volume 9, Nomor 1: 120-126.
- Wijaya, Anggie P. 2021. Uji Toksisitas Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavallee) Dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik Berdasarkan Variasi Pelarut Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Jurusan Kimia, UIN Malang.

- Wilhelmy, C., Pavez, C., Bordeu, E., Brossard, N. 2021. A Review of Tannin Determination Methods Using Spectro-photometric Detection in Red Wines and Their Ability to Predict Astringency. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 42, No. 1, 202.
- Xia, X. *et. al.*, 2010. Variation of Labile Organic Carbon Pools Along Elevation Gradient in The Wuyi Mountain, China. *Journal of Resource and Ecology*. 1(4). hal 368-374.
- Xu, Changmou., Zhang, Y., Wang, J., Lu, Jiang. 2010. Extraction, Distribution and Characterisation of phenolic Compound and Oil in Grape Seeds. *Food Chemistry* 122 (2010) 688–694.
- Yin, *et al.* 2011. Study on separation and purification of oligomeric proanthocyanidin from *Rhodiola rosea*. *Front. Agric. China* 5(4): 637–642.
- Zhang, M., Sun, J., Chen, P. 2017. A Computational Tool for Accelerated Analysis of Oligomeric Proanthocyanidins in Plants. *J Food Compost Anal*, 56: 124–133.
- Zhou, K., dan Raffoul, J. 2012. Potential Anticancer Properties of Grape Antioxidants. *Journal of Oncology*.
- Zubaidah, E. dan Veronica, C. 2014. Studi Aktivitas Antioksidan Cuka Berbasis Buah Anggur Bali (*Vitis Vinifera*) Utuh Dan Tanpa Kulit. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, Vol. VII, No. 2.

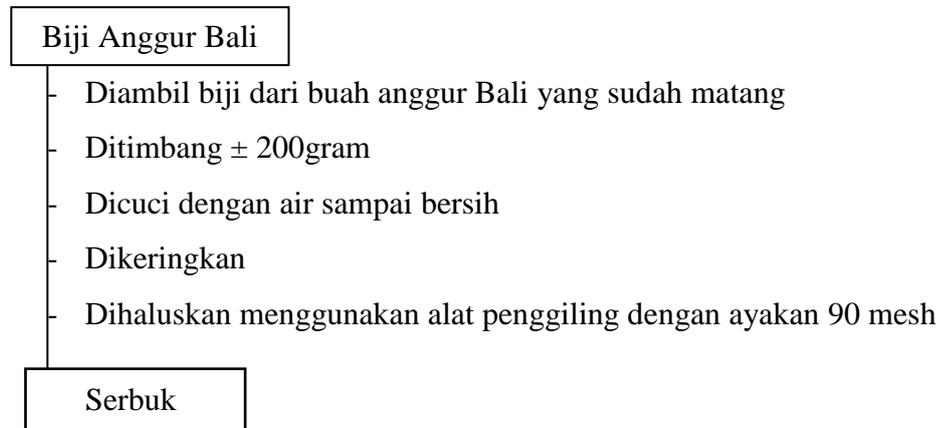
LAMPIRAN

Lampiran 1. Tahapan Penelitian

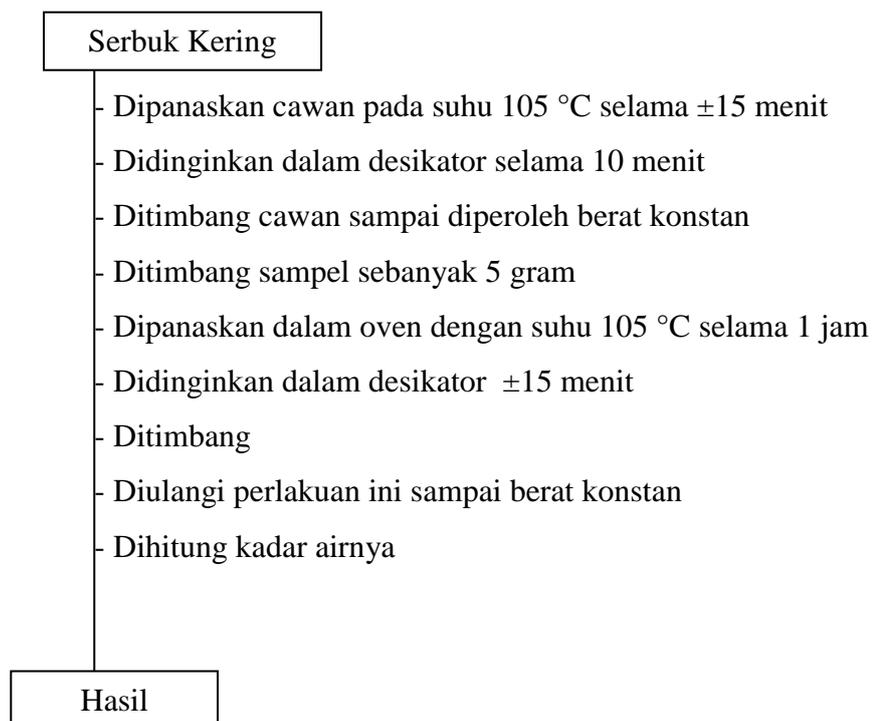


Lampiran 2. Diagram Alir

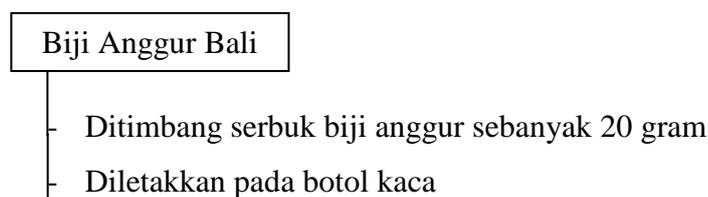
L.1.1 Preparasi Sampel

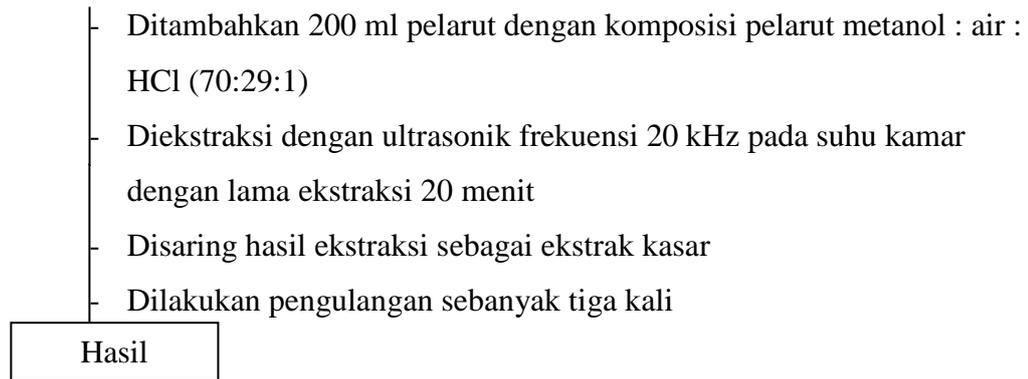


L.1.2 Analisis Kadar Air

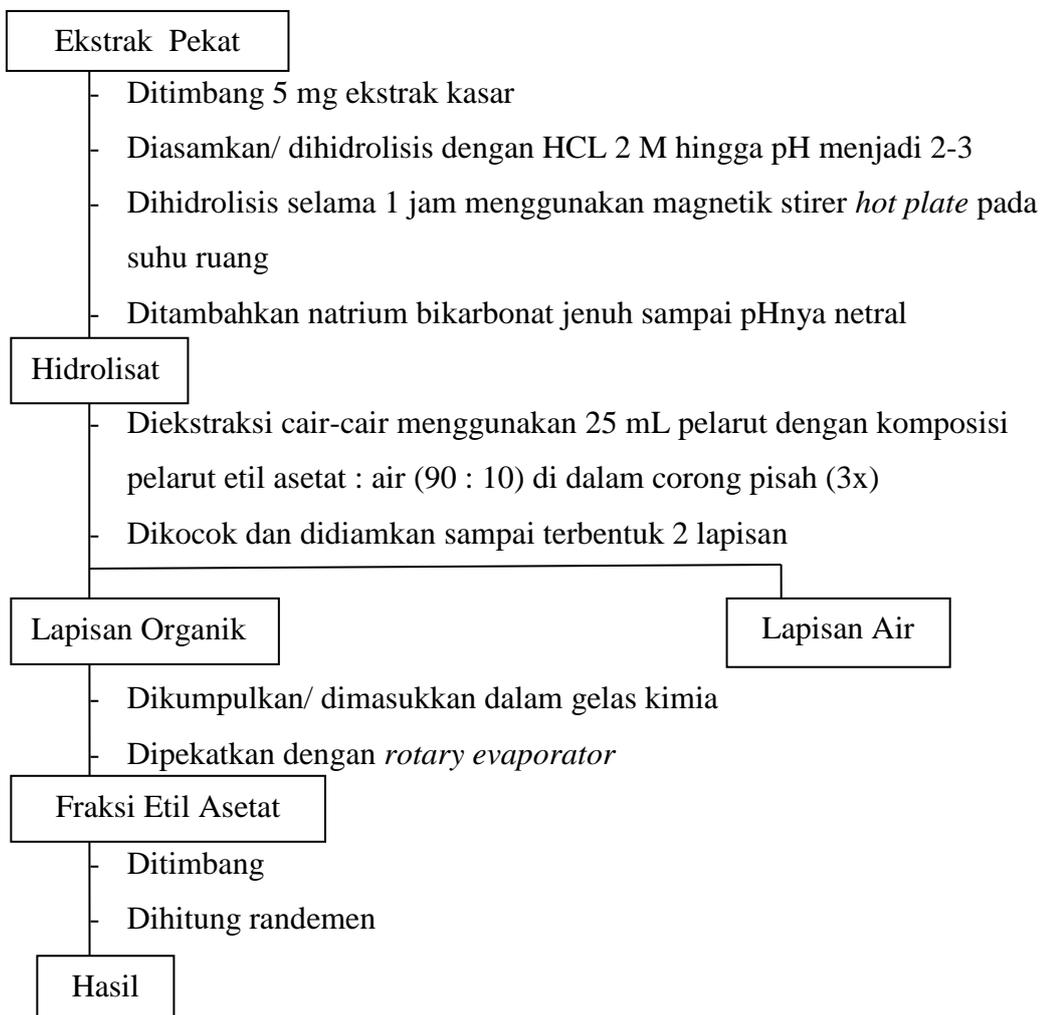


L.1.3 Ekstraksi Senyawa Flavonoid dengan ultrasonik



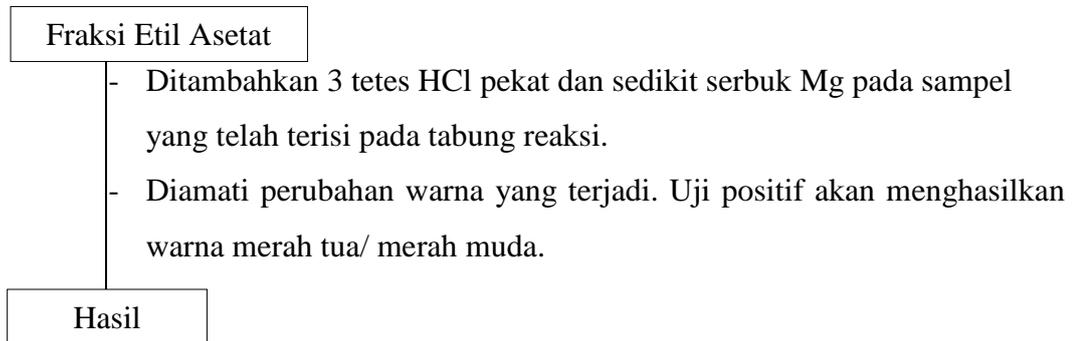


- L.1.4 Ekstraksi Cair-Cair Fraksinasi Etil Asetat

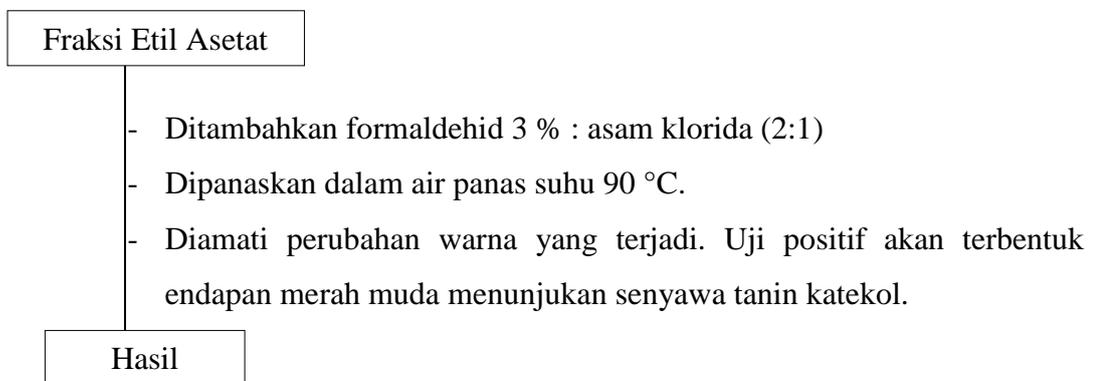


L.1.5 Uji Fitokimia Senyawa Aktif Flavonoid dan Tanin Terkondensasi

L.1.5.1 Uji senyawa aktif flavonoid

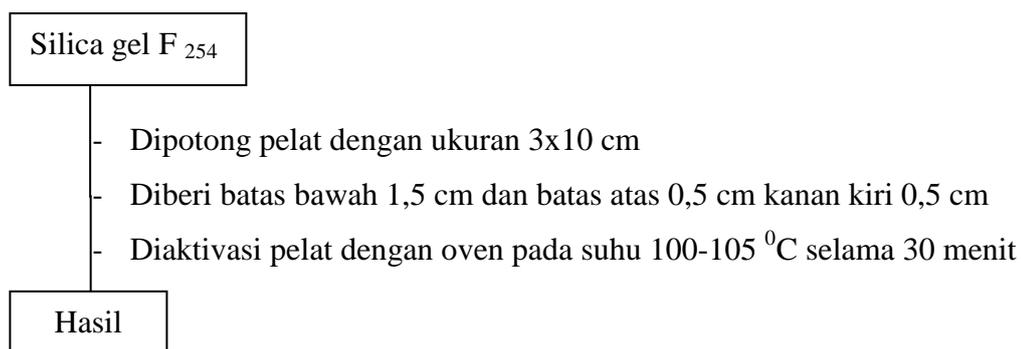


L.1.5.2 Uji senyawa aktif tanin terkondensasi

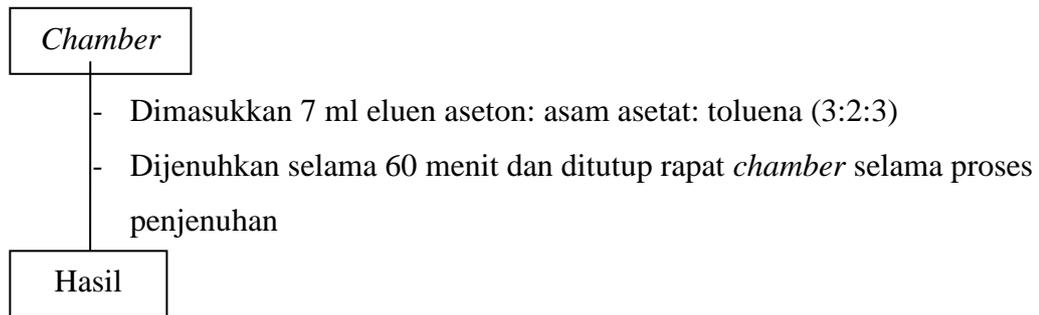


L. 1. 6Identifikasi Fraksi Etil Asetat Biji Anggur dengan KLTP

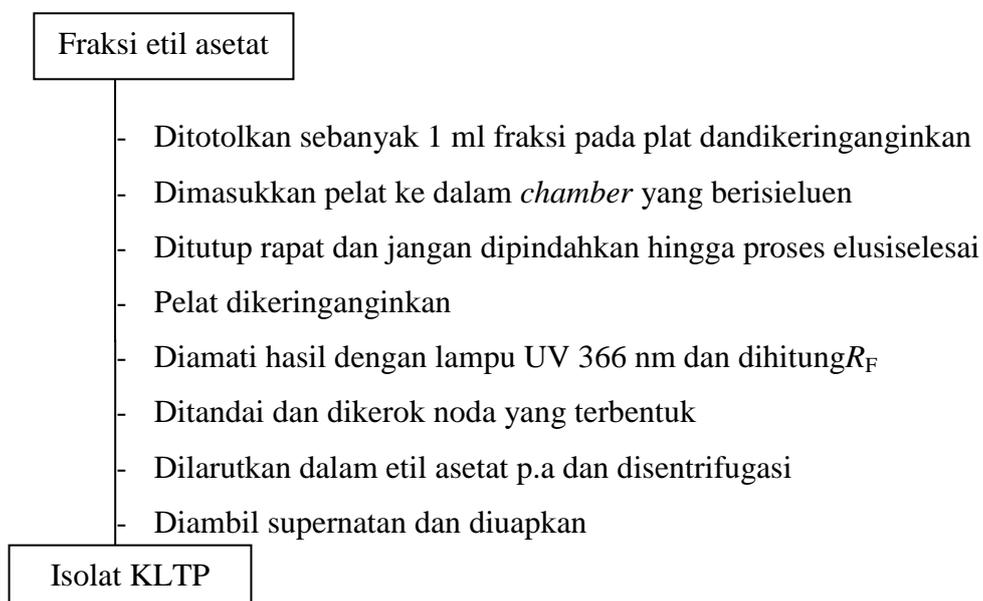
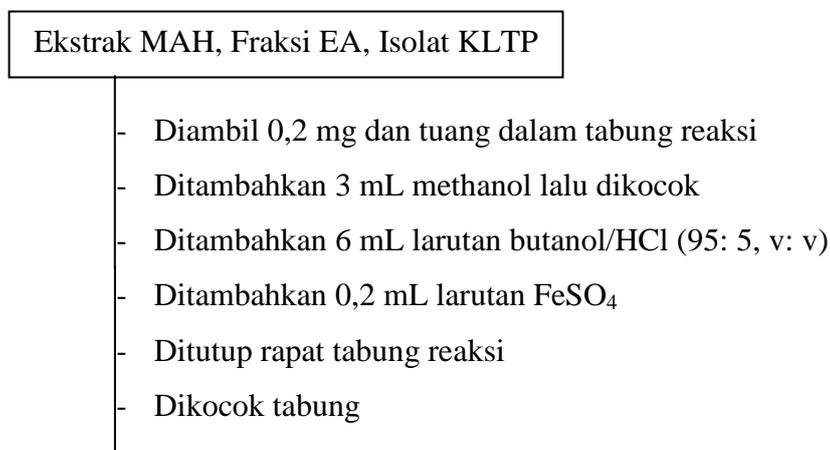
a. Persiapan Pelat KLT



b. Persiapan fase gerak (eluen)



c. Proses Elusi dan Pemisahan

**L.1.7 Identifikasi dengan UV-Vis**

- Diletakkan dalam penangas air selama 40 menit pada suhu 95 °C – 100 °C
- Didinginkan dalam air es
- Diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400-800 nm

Hasil

L.1.7 Uji Toksisitas Isolat

a. Penetasan Larva Udang

Larva Udang *Artemia salina*

- Dimasukkan kedalam 250 mL air laut
- Diaerasi selama ± 48 jam dengan suhu 25-30 °C

Hasil

b. Uji Toksisitas

Frakasi EA, Isolat Proantosianidin

- Dilarutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat 10 mL (menjadi larutan stok 100 ppm)
- Dipipet larutan stok 100 ppm beberapa mL untuk membuat konsentrasi 1,2,3,4,5 ppm
- Dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial dengan pengulangan 5 kali
- Diuapkan pelarutnya sampai kering
- Dimasukkan 100 µL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut
- Dikocok hingga ekstraknya larut
- Ditandabatkan hingga 10 mL dengan air laut
- Dimasukkan 10 ekor larva udang
- Diamati kematian larva udang setelah 24 jam
- Dianalisis datanya untuk mencari nilai LC₅₀

Hasil

L.1.8 Identifikasi isolat KLTP dengan LC-MS/MS

Fraksi Etil Asetat dan Isolat terbaik hasil KLTP

- Diambil sedikit cuplikan sampel
- Dilarutkan dalam pelarutnya (0,1% asam format dalam air (fase A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B) (70% fase A : 30% fase B)
- Diinjekkan ke dalam tempat sampel
- Dijalankan Instrumen LC-MS/MS

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan

L.3.1 Pembuatan Larutan Esktraksi Metanol : Air : HCl (70:29:1)

$$\text{Metanol} = \frac{70}{100} \times 300 \text{ ml} = 210 \text{ mL}$$

$$\text{Air} = \frac{29}{100} \times 300 \text{ ml} = 87 \text{ mL}$$

$$\text{HCl} = \frac{1}{100} \times 300 \text{ ml} = 3 \text{ mL}$$

Cara pembuatan : dipipet 210 mL metanol, dipipet 87 mL akuades dan dipipet 3 mL HCl, kemudian dimasukkan dalam wadah ekstrak yang berisi sampel.

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

$$\rho_{\text{HCl } 37\%} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

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

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

- Mol HCl dalam konsentrasi 37%

$$= \frac{\text{gram HCl}}{\text{BMHCl}}$$

$$= \frac{37 \text{ gram}}{36,42 \text{ g/mol}}$$

$$= 1,0159 \text{ mol}$$

- Volume larutan HCl dalam larutan HCl 37%

$$= \frac{m}{\rho}$$

$$= \frac{100 \text{ gram}}{1,19 \text{ g/ml}}$$

$$= 84,033 \text{ mL} = 0,084 \text{ L}$$

- Molaritas HCl 37%

$$= \frac{\text{Mol}}{V \text{ (L)}}$$

$$= \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,084 \text{ L}} = 12,094 \text{ mol/L}$$

- Normalitas HCl 37% $= n \times \text{Molaritas HCl}$
 $= 1 \times 12,094 \text{ mol/L}$
 $= 12,094 \text{ N}$

Sehingga untuk membuat larutan HCl 2 N sebanyak 100 mL dari larutan HCl 12,094 N menggunakan prinsip pengenceran berikut:

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

$$12,0894 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,5 \text{ mL}$$

Larutan HCl pekat 37% diambil sebanyak 16,5 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan larutan NaHCO₃ jenuh

Kelarutan NaHCO₃ sebesar 9,99 gr dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO₃ jenuh ditimbang NaHCO₃ dengan berat > 9,99 gr (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO₃ jenuh.

L.3.4 Pembuatan Larutan Formaldehid 3%

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

$$37\% \times V_1 = 3\% \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{150 \text{ mL}}{37} = 4,054 \text{ mL}$$

L.3.5 Pembuatan Larutan Pengembang Aseton : Asam asetat : Toluena (3:1:3)

$$\text{Aseton} = \frac{3}{7} \times 7 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$$

$$\text{Asam asetat} = \frac{1}{7} \times 7 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$$

$$\text{Toluena} = \frac{3}{7} \times 7 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$$

Cara pembuatan: dipipet 3 mL aseton, dipipet 1 mL asam asetat dan dipipet 3 mL toluene, kemudian dimasukkan dalam *chamber*.

L.3.6 Pembuatan Larutan FeSO₄ 2% (b/v)

$$\text{Larutan FeSO}_4 \text{ 2 \%} = \frac{2 \frac{\text{g}}{\text{mL}}}{100} \times 50 \text{ mL}$$

$$= 1 \text{ gram dalam 50 mL akuades}$$

Cara pembuatan FeSO₄ 2% yaitu padatan FeSO₄ ditimbang sebanyak 1 gram. Setelah itu, dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan akuades. Selanjutnya, dituangkan ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian ditanda bataskan dengan akuades dan dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan Konsentrasi Larutan Isolat untuk uji Toksisitas

L.3.7.1 Pembuatan Larutan Stok Fraksi Etil Asetat

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

$$\text{Larutan stok (ppm)} = 1 \text{ mg/L dalam 10 mL pelarutnya}$$

$$\text{ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}} = 100 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 100 ppm pada fraksi etil asetat dibuat dengan dilarutkan 1 mg fraksi kedalam 10 mL pelarutnya. Untuk membuat konsentrasi larutan 1,2,3,4,5 ppm dari larutan stok 100 ppm maka dibuat dengan rumus pengenceran dibawah ini.

- Pembuatan Larutan 1 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 1 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0001 \text{ L} = 0,1 \text{ mL}$$
- Pembuatan Larutan 2 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 2 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,02 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0002 \text{ L} = 0,2 \text{ mL}$$
- Pembuatan Larutan 3 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,03 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0003 \text{ L} = 0,3 \text{ mL}$$
- Pembuatan Larutan 4 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,04 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0004 \text{ L} = 0,4 \text{ mL}$$
- Pembuatan Larutan 5 ppm

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

$$V_1 \times 100 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,05 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0005 \text{ L} = 0,5 \text{ mL}$$

L.3.7.2 Pembuatan Larutan Stok Isolat KLTP

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

Larutan stok (ppm) = 2,9 mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{2,9 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}} = 290 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 290 ppm pada isolate KLTP dibuat dengan dilarutkan 2,9 mg isolat kedalam 10 mL pelarutnya. Untuk membuat konsentrasi larutan 1,2,3,4,5 ppm dari larutan stok 100 ppm maka dibuat dengan rumus pengenceran dibawah ini.

- Pembuatan Larutan 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 290 \text{ ppm} &= 0.01 \text{ L} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{290 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000034 \text{ L} = 34 \mu\text{L} \end{aligned}$$

- Pembuatan Larutan 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 290 \text{ ppm} &= 0.01 \text{ L} \times 2 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,02 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{290 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000069 \text{ L} = 69 \mu\text{L} \end{aligned}$$

- Pembuatan Larutan 3 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 290 \text{ ppm} &= 0.01 \text{ L} \times 3 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,03 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{290 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000104 \text{ L} = 104 \mu\text{L} \end{aligned}$$

- Pembuatan Larutan 4 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 290 \text{ ppm} &= 0.01 \text{ L} \times 4 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,04 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{290 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000138 \text{ L} = 138 \mu\text{L} \end{aligned}$$

- Pembuatan Larutan 5 ppm

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

$$V_1 \times 290 \text{ ppm} = 0.01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,05 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{290 \text{ ppm}} = 0,000172 \text{ L} = 172 \mu\text{L}$$

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan

L.4.1 Rendemen Sampel Kering Ekstrak Biji Anggur Bali

Berat sampel basah = 400 gram

Berat serbuk kering = 250 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat serbuk kering}}{\text{berat serbuk basah}} \times 100\% \\ &= \frac{250 \text{ g}}{400 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 94\% \end{aligned}$$

L.4.2 Penentuan Kadar Air Sampel Kering Ekstrak Biji Anggur Bali

Tabel L.4.1. Data Berat Cawan Kosong

Sebelum Dioven	Berat Cawan Kosong (g)		Berat Cawan Konstan (g)
	U ₁	U ₂	
35,1732	35,1725	35,1727	35,1727
57,6634	57,6624	57,6623	57,6623
53,9253	53,9228	53,9227	53,9227

Tabel L.4.1. Data Berat Cawan + Sampel

Sebelum Dioven	Berat Cawan Kosong (g)		Berat Cawan + Sampel Konstan (g)
	U ₁	U ₂	
35,6730	35,6345	35,6344	35,6344
58,1629	58,1233	58,1231	58,1231
54,4245	54,3839	54,3837	54,3837

Keterangan : U = ulangan

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{35,6730 \text{ gr} - 35,6344 \text{ gr}}{35,6730 \text{ gr} - 35,1727 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0386 \text{ gr}}{0,5003 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 7,72 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{58,1629 \text{ gr} - 58,1231 \text{ gr}}{58,1629 \text{ gr} - 57,6623 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0386 \text{ gr}}{0,5006 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= 7,71 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{54,4245 \text{ gr} - 54,3837 \text{ gr}}{54,4245 \text{ gr} - 53,9227 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0408 \text{ gr}}{0,5018 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= 8,13 \%
 \end{aligned}$$

Kadar air rata-rata yang terkandung pada sampel kering biji Anggur Bali adalah 7,85%.

L.4.3 Rendemen Hasil Ekstraksi Ultrasonik

Berat gelas kosong = 35,3812 g

Berat gelas kosong + ekstrak pekat = 42,0893 g

Berat ekstrak pekat = 6,7081 g

Nilai rendemen dihitung dengan rumus:

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{6,7081 \text{ gram}}{20 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 33,5405\%
 \end{aligned}$$

L.4.3 Rendemen Hasil Fraksi Etil Asetat

Berat gelas kosong = 62,3237 g

Berat gelas kosong + fraksi pekat = 63,4784 g

Berat ekstrak pekat = 0,1547 g

Nilai rendemen dihitung dengan rumus:

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,1547 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 3,094\% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data Hasil KLTP

Nilai R_F dihitung dengan rumus:

$$R_F = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh eluen}}$$

Nomor Noda	Jarak Tempuh Noda (cm)	Jarak Tempuh Eluen (cm)	R_F
1	2,2 cm	8	0,275
2	3,9 cm	8	0,488
3	5,3 cm	8	0,663
4	6,2 cm	8	0,775
5	7,1 cm	8	0,888

Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas

Nilai %Mortalitas dan Mortalitas dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{Jumlah larva dalam 1 vial (10)}} \times 100\%$$

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ Mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Tabel L.6.1. Hasil uji toksisitas fraksi EA dan isolat 3

Konsentrasi (ppm)	Modus larva yang mati (ekor)		% Mortalitas		Mortalitas	
	Fraksi EA	Isolat 3	Fraksi EA	Isolat 3	Fraksi EA	Isolat 3
0*	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	1	1	10	10	5	5
4	2	1	20	10	10	5
5	2	1	20	10	10	5

Keterangan:

0 = Kontrol tanpa ekstrak

0* = Kontrol pelarut

0** = Kontrol DMSO

Tabel L.6.2. Nilai LC₅₀ sampel uji

Sampel Uji	Nilai LC ₅₀ (ppm)	Kategori
Fraksi Etil Asetat	6,422	Sangat Toksik
Isolat 3	8,531	Sangat Toksik

Probit Analysis: Mortalitas; N (Fraksi Etil Asetat) versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	25
	Non-event	225
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2,86201	0,432654	-6,62	0,000
Konsentrasi	0,445663	0,106821	4,17	0,000

Natural

Response 0

Log-Likelihood = -69,613

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	5,26531	3	0,153
Deviance	6,63769	3	0,084

Tolerance Distribution

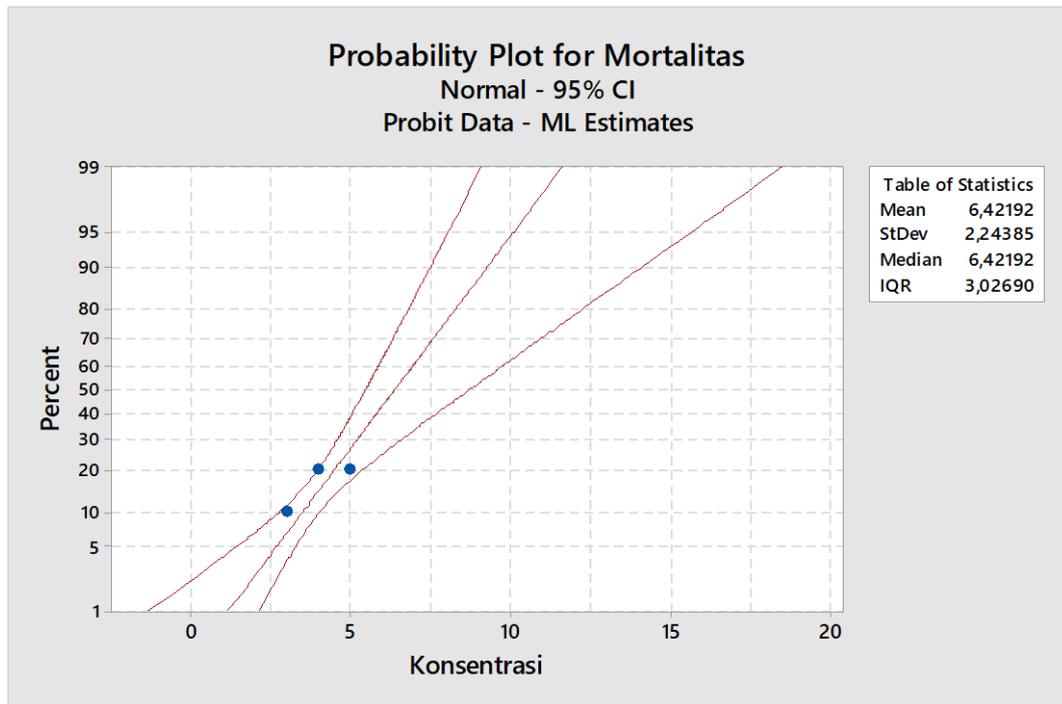
Parameter Estimates

Standard 95,0% Normal CI

Parameter	Estimate	Error	Lower	Upper
Mean	6,42192	0,661197	5,12600	7,71784
StDev	2,24385	0,537828	1,40271	3,58937

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	1,20195	0,698168	-1,28856	2,16672
2	1,81362	0,565339	-0,162802	2,61075
3	2,20171	0,485196	0,542727	2,90120
4	2,49365	0,428353	1,06599	3,12718
5	2,73112	0,385316	1,48445	3,31817
6	2,93325	0,351806	1,83339	3,48795
7	3,11047	0,325534	2,13189	3,64428
8	3,26915	0,305126	2,39141	3,79201
9	3,41347	0,289669	2,61943	3,93437
10	3,54631	0,278497	2,82117	4,07355
20	4,53345	0,306450	4,01011	5,41800
30	5,24524	0,418542	4,62265	6,63220
40	5,85345	0,539202	5,08857	7,72717
50	6,42192	0,661197	5,50429	8,77038
60	6,99039	0,787881	5,91026	9,82333
70	7,59859	0,926432	6,33847	10,9560
80	8,31039	1,09098	6,83478	12,2864
90	9,29752	1,32172	7,51799	14,1366
91	9,43037	1,35293	7,60963	14,3859
92	9,57468	1,38686	7,70911	14,6568
93	9,73337	1,42421	7,81842	14,9547
94	9,91059	1,46597	7,94043	15,2876
95	10,1127	1,51364	8,07948	15,6672
96	10,3502	1,56971	8,24273	16,1134
97	10,6421	1,63872	8,44326	16,6621
98	11,0302	1,73057	8,70959	17,3918
99	11,6419	1,87558	9,12891	18,5423



Probit Analysis: Mortalitas, N (Isolat 3) versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	15
	Non-event	235
	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.61446	0.438412	-5.96	0.000
Konsentrasi	0.306474	0.111272	2.75	0.006
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -52.210

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	6.05856	3	0.109
Deviance	6.89550	3	0.075

Tolerance Distribution

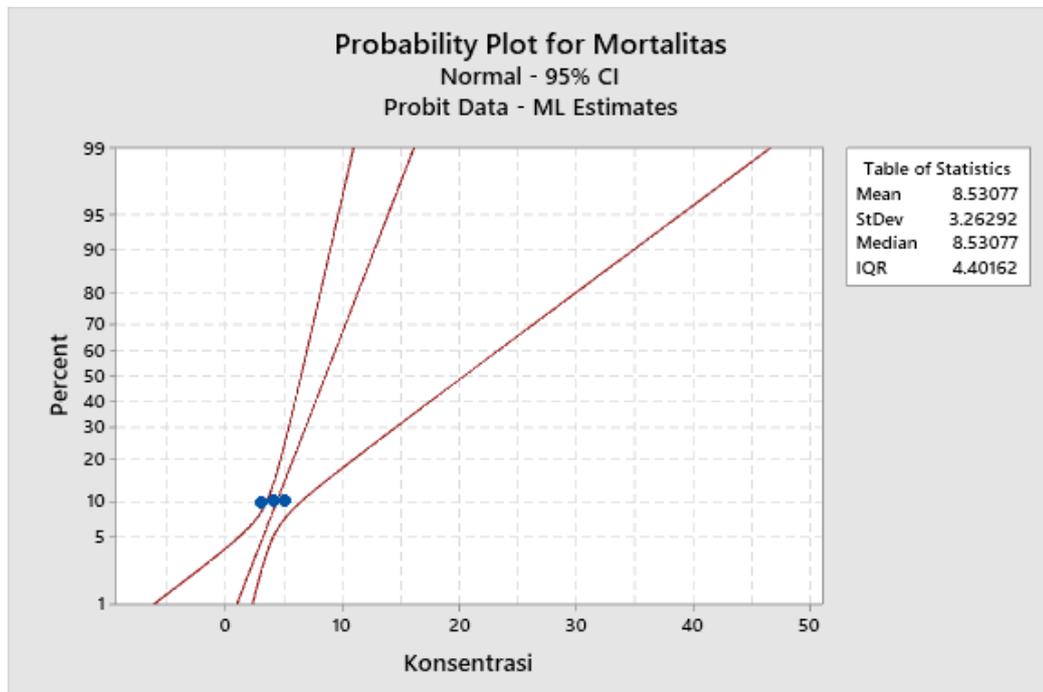
Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	8.53077	1.78728	5.02776	12.0338
StDev	3.26292	1.18468	1.60162	6.64745

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	0.940077	1.11004	-6.18186	2.28654
2	1.82955	0.822430	-3.17316	2.88176
3	2.39389	0.657194	-1.30694	3.30212
4	2.81842	0.550749	0.0455552	3.66973
5	3.16374	0.483509	1.07831	4.03616
6	3.45766	0.446493	1.87032	4.43506
7	3.71538	0.433488	2.46481	4.88477
8	3.94613	0.438776	2.90260	5.38193
9	4.15599	0.457064	3.22762	5.90722
10	4.34917	0.483996	3.47734	6.44021
20	5.78463	0.854846	4.70098	11.0327
30	6.81969	1.19410	5.38318	14.5444
40	7.70412	1.49787	5.93535	17.5757
50	8.53077	1.78728	6.43992	20.4206
60	9.35742	2.07974	6.93823	23.2717
70	10.2419	2.39474	7.46711	26.3263
80	11.2769	2.76518	8.08247	29.9048
90	12.7124	3.28094	8.93184	34.8716
91	12.9056	3.35047	9.04589	35.5402
92	13.1154	3.42604	9.16973	36.2667

93	13.3462	3.50916	9.30584	37.0655
94	13.6039	3.60204	9.45779	37.9578
95	13.8978	3.70800	9.63099	38.9755
96	14.2431	3.83255	9.83438	40.1713
97	14.6677	3.98573	10.0843	41.6415
98	15.2320	4.18947	10.4163	43.5961
99	16.1215	4.51081	10.9391	46.6772

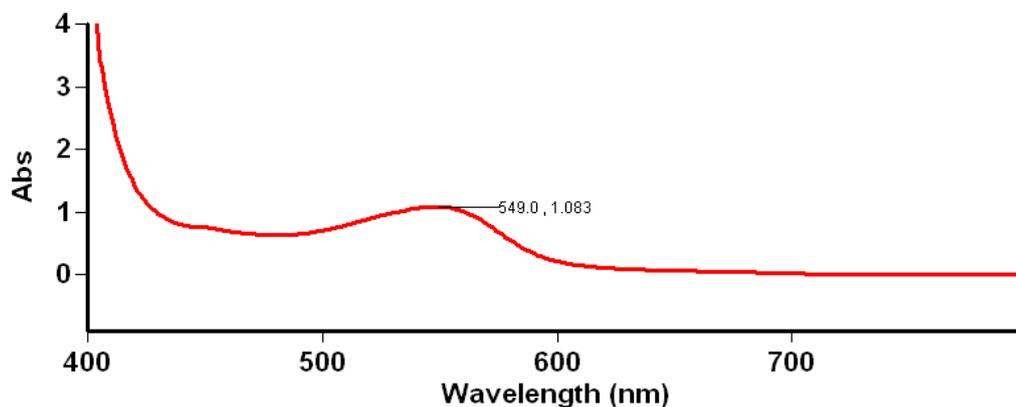


Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Ekstrak MAH, Fraksi EA dan Isolat 3 KLTP

L.7.1 Hasil identifikasi ekstrak MAH

Lamdha Maks Ekstrak MAH

Tanggal Analisa : 14 Juli 2021



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 14 Jul 12:44:30 PM 2021
 Method:
 Batch: D:\Salma\Lamdha Maks Ekstrak MAH (14-07-2021).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Ekstrak MAH

Collection Time 7/14/2021 12:44:34 PM

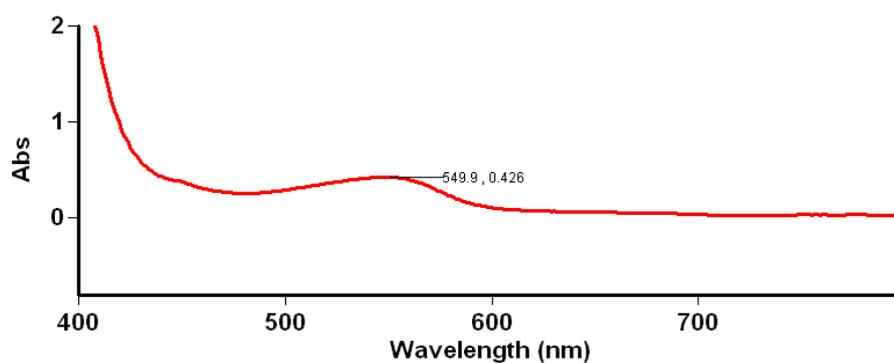
Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 799.9nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
549.0	1.083
402.1	10.000

L.7.2 Hasil identifikasi fraksi EA

Lamdha Maks Fraksi EA

Tanggal Analisa : 19 Juli 2021



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 19 Jul 10:29:29 AM 2021
 Method:
 Batch: D:\Salma\Lamdha Maks Fraksi EA (19-07-2021).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Fraksi EA

Collection Time 7/19/2021 10:29:50 AM

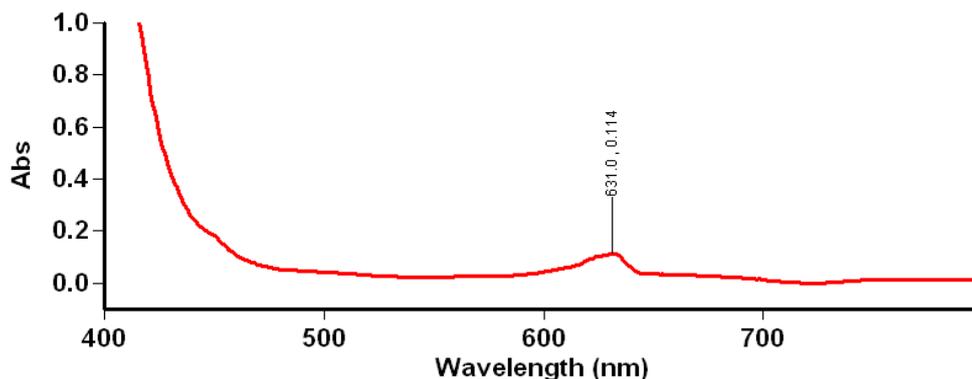
Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 799.9nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
549.9	0.426

L.7.3 Hasil identifikasi isolat 3 KLTP

Lamdha Maks Isolat 3

Tanggal Analisa : 23 Juli 2021



Scan Analysis Report

Report Time : Fri 23 Jul 01:38:31 PM 2021
 Method:
 Batch: D:\Salma\Lamdha Maks Isolat 3 (23-07-2021).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Isolat 3

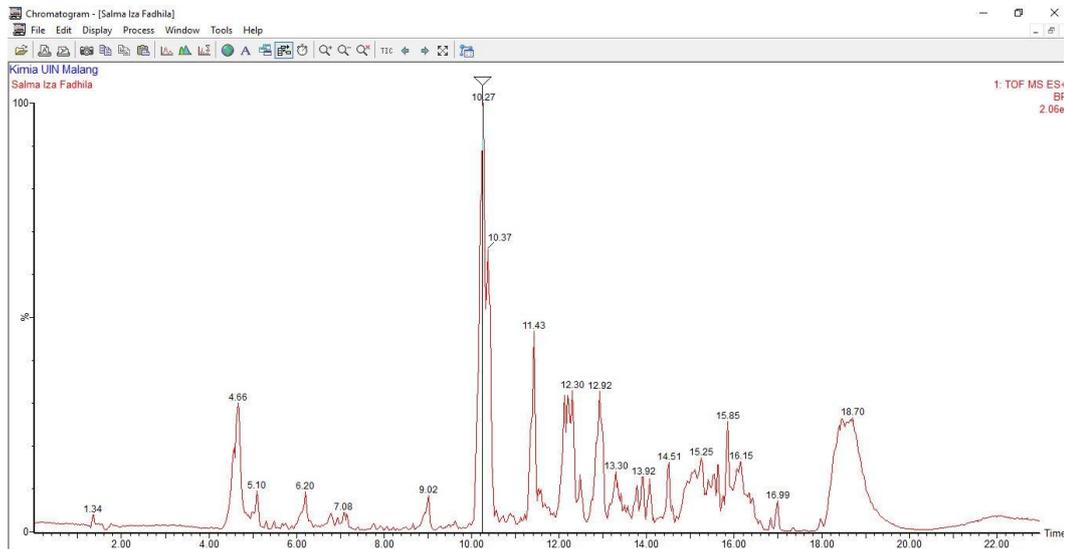
Collection Time 7/23/2021 1:38:48 PM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 799.9nm to 200.0nm

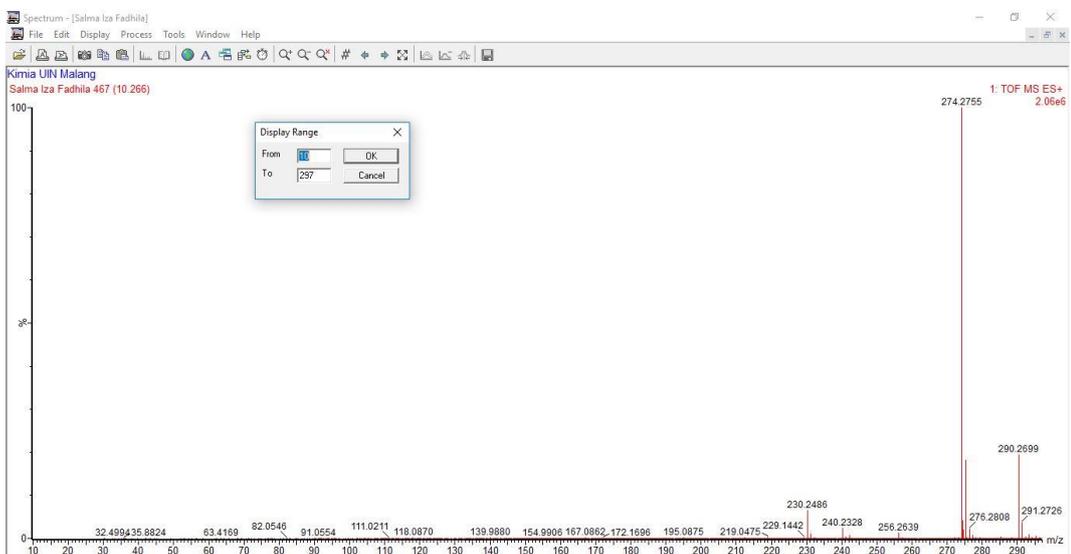
Wavelength (nm)	Abs
631.0	0.114

Lampiran 8. Analisis Spektra Hasil Identifikasi Isolat 3 Menggunakan LC-MS/MS

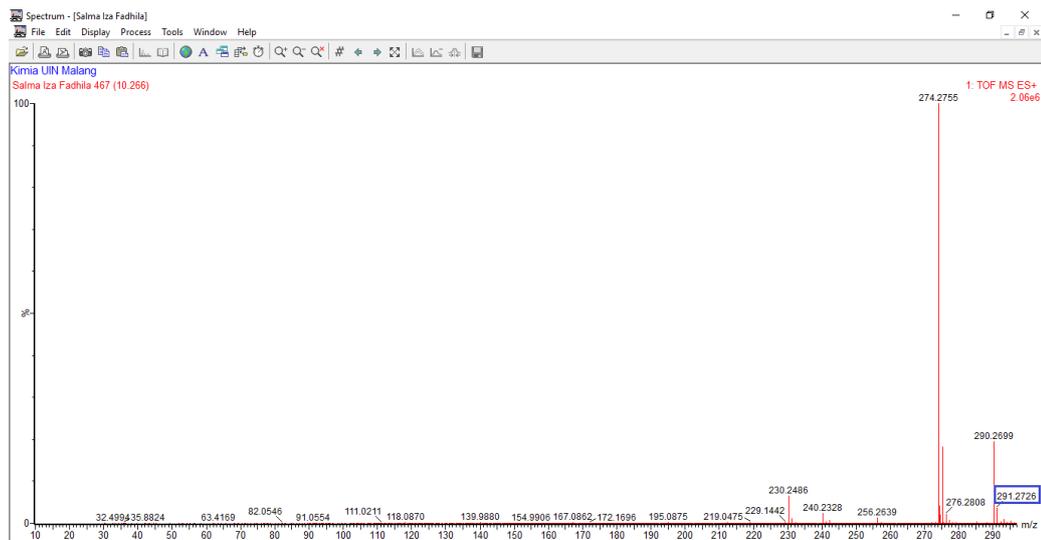
L. 8.1 Analisis waktu retensi dan % area kelimpahan dengan aplikasi Masslynx



L. 8.2 Pengaturan *display range* nilai m/z ion senyawa yang ditargetkan



L.8.3 Nilai m/z ion dan *base peak*



L.8.4 Pencarian nilai m/z ion senyawa target pada *librarywebsite* HMDB sebagai standar acuan

Human Metabolome Database (HMDB) search results for Catechin.

Search term: catechin

Filter by metabolite status (default all):

- Detected and quantified
- Detected but not quantified
- Expected but not quantified
- Predicted

Filter by biospecimen:

- Blood
- Urine
- Saliva
- Cerebrospinal Fluid
- Feces
- Sweat
- Breast Milk
- Bile
- Amniotic Fluid
- Other Biospecimens

Clear Apply Filter

HMDB0002780 **Catechin** (Biospecimen: Blood, Feces, Urine)

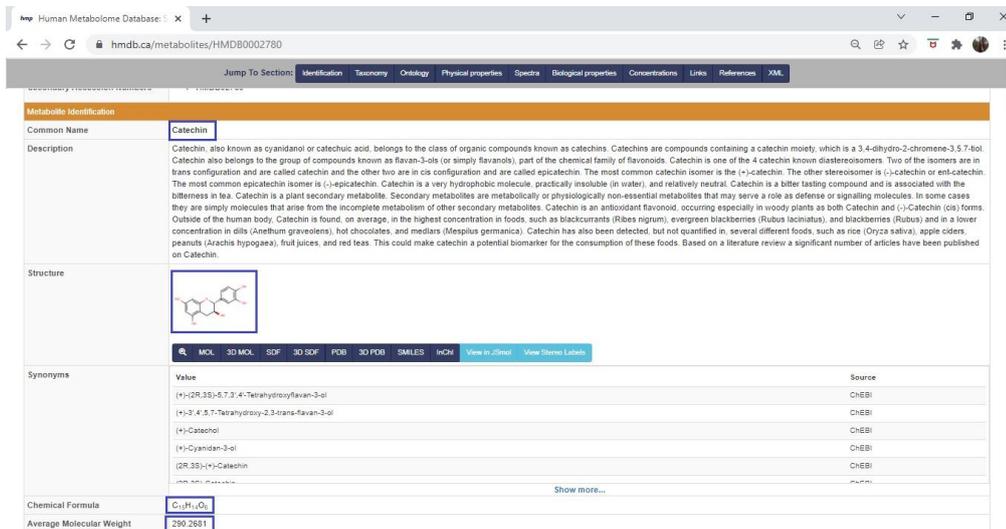
154-23-4

Matched description: ... *Catechin*, also known as cyanidanol or catechuic acid, belongs to the class of organic compounds ... known as catechins. Catechins are compounds containing a *catechin* moiety, which is a 3,4-dihydro-2 ... -chromene-3,5,7-triol. *Catechin* also belongs to the group of compounds known as flavan-3-ols (or simply ...

Matched name: ... *Catechin* ...

Matched synonyms: ... (2R,3S)-(+)-*Catechin* ... (2R,3S)-*Catechin* ... D-*Catechin* ...

L.8.5 Nilai m/z ion senyawa target dari *library website* HMDB dan dicocokkan dengan nilai hasil m/z ion pada sampel



Metabolite Identification

Common Name Catechin

Description Catechin, also known as cyanidinol or catechuic acid, belongs to the class of organic compounds known as catechins. Catechins are compounds containing a catechin moiety, which is a 3,4-dihydro-2-chromene-3,5,7-ol. Catechin also belongs to the group of compounds known as flavan-3-ols (or simply flavanols), part of the chemical family of flavonoids. Catechin is one of the 4 catechin known diastereoisomers. Two of the isomers are in trans configuration and are called catechin and the other two are in cis configuration and are called epicatechin. The most common catechin isomer is the (+)-catechin. The other stereoisomers is (-)-catechin or ent-catechin. The most common epicatechin isomer is (-)-epicatechin. Catechin is a very hydrophobic molecule, practically insoluble (in water), and relatively neutral. Catechin is a bitter tasting compound and is associated with the bitterness in tea. Catechin is a plant secondary metabolite. Secondary metabolites are metabolically or physiologically non-essential metabolites that may serve a role as defense or signalling molecules. In some cases they are simply molecules that arise from the incomplete metabolism of other secondary metabolites. Catechin is an antioxidant flavonoid, occurring especially in woody plants as both Catechin and (-)-Catechin (cis) forms. Outside of the human body, Catechin is found, on average, in the highest concentration in foods, such as blackcurrants (*Ribes nigrum*), evergreen blackberries (*Rubus occidentalis*), and blackberries (*Rubus*) and in a lower concentration in dills (*Anethum graveolens*), hot chocolates and medlars (*Mespilus germanica*). Catechin has also been detected, but not quantified, in several different foods, such as rice (*Oryza sativa*), apple ciders, peanuts (*Arachis hypogaea*), fruit juices, and red teas. This could make catechin a potential biomarker for the consumption of these foods. Based on a literature review a significant number of articles have been published on Catechin.

Structure

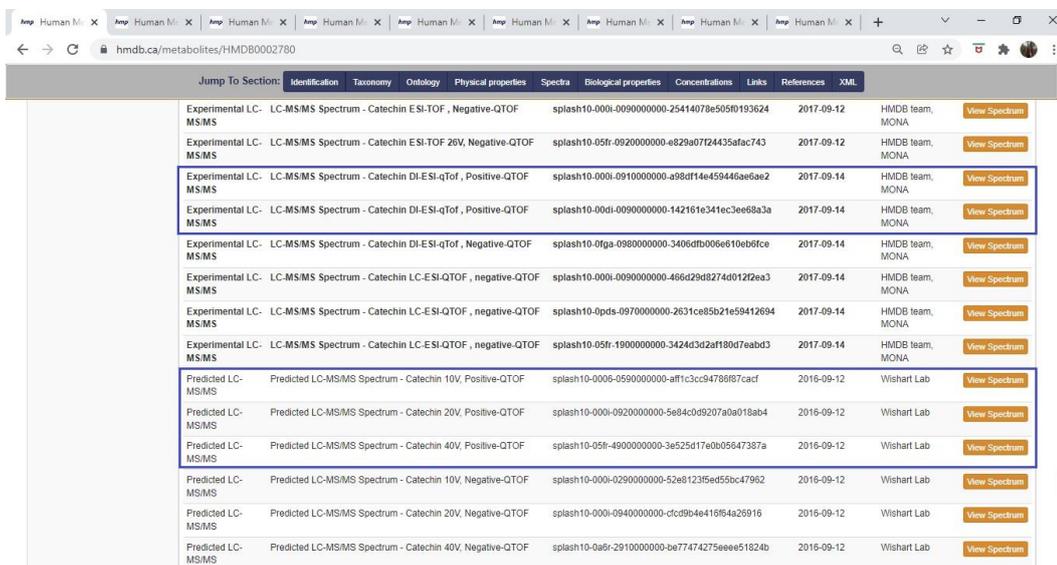
Synonyms

Value	Source
(+)-(2R,3S)-5,7,3',4'-Tetrahydroflavan-3-ol	CHEBI
(+)-5',4',8,7'-Tetrahydroxy-2,3-trans-flavan-3-ol	CHEBI
(+)-Catechol	CHEBI
(+)-Cyanidin-3-ol	CHEBI
(2R,3S)-(+)-Catechin	CHEBI

Chemical Formula C15H12O6

Average Molecular Weight 280.2651

L.8.6 Pemilihan spektra m/z ion dengan spektra *library* pada *website* HMDB dengan *predicted spectra* ion positif sesuai pada sumber ion yang digunakan saat penelitian



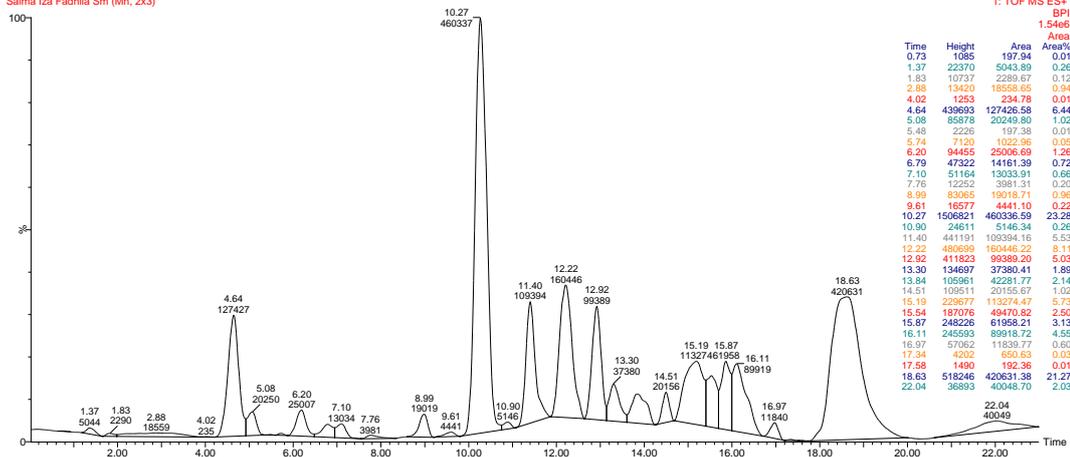
Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin ESI-TOF, Negative-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin ESI-TOF 20V, Negative-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin DI-ESI-QTOF, Positive-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin DI-ESI-QTOF, Positive-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin DI-ESI-QTOF, Negative-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin LC-ESI-QTOF, negative-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin LC-ESI-QTOF, negative-QTOF	MS/MS	Experimental LC-MS/MS Spectrum - Catechin LC-ESI-QTOF, negative-QTOF	MS/MS	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 10V, Positive-QTOF	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 20V, Positive-QTOF	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 40V, Positive-QTOF	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 10V, Negative-QTOF	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 20V, Negative-QTOF	Predicted LC-MS/MS Spectrum - Catechin 40V, Negative-QTOF						
splash10-0000-0090000000-25414078e505f0193624	2017-09-12	splash10-05f1-0920000000-e829a07724435afac743	2017-09-12	splash10-0000-0910000000-a980f14e45944ae6ae2	2017-09-14	splash10-0001-0090000000-142161e341ec3ee68a3a	2017-09-14	splash10-0f6a-0980000000-3406dfb006e610eb6f0e	2017-09-14	splash10-0000-0090000000-466d29d9274d012f2ea3	2017-09-14	splash10-0pds-0970000000-2631ce85b21e59412694	2017-09-14	splash10-05f1-1900000000-3424d3d2af180d7eabd3	2017-09-14	splash10-0000-0590000000-af1c3cc9478687caef	2016-09-12	splash10-0000-0920000000-5e84cd0d207a0a018ab4	2016-09-12	splash10-05f1-4900000000-3e525d17e0b0956473e7a	2016-09-12	splash10-0000-0290000000-52e6f123f5e55bc47962	2016-09-12	splash10-0000-0940000000-ctc09b04e416f84a26916	2016-09-12	splash10-0a6f-2910000000-be7747275eeee51824b	2016-09-12

L.8.7 Pencocokan spektra dan *base peak* pada library website HMDB dengan spektra dan *base peak* hasil penelitian



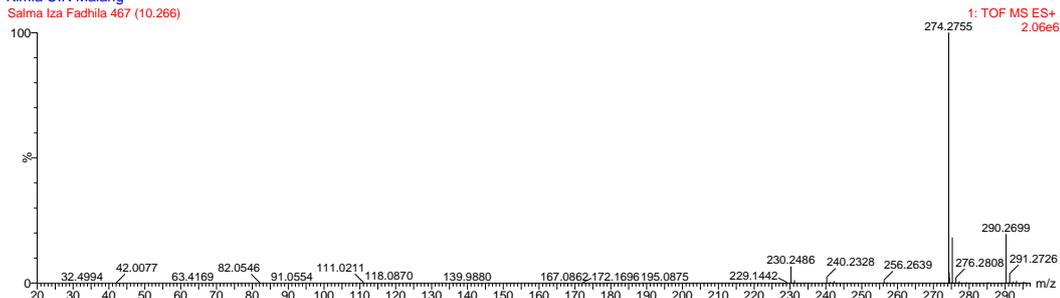
L.8.8 Spektra dan % luas area kelimpahan senyawa pada sampel

Kimia UIN Malang
 Salma Iza Fadhila Sm (Mn, 2x3)



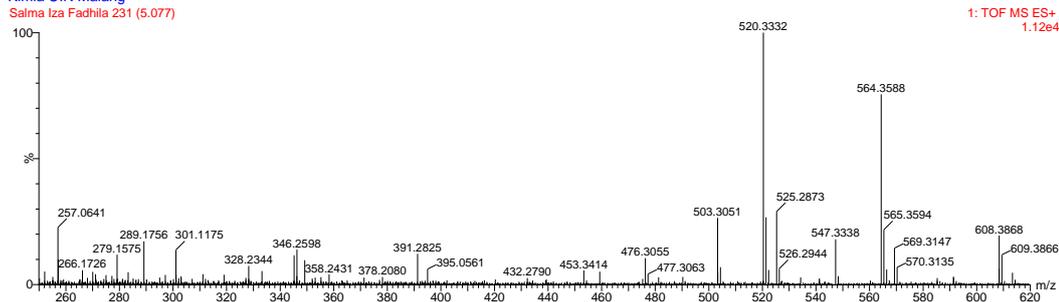
Kimia UIN Malang

Salma Iza Fadhila 467 (10.266)



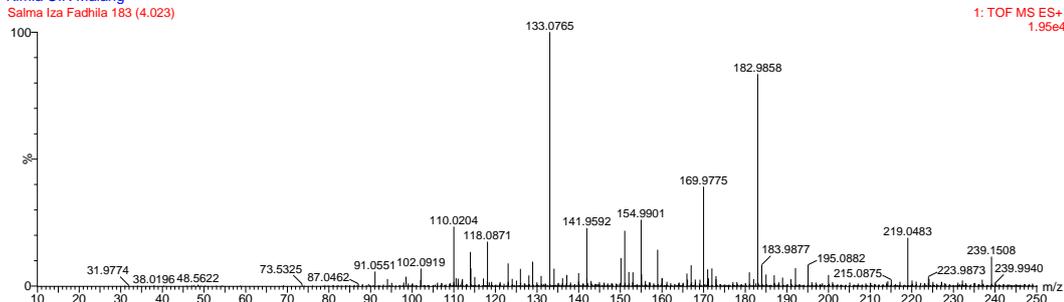
Kimia UIN Malang

Salma Iza Fadhila 231 (5.077)



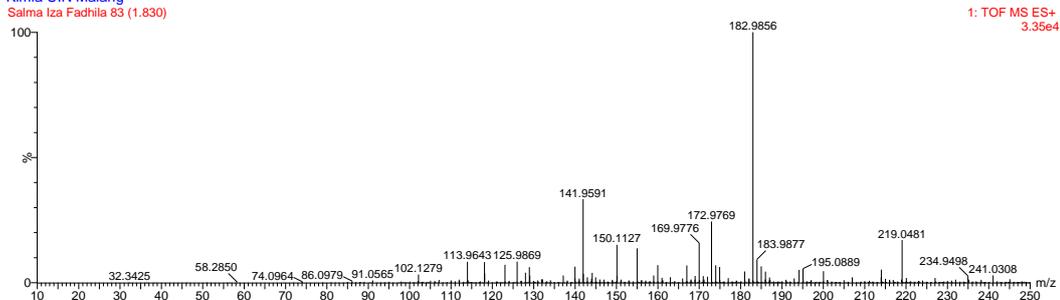
Kimia UIN Malang

Salma Iza Fadhila 183 (4.023)



Kimia UIN Malang

Salma Iza Fadhila 83 (1.830)



Lampiran 9. Dokumentasi

L.9.1 Preparasi Sampel Biji Anggur Bali



Pencucian biji Anggur Bali



Proses pengeringan



Biji Anggur Bali kering



Proses penggilingan sampel



Proses pengayakan sampel



Serbuk sampel

L.9.2 Analisis Kadar Air



Pengovenan cawan kosong



Desikator cawan kosong



Penimbangan cawan kosong



Pengovenan cawan + sampel



Desikator cawan + sampel



Penimbangan cawan + sampel

L.9.3 Ekstraksi Ultrasonik



Penimbangan
serbuk sampel



Proses ekstraksi
ultrasonik



Proses penyaringan



Filtrat hasil penyaringan



Pemisahan pelarut



Ekstrak pekat

L.9.4 Hidrolisis dan Partisi



Penambahan HCl +
pengadukan dengan *stirrer*



Penambahan
NaHCO₃ jenuh



Pengecekan pH



Partisi dengan Etil Asetat



Hasil fraksi etil asetat

L.9.5 Uji Fitokimia dan Uji Tanin Terkondensasi



Hasil uji flavonoid



Uji tanin terkondensasi dengan pemanasan



Hasil uji tanin terkondensasi

L.9.6 Kromatografi Lapis Tipis Prepratif



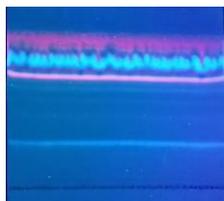
Penjuanan eluen



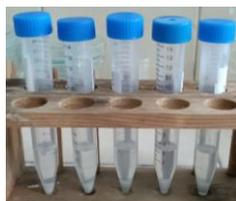
Aktivasi plat silica



Proses elusi



Pengamatan spot noda Pada lampu UV 366 nm



Spot noda setelah dikerok dimasukkan dalam tabung sentrifugasi



Proses Sentrifugasi



Isolat yang akan diuapkan



Penimbangan hasil isolat

L.9.7 Uji UV-Vis Metode *Bate-Smith*



Larutan sebelum
Dipanaskan



Proses pemanasan



Ekstrak dan fraksi
sesudah dipanaskan



Larutan isolat
setelah dipanaskan

L.9.8 Uji Toksisitas



Proses aerasi



Preparasi sampel uji



Proses uji toksisitas