

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea. L*) TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA

SKRIPSI

Oleh:
MASLUHATIN NADZIROH
NIM. 10630024



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea. L*)
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA**

SKRIPSI

Oleh:
MASLUHATIN NADZIROH
NIM. 10630024



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2014**

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea. L*)
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA**

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam

Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)

Oleh :

MASLUHATIN NADZIROH

NIM. 10630024

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)

MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

2014

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*. L)
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA

SKRIPSI

Oleh :
MASLUHATIN NADZIROH
NIM. 10630024

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji,
Tanggal 8 September 2014

Pembimbing I

Pembimbing II


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


Tri Kustono Adi, M. Sc
NIP. 19710311 200312 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang




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

UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK DAUN WIDURI (*Calotropis gigantea*. L)
TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina* Leach DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIFNYA

SKRIPSI

Oleh:
MASLUHATIN NADZIROH
NIM. 10630024

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal, 8 September 2014

- | | | |
|--------------------|---|---------|
| 1. Penguji Utama | : Akyunul Jannah, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009 | (.....) |
| 2. Ketua Penguji | : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIPT. 20140201 1 422 | (.....) |
| 3. Sekr. Penguji | : Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002 | (.....) |
| 4. Anggota Penguji | : Tri Kustono Adi, M.Sc
NIP. 197103112003121002 | (.....) |

Mengesahkan
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang



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

Motto

وَلَا تَقُولَنَّ لِشَيْءٍ إِنِّي فَاعِلٌ ذَٰلِكَ غَدًا

Dan janganlah sekali-kali engkau mengatakan terhadap sesuatu “aku pasti akan melakukannya itu besok”

*Niat,,,,, Usaha,,,,, Do'a,,,,
Keyakinan,,,,, kesabaran dan Barakah
merupakan bekal dan hikmah yang dapat ku-
ambil saat penulisan skripsi ini*





PERSEMBAHAN

Tak Mampu Membalas Dengan Sempurna, Hanya Dengan Hati Yang Tulus Aku Persembahkan Skripsi Ini Untuk:

Allah SWT, Puji syukur kehadiran Allah sang Maha Pengasih tak pandang kasih, Maha Penyayang tak pandang Sayang, yang telah memberikan hamba kemampuan, kesempatan, kekuatan dan Ridlo-Nya,,,,,,,,,,,,,

Rosulullah SAW, sang pembawa Risalah,,,,,,,,,,,,,

Kedua oang tuaku, Abahku M. Khusnan dan Ibuku Nasihah, yang senantiasa menjadi sumber perhatian, cinta, kasing sayang, kekuatan serta pemberi semangat bagi nadziroh. Karena do'a dan keikhlasan Abah dan Ibu nadziroh mampu mendapatkan banyak ilmu yang sangat bermanfaat untuk menjalani kehidupan ini. semoga Abah dan Ibu selalu diberikan kesehatan, umur yang barakah dan selalu dalam Ridlo Allah SWT di dunia dan akhirat, Amin ya Allah,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,

Kedua KakakQ Mufidah inayati M. Pd dan Makhsusil lutfiyati S. Pd, adikku Muhibbatin Nafisah dan M. Thoriq Al-Busyro yang telah banyak memberi motivasi dan harapan serta mengisi hidup dengan penuh kasih sayang dan canda 😊😊😊



Abah yai Chusaini, umi Wardah beserta keluarga ndalem pengasuh PPTQ Nurul Furqon yang telah memberikan dukungan spiritual, sehingga nadziroh bisa lebih menyadari dan merasakan adanya barakah,,,,,,,,,,,,,

Para Pembimbing dan Penguji, Bu Elok, Bu Iha, Pak Tri, Bu Akyun dan Pak Hanapi, atas bimbingan, kritik, saran, nasihat dan motivasinya selama ini,,,,,,,,,,,,,

Keluarga besarku, Keponakanku (Inin-Nahda), mas Abdi, mas Kholis, saudara-saudaraku, Mbah yai, Mbah Nyai, pak de, bu de, pak lek, bu lek terima kasih atas dukungan dan hiburan yang tak mampu nadziroh membalasnya,,,,,

Seluruh temen-temenku jurusan kimia 2010 terima kasih atas semangat dan kebersamaannya selama berjuang bersama2,,,,,,,,
Temen-temenku di PPTQ Nurul Furqon "kamar juwairiyah" yang selalu memberikan keuangan waktunya untuk mendengarkan keluh kesahku selama ini, selalu menemani nadziroh sehingga diberikan kekutan untuk menjalani tugas2 pondok dan kampus,,,,,pokoknya,,,,EmmMuuAaccHhhh
😊semoga persaudaraan kita tetap terjalin hingga kapanpun.

Para guru2, dari TK, MI, MTS, MA hingga Perguruan Tinggi, Ustadz/ustadzah, para Inspirator Intelek terima kasih atas transfer ilmu dan resolusinya

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Masluhatin Nadziroh

NIM : 10630024

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis Gigantea*.
L) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach dan
Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 05 September 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Masluhatin Nadziroh
NIM. 10630024

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **Uji Sitotoksisitas Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis Gigantea. L.*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya**” ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tucurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Seiring terselesaikannya penyusunan skripsi ini, dengan penuh kesungguhan dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis demi terselesainya skripsi ini.
2. Ibu Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt selaku konsultan
3. Bapak Tri Kustono Adi, M. Sc selaku Pembimbing Agama
4. Ibu Akyunul Jannah, S. Si, M. P selaku Penguji Utama.
5. Bapak A. Hanapi, M. Sc selaku Ketua Penguji

Yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat serta bantuan materiil maupun moril kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis menghaturkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Abahku, M. Husnan dan Ibuku Nasihah yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan dalam segala bentuk yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M. Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang yang telah memberikan arahan dan nasehat kepada penulis.
5. Para Dosen Pengajar di Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama berada di jurusan Kimia UIN Maliki Malang.
6. Seluruh staf laboratorium (mas Abi, mas Taufik, mbak Rika, mbak Mei, mbak Susi) dan staf administrasi (mbak Ana dan mbak Is) Jurusan Kimia atas seluruh bantuan dan sumbangan pemikiran selama penyelesaian skripsi.
7. Abah Yai M. Chusaini Al-hafizh dan Umi Dewi wardah beserta keluarga ndalem pengasuh PPTQ Nurul Furqon atas do'a dan dukungannya yang telah diberikan.
8. Seluruh keluarga besarku atas dukungan moril maupun materil yang telah diberikan hingga terselesaikannya skripsi ini.
9. Teman-teman kimia angkatan 2010 (khususnya Kimia A), dan teman-temanku di PPTQ Nurul Furqon (khususnya kamar Juwairiyah) yang telah berbagi kebersamaan dalam senang maupun susah dan memberiku motivasi, sehingga tetap terjaga persaudaran kita.
10. Semua rekan dan semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Malang, 05 September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
SURAT PERNYATAAN ORISINILITAS PENELITIAN.....	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR PERSAMAAN.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
ABSTRAK	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
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 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Perspektif Islam	9
2.2 Tanaman Widuri (<i>Calotropis gigantean</i> L).....	11
2.2.1 Kandungan Senyawa Kimia	13
2.2.3 Manfaat dan Kegunaan	13
2.3 Pemisahan Senyawa Aktif	14
2.3.1 Ekstraksi Maserasi	14
2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis	15
2.4 Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	19
2.5 Uji Sitotoksitas dengan Metode BSLT	21
2.6 Senyawa Kimia Metabolit Sekunder pada Tanaman	24
2.6.1 Alkaloid	25
2.6.2 Flavonoid	28
2.6.3 Tanin.....	31
2.6.4 Saponin	33
2.6.5 Steroid.....	35
2.6.6 Triperpenoid.....	38
2.7 Analisis Probit	41
BAB III METODE PENELITIAN	43
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	43
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	43
3.2.1 Alat	43
3.2.1.1 Analisis Kadar Air	43

3.2.1.2 Preparasi Sampel	43
3.2.1.3 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Maserasi	43
3.2.1.4 Uji Sitotoksik dengan BSLT	44
3.2.1.5 Uji Senyawa Aktif	44
3.2.1.6 Pemisahan Ekstrak Aktif dengan KLT	44
3.2.2 Bahan	44
3.2.2.1 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Maserasi	44
3.2.2.2 Uji Toksisitas dengan BSLT	44
3.2.2.3 Uji Senyawa Aktif	45
3.3 Rancangan Penelitian	45
3.4 Tahapan Penelitian	47
3.5 Pelaksanaan Penelitian	47
3.5.1 Preparasi Sampel	47
3.5.2 Analisa Kadar Air	47
3.5.3 Ekstraksi Senyawa aktif dengan Maserasi	49
3.5.4 Uji Sitotoksik dengan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	50
3.5.4.1 Penetasan Telur	50
3.5.4.2 Uji Sitotoksik	50
3.5.5 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen	52
3.5.5.1 Uji Alkaloid	52
3.5.5.2 Uji Flavonoid	52
3.5.5.3 Uji Saponin	52
3.5.5.4 Triterpenoid dan Steroid	53
3.5.5.4 Uji Tanin	53
3.5.5.4.1 Uji dengan $FeCl_3$	53
3.5.5.4.2 Uji dengan Larutan Gelatin	53
3.5.5.4.3 Uji Tanin Katekol dan Uji Tanin Galat	53
3.5.6 Uji Senyawa Aktif dengan KLT	54
3.6 Analisis Data	57
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Analisis Kadar Air	59
4.2. Preparasi Sampel	60
4.3. Ekstraksi Komponen Aktif Daun Widuri (<i>Calotropis gigantea</i> L.)	60
4.4. Uji Toksisitas terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	63
4.5. Uji Kandungan Senyawa Aktif Daun Widuri	69
4.6.1. Triterpenoid	69
4.6.2. Steroid	72
4.6.3. Tannin	74
4.6. Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	75
4.7 Dugaan Mekanisme Senyawa Pada Ekstrak Kloroform Daun Widuri Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	79
4.8 Kekuasaan Allah dalam Daun Widuri (<i>Calotropis gigantea</i> L.)	80
 BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	84

5.2 Saran	84
DAFTAR PUSTAKA.....	86
LAMPIRAN	94



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Daun Tanaman Widuri (<i>Calotropis gigantea</i> L.).....	11
Gambar 2.2	Sikulus Fotosintesis	12
Gambar 2.3	Larva udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	19
Gambar 2.4	Struktur senyawa Alkaloid	25
Gambar 2.5	Struktur inti senyawa Flavonoid	28
Gambar 2.6	Struktur senyawa Tanin	31
Gambar 2.7	Struktur inti senyawa Saponin.....	34
Gambar 2.8	Struktur inti senyawa Steroid	36
Gambar 2.9	Struktur senyawa Triterpenoid	39
Gambar 4.1	Kurva Mortalitas Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach ekstrak n-heksana	65
Gambar 4.2	Kurva Mortalitas Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach ekstrak Kloroform	66
Gambar 4.3	Kurva Mortalitas Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach ekstrak Etanol.....	66
Gambar 4.4	Dugaan Mekanisme Pembentukan warna pada Triterpenoid	71
Gambar 4.5	Contoh Reaksi Suatu Steroid.....	73
Gambar 4.6	Dugaan Reaksi Tannin dengan FeCl ₃	74
Gambar 4.7	Hasil KLT Senyawa Aktif Steroid Ekstrak Kloroform Daun Widuri dengan Eluen n-heksana : etil asetat (6:4)	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian	93
Lampiran 2 Skema Kerja	94
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan	100
Lampiran 4 Perhitungan Kadar Air	106
Lampiran 5 Perhitungan Rendemen Ekstrak Hasil Maserasi.....	108
Lampiran 6 Data Keamtian Larva Udang dan Perhitungan LC ₅₀ menggunakan program MINITAB	110
Lampiran 7 Hasil Pengujian Fitokimia dengan Reagen.....	119
Lampiran 8 Perhitngan Rf Hasil KLT Masing-Masing Ekstrak	119
Lampiran 9 Dokumentasi	121
Lampiran 10Tabel Rencana Penelitian	124



DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1 Harga Rf	18
Persamaan 3.1 Kadar Air	48
Persamaan 3.2 Faktor Koreksi.....	48
Persamaan 3.3 Rendemen Ekstrak.....	50



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rendemen Hasil Maserasi Masing-Masing Pelarut	62
Tabel 4.2 Nilai LC ₅₀ Masing-Masing Ekstrak Daun Widuri	67
Tabel 4.3 Hasil Uji Fitokimia Maing-Masing Ekstrak Daun Widuri	69
Tabel 4.4 Data Penampakan Noda Senyawa Steroid Dari Hasil KLT Ekstrak Kloroform Daum Widuri	76
Tabel 4.5 Hasil KLT Senyawa Aktif Steroid Ekstrak Kloroform Daun Widuri Dengan Eluen N-Heksana : Etil Asetat (6:4).....	78



ABSTRAK

Nadziroh, M. 2014. Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis gigantea* L.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. Pembimbing 1: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Tri Kustono Adi, M.Sc; Konsultan: Roihatul Muti'ah, M. Kes., Apt

Kata kunci : Daun Widuri (*Calotropis gigantea* L.), *Artemia salina* Leach, uji sitotoksitas, uji fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis.

Tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.) merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di Indonesia dan dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal. Al Qur'an surat Ali Imron ayat 190-191 menjelaskan tentang perintah Allah kepada makhluknya untuk memikirkan dan mencari manfaat dari berbagai macam tumbuhan yang telah diciptakan di bumi ini, salah satunya sebagai obat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat sitotoksitas ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach serta untuk mengetahui golongan senyawa aktif dari ekstrak daun widuri yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi.

Penelitian dilakukan dengan ekstraksi sampel menggunakan variasi pelarut, yaitu n-heksana, kloroform dan etanol. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya digunakan dalam uji sitotoksitas dengan metode BSLT. Selanjutnya dianalisis probit menggunakan MINITAB untuk mengetahui nilai LC_{50} nya, uji fitokimia dengan reagen dan diperkuat dengan Kromatografi Lapis Tipis.

Hasil dari penelitian ini, menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak daun widuri mempunyai kemampuan toksik terhadap larva udang karena mempunyai nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Potensi bioaktivitas tertinggi diperoleh dalam ekstrak kloroform yaitu dengan nilai LC_{50} terkecil 3,9579 ppm, sementara n-heksana 19,6679 ppm dan etanol 22, 8585 ppm. Hasil uji fitokimia pada ekstrak kloroform menunjukkan adanya kandungan golongan senyawa aktif steroid. Sedangkan hasil KLT dengan eluen terbaik n-heksana : etil asetat (6:4) diperoleh 9 spot dengan nilai R_f antara 0,19-0,94. Sedangkan yang diasumsikan sebagai senyawa steroid terdapat pada spot yang berwarna hijau pada R_f 0,19; 0,38; 0,46 dan pada R_f 0,38 berwarna ungu.

ABSTRACT

Nadziroh, M. 2014. **Cytotoxicities Study of Widuri Leaf Extract (*Calotropis gigantea* L.) to Brine Shrimp *Artemia salina* Leach and Class Identification of Its Active Compound.** Supervisor: Elok Kamilah Hayati, M. Si; Supervisor: Tri Kustono Adi, M. Sc; Consultant: Roihatul Muti'ah, M. Kes Apt.

Key Word: Widuri Leaf (*Calotropis gigantea* L.), *Artemia salina* Leach, Cytotoxicities Study, Phytochemical Study, Thin Layer Chromatography.

Widuri plant (*Calotropis gigantea* L.) is wild plant that excessively grow in Indonesia. It can be used as herbal medicine. Al Qur'an surah Ali imran 190-191 explain about Allah's command to His creature to think about and to search for the benefits of various kinds of plant created on earth, in which one of them is as medicine. The purpose of the study is to know the cytotoxicities level of widuri leaf extract to brine shrimp *Artemia salina* Leach and to know the active compound class widuri leaf astract that have highest bioactivity potency.

The study is done by extracting the sample using three kinds of solvent, namely n-hexane, chloroform dan ethanol. The dark extract obtained from the extraction then used to know the level of the LC₅₀. Phytochemical study than conducted with reagen and reinforced with thin layer chromatography.

The result of the study showed that each widuri leaf extract has toxic ability to brine shrimp, because it has level of LC₅₀<1000 ppm. The highest bioactivity potency is obtained from chloroform extract with the smallest level of LC₅₀, that is 3,9579 ppm, while n-hexane is 19,6679 ppm and ethanol is 22,8585. The result of phytochemical study of chloroform extract showed the existance of active compound class content, steroid. While the result of KLT using the best eluent of n-hexane : ethyl acetat (6:4) is 9 spots with the level of Rf between 0,19-0,94. Steroid compound is assumed to be on the green spot at Rf 0,19; 0,38; 0,46 and on the purple spot at Rf 0,38.

ملخص البحث

ناظرة، م. تجربة السمية خلاصة ورقة الويدوري (*Calotropis Gigantea L*) المؤثرة في يرقات الريبان الأرتيميا سالينا ليتش (*Artemia Salina Leach*) وزمرة اتحاد كلي فعّالتها. المشرفة الأولى: ثيلوك كاملة حياتي الماجستير، المشرف الثاني: تري كوستونو أدي الماجستير، المستشار: رئية المطيعة الماجستير.

كليمة الرئيسية : تجربة السمية، ورقة الويدوري (*Calotropis Gigantea L*) ، الأرتيميا سالينا ليتش (*Artemia Salina Leach*)، تجربة الفيتوكيميا، كروموتوجراي بطبقة رقيقة.

نبته الويدوري هي نبته يَنْتَشِرُ مُؤْهَا فِي أندونيسيا، وهي تُسْتَخْدَمُ لدواء عُشْبِيّ. أَوْضَحَ الْقُرْآنُ فِي سُورَةِ آلِ عِمْرَانَ 190-191 أَنَّ النَّاسَ مَأْمُورُونَ بِأَنْ يَتَفَكَّرُوا وَيَطْلُبُوا النِّفْعَ عَنِ النَّبَاتِ لِمَا خَلَقَ فِي هَذَا الْأَرْضِ، وَاحِدٌ مِنْهُمْ لِلدَّوَاءِ. فَأَمَّا الْعَرَضُ مِنْ هَذَا الْبَحْثِ فَهُوَ لِمَعْرِفَةِ دَرَجَةِ السَّمِيَّةِ مِنْ خُلَاصَةِ نَبْتَةِ الْوَيْدُورِيِّ الْمُوَثَّرَةِ فِي يَرْقَاتِ الرِّيبَانِ الْأَرْتِيْمِيَا سَالِينَا لَيْتَشَ وَلِمَعْرِفَةِ زَمْرَةِ اتِّحَادِ كَلْبِيِّ فَعَّالَةِ الَّتِي تَحْتَوِي عَلَى أَعْلَى قُوَّةٍ سَيْطَرَةٍ حَيَوِيَّةٍ فَعَّالَةٍ مِنْ خُلَاصَةِ هَذِهِ النَّبْتَةِ.

وَلَقَدْ أُجْرِيَ هَذَا الْبَحْثُ بِتَجْرِبَةٍ خُلَاصِيَّةٍ بِاسْتِخْدَامِ ثَلَاثَةِ أَشْكَالٍ مُخْتَلِفَةٍ مِنَ الْمَذِيَّاتِ، وَهِيَ الِ ن-الهكسان، الكلوروفورم والإيثانول. فَالْخُلَاصَةُ الْحَيَّرَةُ مِنْ هَذِهِ التَّجْرِبَةِ أَسْتُخْدِمَتْ فِي التَّجْرِبَةِ السَّمِيَّةِ بِالطَّرِيقَةِ ب س ل ت ثُمَّ حُلِّلَتْ تَحْلِيلَ فَرْوَيْتِ عَبْرَ الْكَاشِفِ لِمَعْرِفَةِ دَرَجَةِ ل ج 50 مِنْ هَذِهِ الْخُلَاصَةِ. أَمَّا التَّجْرِبَةُ فَيْتُوكِيمِيَا فَهِيَ بِمُعَدَّلٍ وَهَذِهِ التَّجْرِبَةُ لِأَبْدٍ مِنْ تَقْوِيَّتِهَا كُروموتوجراي بطبقة رقيقة.

فَنَتِيجَةُ مِنْ هَذَا الْبَحْثِ تَدُلُّ عَلَى أَنَّ لِكُلِّ مِنْ خُلَاصَاتِ أَوْرَاقِ الْوَيْدُورِيِّ طَاقَةً سَامَةً تُؤَثِّرُ فِي صِعْرَ رُيبَانَ لِأَنَّ لَهَا دَرَجَةَ ل ج 50 أَقَلَّ مِنْ أَلْفٍ. أَمَّا أَعْلَى قُوَّةٍ سَيْطَرَةٍ حَيَوِيَّةٍ فَعَّالَةٍ فِي خُلَاصَةِ كَلُورُوفُورْمٍ فَإِنَّ دَرَجَةَ ل ج 50 عَلَى الْأَقَلِّ تَصِلُ إِلَى 3,9579 جُزءٍ فِي الْمِلْيُونِ. فَأَمَّا الِ ن-الهكسان فدرجته 19,6679 جُزءٍ فِي الْمِلْيُونِ، وَأَمَّا الْإِيثَانُولُ فدرجته 22,8585 جُزءٍ فِي الْمِلْيُونِ. فَنَتِيجَةُ التَّجْرِبَةِ فَيْتُوكِيمِيَا فِي خُلَاصَةِ كَلُورُوفُورْمٍ تَدُلُّ عَلَى أَنَّ هَذِهِ الْخُلَاصَةُ تَحْتَوِي عَلَى زَمْرَةِ اتِّحَادِ كَلْبِيِّ فَعَّالَةٍ سْتِيروئِيْتِ. أَمَّا نَتِيجَةُ ك ل ت بِأَجُودِ الشَّاطِفِ مِنْ الِ ن-هكسان: إِيثِيلِ أَسِيْتَاتِ (6:4) حَصَلَ 9 أَوْسَاخٍ بِدَرَجَةِ رَفٍ بَيْنَ 0,19 إِلَى 0,94 . وَالْقَدْرُ الْمَفْتَرَضُ نَحْوُ زَرَةِ اتِّحَادِ كَلْبِيِّ فَعَّالَةٍ سْتِيروئِيْتِ يَكُونُ فِي الْوَسْخِ الْأَخْضَرِ يَعْنِي فِي دَرَجَةِ 0,19 ; 0,38 ; 0,46 وَ فِي رَفٍ 0.38 بِاللُّونِ الْبَنْفَسَجِيِّ.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam surat Thaha ayat 53 yang berbunyi:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً
فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

Yang Telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang Telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam (Thaha: 53).

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah bahwa aneka tumbuhan dengan berbagai jenis bentuk dan rasanya merupakan sesuatu yang menakjubkan yang menjadi bukti akan kebenaran Allah. Berbagai macam tumbuhan diciptakan oleh Allah untuk kemaslahatan manusia, diantaranya sebagai sumber pemenuhan kebutuhan sehari-hari.

Allah menciptakan bumi dengan segala isinya sebagai sumber kehidupan untuk makhluknya, khususnya manusia sebagai makhluk paling sempurna diantara semua makhluk ciptaan Allah SWT. Manusia diberikan kelebihan berupa akal, sehingga akan mampu mengeksplorasi dan mencari segala manfaat dalam setiap ciptaan Allah SWT. Allah SWT memerintahkan kepada manusia yang telah diberikan akan fikiran untuk mengamati dan meneliti apa yang telah diciptakan

oleh Allah SWT di alam ini. Sebagaimana telah dijelaskan dalam Al Quran surat An Nahl ayat 11 sebagai berikut:

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ﴿١١﴾

Artinya: Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan (Q.S an Nahl: 11)

Kalimat terakhir dalam surat An Nahl ayat 11 di atas secara tidak langsung merupakan sebuah seruan bagi manusia yang telah diberi akal dan fikiran untuk memikirkan ciptaan Allah (tumbuh-tumbuhan) serta menemukan bukti-bukti kebesaran-Nya. Selain itu, ayat tersebut juga menjelaskan bahwa berbagai jenis tumbuhan yang ada di bumi ini menyimpan banyak manfaat bagi manusia. Salah satu potensi yang dapat dimanfaatkan dari tumbuhan adalah kegunaannya sebagai obat.

Indonesia sebagai negara tropis memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi dengan berbagai macam tumbuhan yang dapat dibudidayakan. Keanekaragaman hayati merupakan keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia, baik untuk kebutuhan manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetik dan sebagai bahan dasar sintesis senyawa organik yang lebih bermanfaat. Indonesia memiliki ± 30.000 spesies tanaman dan ± 7.000 spesies yang diantaranya dikenal sebagai tanaman obat (Achmad, 2009). Keragaman jenis tumbuhan yang dimiliki oleh Indonesia telah banyak dimanfaatkan sebagai obat oleh masyarakat yang

terbentuk melalui proses sosialisasi secara turun temurun serta adanya penemuan-penemuan baru yang telah dipercaya kebenarannya.

Penggunaan obat tradisional atau obat herbal di Indonesia saat ini mengalami peningkatan, baik untuk pemeliharaan kesehatan tubuh maupun untuk pengobatan penyakit-penyakit tertentu. Tumbuhan yang dipakai sebagai obat tradisional pada umumnya mempunyai aktivitas biologis yang tinggi dan mengandung berbagai senyawa kimia yang dapat mempengaruhi sel-sel hidup suatu organisme. Tanaman yang dapat digunakan untuk penyembuhan penyakit sangat banyak, salah satu contoh tanaman yang penggunaannya saat ini banyak digunakan dikalangan masyarakat yaitu tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.).

Tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.) merupakan tanaman liar yang dapat berkembangbiak cepat. Menurut Kumar, *et al.*, (2013) *Calotropis gigantea* L. dapat digunakan untuk penyembuhan beberapa penyakit. Pada umumnya tanaman ini banyak dimanfaatkan, baik bagian daun, batang, ataupun akarnya.

Beberapa hasil penelitian menyatakan adanya manfaat dari tanaman widuri antara lain sebagai obat batuk, gatal-gatal, obat sakit gigi, obat sakit telinga, epilepsi, luka, keseleo dan juga diare. Selain itu, beberapa penelitian juga menyatakan adanya kandungan senyawa aktif pada tanaman widuri. Kandungan kimia pada daun widuri diantaranya flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat serta saponin (Kongkow, 2007). Pada bagian bunga mengandung jenis senyawa fenol, flavonoid, gula, steroid, saponin, dan quinon (Jayakumar, *et al.*, 2010). Elakkiya dan Prasanna (2012) telah meneliti bagian akar tanaman widuri dan menyatakan adanya kandungan senyawa alkaloid, fenol, saponin dan steroid.

Penelitian lain telah dilakukan oleh Budiman (1999) menunjukkan adanya kandungan terpenoid dan flavonoid akar widuri.

Urmi, *et al.*, (2012) melakukan penelitian bagian daun widuri menggunakan pelarut metanol yang selanjutnya difraksinasi menggunakan etil asetat dan n-heksana. Nilai LC_{50} terbaik didapat dari ekstrak n-heksana yaitu 2,42 ppm. Selain itu, dilakukan penelitian terhadap ekstrak akar widuri dengan menggunakan pelarut yang sama dan didapat nilai LC_{50} terbaik pada ekstrak metanol yaitu 0,56 ppm. Dari hasil tersebut dapat diketahui adanya aktivitas sitotoksik dari daun widuri.

Ravi, *et al.*, (2011) melakukan penelitian aktivitas sitotoksik ekstrak etanol akar widuri dengan metode BSLT diperoleh nilai LC_{50} 60,12 ppm. Penelitian Habib, *et al.*, (2009) menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik ekstrak metanol, petroleum eter, kloroform dan etil asetat kulit akar widuri dan diperoleh nilai LC_{50} berturut-turut 66,8 ppm, 39,34 ppm, 14,72 ppm dan 18,57 ppm.

Ekstrak daun *Calotropis procera* (Fam: Asclepiadaceae) menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, metanol, aseton dan etanol, menghasilkan nilai LC_{50} secara berturut-turut 18,04 ppm, 2,845 ppm, 8,748 ppm, 28,45 ppm, 6,65 ppm dan 10,76 ppm. Dari hasil penelitian tersebut didapat ekstrak kloroform mempunyai aktivitas toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} 2,845 ppm (Bakavathiappan, *et al.*, 2012). Penelitian Faruki, *et al.*, (2011) menunjukkan adanya aktivitas sitotoksik ekstrak akar *Calotropis procera* dengan pelarut metanol memiliki nilai LC_{50} sebesar 2,931 ppm.

Penelitian untuk tanaman ini belum dilaksanakan secara meluas, khususnya pada bagian daun. Sehingga dalam penelitian ini akan dilakukan uji sitotoksitas pada bagian daun tanaman widuri. Selain mudah didapatkan, dalam tanaman widuri, daun terdapat dalam jumlah yang lebih besar. Daun juga merupakan tempat terjadinya proses fotosintesis dalam tanaman. Fotosintesis merupakan salah satu cara asimilasi karbon, karena dalam fotosintesis karbon bebas dari CO₂ diikat menjadi glukosa sebagai penyimpan energi (Pertamawati, 2010). Glukosa yang merupakan hasil akhir dari fotosintesis selanjutnya akan mengalami proses metabolisme menghasilkan berbagai macam senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder (Najib, 2006).

Pemisahan senyawa aktif dalam daun widuri dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi, dimana keuntungan metode maserasi biasanya digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari (Harbone, 1996). Ekstraksi menggunakan variasi pelarut n-heksana (non polar), kloroform (semi polar) dan etanol 80 % (polar), dengan pelarut yang berbeda umumnya dapat mengekstrak jenis golongan senyawa yang berbeda pula. Pelarut dipilih berdasarkan tingkat kepolaran dengan tujuan diperoleh pelarut terbaik untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktifitas tertinggi.

Untuk mengetahui potensi senyawa aktif tertinggi dilakukan dengan uji sitotoksitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. Menurut Soemirat (2005) toksisitas adalah kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan

apabila masuk kedalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya. Uji sitotoksisitas biasa dilakukan dengan metode BSLT (*Brine-Shrimp Lethality Test*) karena senyawa-senyawa yang mempunyai bioaktivitas tertentu sering kali bersifat toksik terhadap larva udang. Meyer dan Ferigini (1982) memanfaatkan *Artemia salina* Leach untuk menguji aktivitas biologis secara umum dan digunakan pertama kali oleh Institut Kanker di Amerika Serikat. Disamping mudah diperoleh, larva udang memiliki beberapa keunggulan seperti perkembangbiakannya cepat, harganya murah, metode percobaannya mudah, untuk uji ini hanya diperlukan sampel sedikit dan tidak memerlukan laboratorium khusus (Kristanti, *et al.*, 2008).

Artemia salina digunakan saat sudah berumur 48 jam, karena pada keadaan ini larva udang berada pada keadaan paling peka dimana organ-organ tubuhnya sudah terbentuk lengkap, dengan kata lain *Artemia salina* berada pada fase paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Panjaitan, 2011).

Pengujian dengan larva udang dapat dilakukan dengan pengamatan tingkat kematian yang dihasilkan oleh ekstrak sampel terhadap larva udang *Artemia salina* L. setelah dilakukan pengujian selama 24 jam. Batas aktivitas biologi tanaman adalah dengan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*) < 1000 ppm (Meyer *et al*, dalam Lisdawati, 2006). Uji senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada masing-masing ekstrak daun widuri.

Hasil dari penelitian ini diharapkan akan diketahui hasil ekstrak yang mempunyai kemampuan toksik dengan nilai LC_{50} dan golongan senyawa yang

memiliki potensi bioaktivitas tertinggi, sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dari tanaman daun widuri (*Calotropis gigantea* L.).

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah nilai LC_{50} ekstrak *n*-heksana, kloroform dan etanol dari daun widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap larva udang *Artemia salina* L.?
2. Golongan senyawa aktif apa saja yang terdapat pada ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea* L.) yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* L.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas dengan nilai LC_{50} ekstrak *n*-heksana, kloroform dan etanol dari daun widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
2. Untuk mengetahui golongan senyawa yang memiliki potensi bioaktivitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. dari ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea* L.)

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah daun tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.) diambil dari daerah Pasuruan.

2. Hewan uji toksisitas yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* Leach.
3. Pelarut yang digunakan adalah variasi pelarut *n*-heksana, kloroform dan etanol.
4. Uji fitokimia golongan senyawa dilakukan dengan menggunakan uji reagen dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1.5 Manfaat Penelitian

1. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain sebagai informasi ilmiah terkait sitotoksitas ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea* L.) terhadap larva udang *Artemia salina* L.
2. Penelitian ini merupakan skrining awal aktivitas sitotoksik, yang dapat digunakan untuk pengujian bioaktivitas lebih lanjut seperti bioaktivitas antikanker, antibakteri, maupun antipestisida.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tanaman dalam Pandangan Islam

Al Quran telah banyak menyebutkan tentang tumbuhan-tumbuhan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia, sebagaimana firman Allah dalam QS Abasa ayat 24-32 berikut:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَىٰ طَعَامِهِ ۚ ﴿٢٤﴾ أَنَا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ﴿٢٥﴾ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ
 شَقًّا ﴿٢٦﴾ فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ﴿٢٧﴾ وَعِنَبًا وَقَضْبًا ﴿٢٨﴾ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ﴿٢٩﴾ وَحَدَائِقَ
 غُلْبًا ﴿٣٠﴾ وَفَيْكِهَةً وَأَبًّا ﴿٣١﴾ مَتَاعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعَمِكُمْ ﴿٣٢﴾

“Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya kami benar-benar Telah mencurahkan air (dari langit). Kemudian kami belah bumi dengan sebaik-baiknya. Lalu kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu. Anggur dan sayur-sayuran. Zaitun dan kurma. Kebun-kebun (yang) lebat. Dan buah-buahan serta rumput-rumputan. Untuk kesenanganmu dan untuk binatang-binatang ternakmu” (QS. Abasa : 24-32)

Berdasarkan tafsir Al Muyassar, surat Abasa ayat 24-32 mengandung makna bahwa hendaknya manusia memperhatikan bagaimana Allah menciptakan sumber makanan di bumi ini sebagai pilar kehidupannya. Sesungguhnya Allah benar-benar telah mengalirkan air pada permukaan tanah kemudian membelahnya dengan berbagai macam tumbuhan yang diciptakanNya.

Surat Abasa ayat 24-32 diatas menjelaskan bahwa Allah memerintahkan kepada umat manusia untuk memperhatikan segala yang ada di bumi. Allah SWT

telah menciptakan segala yang ada di bumi ini, berbagai macam tumbuhan, sayur-sayuran dan buah-buahan sebagai sumber kehidupan makhlukNya. Dalam ayat tersebut dijelaskan sekelumit ciptaan Allah yang kemudian dapat dimanfaatkan baik oleh manusia maupun hewan yang merupakan makhluk Allah SWT.

Menurut Ash-Shayim (2006), tumbuhan menjadi bahan obat yang sangat populer disamping bahan alam lainnya seperti madu dan telur yang digunakan di zaman Rasulullah Muhammad SAW. Rasulullah juga sering menggunakan tumbuhan untuk mempertahankan kesehatan tubuh dan obat penyembuh beberapa penyakit. Tanaman yang dicontohkan dalam pengobatan Rasulullah SAW diantaranya adalah: minyak zaitun, bawang putih, bawang merah, buah delima, buah labu dan gandum. Rasulullah SAW memerintahkan kepada umatnya agar mau berusaha mencari obat ketika tubuh sedang sakit, karena itu merupakan bentuk dari rasa sabar yang dicontohkan beliau.

Kekuasaan Allah dalam menciptakan alam ini terlihat pada berbagai macam bentuk tumbuhan yang tumbuh didunia ini. Semua tumbuhan memiliki susunan dan bentuk luar yang berbeda dengan tumbuhan lain. Tanaman-tanaman ini ditumbuhkan oleh Allah tentunya memiliki kegunaan yang berbeda-beda pula. Misalnya, tanaman padi yang dapat digunakan sebagai sumber makanan pokok. Salah satu contoh tanaman yang bisa dimanfaatkan sebagai obat yaitu tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.).

2.2 Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L)

Klasifikasi tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L) adalah sebagai berikut

(Yaligar, 2001):

Kingdom	: Plantae
Divison	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: Gentianales
Familia	: Asclepiadaceae
Genus	: <i>Calotropis</i>
Species	: <i>Calotropis gigantea</i> (L.)

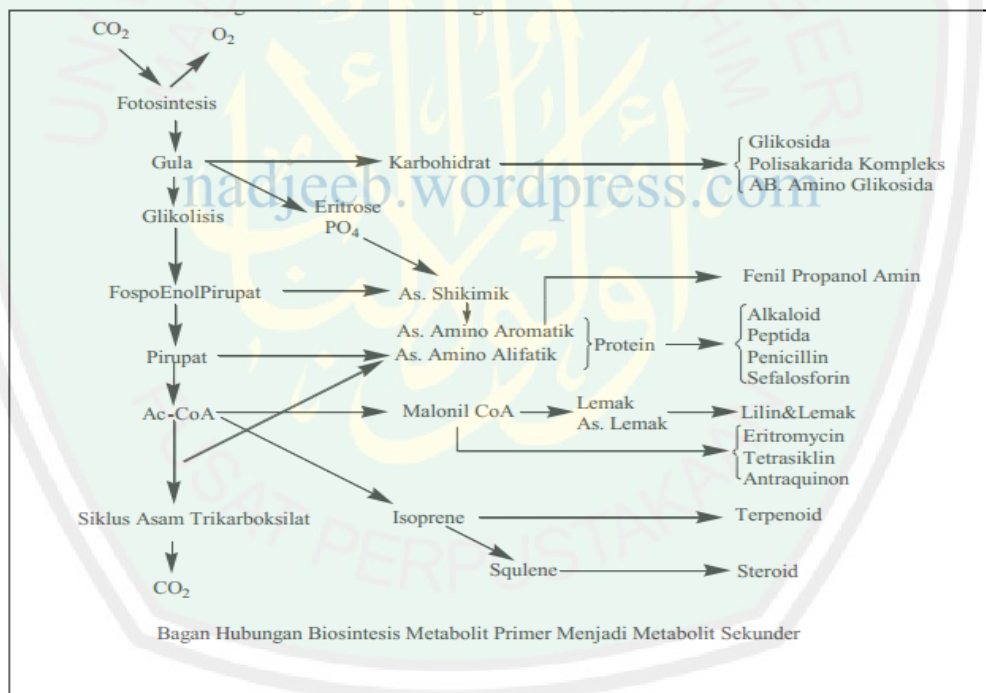


Gambar 2.1 Daun tanaman Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

Tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L) merupakan tanaman liar yang perkembangbiakannya sangat cepat. Tanaman ini tersebar di seluruh Asia Tenggara, biasanya tumbuh di tanah yang kurang subur, padang rumput kering dari lereng-lereng gunung yang rendah, serta di pantai. Tanaman perenial ini mempunyai persebaran di wilayah tropis dan subtropis, di benua Asia dan Afrika (Kumar, *et al.*, 2013). Tanaman ini cukup adaptif di lingkungan yang ekstrim, kering dan panas. Di India terwakilli oleh 2 spesies, yaitu *Calotropis gigantea* dan *Calotropis procera*. Di beberapa negara, seperti India, Sri Lanka, Singapura,

Malaysia, Filipina, Cina Selatan dan Thailand umumnya digunakan sebagai obat tradisional.

Dalam penelitian ini akan dilakukan uji sitotoksitas pada bagian daun tanaman widuri. Selain mudah didapatkan, dalam tanaman widuri, daun terdapat dalam jumlah yang lebih besar. Daun juga merupakan tempat terjadinya proses fotosintesis dalam tanaman. Fotosintesis merupakan salah satu cara asimilasi karbon, karena dalam fotosintesis karbon bebas dari CO_2 diikat menjadi glukosa sebagai penyimpan energi (Pertamawati, 2010).



Gambar 2.2 Siklus Fotosintesis

Glukosa yang merupakan hasil akhir dari fotosintesis selanjutnya akan mengalami proses metabolisme menghasilkan berbagai macam senyawa metabolit primer dan metabolit sekunder (Najib, 2006).

2.2.1 Kandungan Senyawa Kimia

Tanaman widuri mengandung berbagai macam senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif pada bagian-bagian dari tumbuhan ini, antara lain:

1. Daun : flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsiumoksalat serta saponin (Kongkow, 2007), saponin, (Jayakumar, *et al.*, 2010), steroid, terpenoid (Budiman, 1999).
2. Akar : Elakkiya dan Prasanna (2012) meneliti bagian tanaman dan akar menyatakan adanya kandungan senyawa alkaloid, fenol, saponin dan steroid. (Budiman, 1999), steroid, terpenoid dan flavonoid.
3. Bunga : phenol, flavonoid, gula, steroid, saponin, dan quinon (Jayakumar, *et al.*, 2010).

2.2.2 Manfaat dan Kegunaan

Tumbuhan widuri (*Calotropis gigantea* L.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan, baik dari bagian daun, batang, ataupun akarnya. Keterangan Sahabbudin dan Pasaru (2009) menyatakan dari hasil penelitiannya bahwa senyawa biokatif yang terkandung dalam daun widuri tidak hanya bersifat toksik, tetapi juga berpengaruh terhadap pertumbuhan serangga.

Pada beberapa hasil penelitian menyatakan beberapa manfaat dari tanaman widuri adalah sebagai obat batuk, gatal-gatal, obat sakit gigi, obat sakit telinga,

epilepsi, luka, skesleo dan juga diare. Menurut Dipalaya, *et al.*, (2009) menyebutkan dari hasil penelitiannya bahwa tanaman widuri dapat dimanfaatkan sebagai pembasmi jentik nyamuk.

2.3 Pemisahan Senyawa Aktif

2.3.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi atau padat-cair merupakan pemisahan komponen kimia yang didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut di mana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Secara umum ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian untuk tumbuhan seperti bunga, buah, daun, kulit batang dan akar dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan jalan membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut. Jika maserasi dilakukan dengan pelarut air, maka perlu dilakukan proses ekstraksi lebih lanjut, yaitu ekstraksi fasa air yang diperoleh dengan pelarut organik. Jika maserasi langsung dilakukan dengan pelarut organik maka filtrasi hasil ekstraksi dikumpulkan jadi satu, kemudian dievaporasi atau destilasi. Selanjutnya dapat dilakukan proses pemisahan dengan kromaografi atau dengan rekristalisasi langsung (Kristanti, *et al.*, 2008).

Salah satu keuntungan metode ini adalah cepat, terutama jika maserasi dilakukan pada suhu sesuai titik didih pelarut. Meskipun demikian suhu ini tidak selalu efektif dan efisien. Waktu rendam bahan dalam pelarut bervariasi antara 15-

30 menit, tetapi kadang-kadang mencapai 24 jam. Jumlah pelarut yang dibutuhkan cukup besar, antara 10-20 kali jumlah sampel (Kristanti, *et al.*, 2008).

Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutan pelarut air ataupun pelarut organik terhadap suatu bahan. Kepolaran ini timbul dari perbedaan dua kutub kelarutan. Secara fisika, tingkat polaritas dapat ditunjukkan dengan lebih pasti melalui pengukuran konstanta dielektrium (D) suatu pelarut. Sifat kelarutan zat didasarkan pada teori *like dissolves like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar (Khopkar, 2003). Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etil klorida, etanol, heksana, isopropil alkohol dan methanol. Semakin besar konstanta dielektrik suatu pelarut disebut semakin polar. Pelarut n-heksana 1,89; kloroform 4,81 dan etanol 24,30, sehingga tingkat kepolaran ketiga pelarut tersebut n-heksana > kloroform > etanol.

Urmi, *et al.*, (2012) melakukan penelitian bagian daun widuri menggunakan pelarut metanol yang selanjutnya difraksinasi menggunakan etil asetat dan n-heksana. Nilai LC₅₀ terbaik didapat dari ekstrak n-heksana yaitu 2,42 ppm. Dari hasil tersebut dapat diketahui adanya aktivitas sitotoksik dari daun widuri.

2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada kromatografi lapis tipis fase diamnya berupa lapisan yang bergam pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium atau plat plastik. Fase gerak yang dikenal sebagai

pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembang secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembang secara menurun (*descending*).

1. Fase Gerak pada KLT

Berikut adalah beberapa petunjuk dalam memilih dan mengoptimasi fase gerak:

- a. Fase gerak harus mempunyai kemurnian yang sangat tinggi karena KLT merupakan teknik yang sensitif.
- b. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga R_f antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan.
- c. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecenderungan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non polar seperti metil benzen akan meningkatkan R_f secara signifikan.
- d. Solut-solut ionik dan solut-solut polar lebih baik digunakan campuran pelarut sebagai fase geraknya, seperti campuran air dan metanol dengan perbandingan tertentu. Penambahan sedikit asam etanoat atau amonia masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam.

2. Fase Diam pada KLT

Fase diam yang digunakan pada KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Fase diam berupa plat silika yang biasa digunakan adalah plat dengan kode G₆₀F₂₅₄, maksudnya plat ini dari gypsum dengan ukuran 60 A° dengan kemampuan berfluorosensi pada panjang gelombang 254 nm.

Lapisan tipis seperti pada plat silika gel F₂₅₄ yang digunakan dalam penelitian ini mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak tanpa warna pada lapisan yang telah dikembangkan. Indikator fluoresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar, seperti dengan lampu UV. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik berbagai jenis, sinar UV yang mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya ialah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar. Cara ini sangat peka dan tidak merusak senyawa yang ditampakan (Gritter, *et al.*, 1991).

Bercak pemisahan pada plat KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk menentukannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Mengamati lempeng dibawah lampu ultra violet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakan solute sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi berfluoresensi seragam (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penggunaan KLT ini adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, dan

menentukan efektifitas pemurnian. Analisis secara kualitatif KLT digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter yang digunakan untuk uji identifikasi adalah nilai R_f (Gandjar dan Rohman, 2007).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga R_f . Harga R_f didefinisikan sebagai berikut:

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

Harga-harga R_f untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standar. Harga R_f dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam KLT di antaranya adalah struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, jenis eluennya serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan (Sastrohamidjojo, 1991).

Hayati, *et al.*, (2012) melakukan penelitian dengan menggunakan pemisahan KLT untuk senyawa tanin, alkaloid dan steroid ekstrak etil asetat tanaman anting-anting. Hasil identifikasi senyawa tanin pada tanaman anting-anting dengan menggunakan eluen asam asetat glasial : air : HCl pekat (30:10:3) menghasilkan 2 noda dengan R_f 0,4 dan 0,489. Hasil identifikasi senyawa alkaloid dengan menggunakan eluen kloroform : metanol (9,5:0,5) menghasilkan 5 noda dengan nilai R_f 0,27-0,87. Untuk identifikasi senyawa steroid dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) menghasilkan 9 noda dengan nilai R_f 0,06-0,83.

Purwaningsih (2003) menyatakan bahwa eluen untuk pemisahan flavonoid adalah BAA atau campuran butanol-asam asetat-air (4:1:5), kemudian diperiksa di bawah sinar UV akan berwarna biru dengan diuapi uap amoniak akan berwarna biru kehijauan dengan noda sebanyak 8 dengan R_f antara 0,14-0,94.

2.4 Larva Udang *Artemia salina* Leach

Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk mengetahui bioaktivitas senyawa melalui uji toksisitas adalah *brine shrimp* (udang laut) dari jenis *Artemia salina*. Pertama ditemukan di Lynington, England pada tahun 1755. *Artemia salina* bisa ditemukan di pedalaman danau air asin di seluruh dunia, tetapi tidak ditemukan di Samudera. Klasifikasinya sebagai berikut :

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Subklas	: <i>Branchipoda</i>
Ordo	: Anostraca
Famili	: Artemiidae
Genus	: <i>Artemia</i>
Species	: <i>Artemia salina</i> Leach.



Gambar 2.3 Larva udang *Artemia salina* Leach (Anonim, 2009)

Keunggulan penggunaan *Artemia salina* untuk uji BSLT ini ialah sifatnya yang peka terhadap bahan uji, waktu siklus hidup yang lebih cepat, mudah dibiakkan dan harganya yang murah. Sifat peka *Artemia salina* kemungkinan

disebabkan oleh keadaan membran kulitnya yang sangat tipis sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya. *Artemia salina* diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini dilihat dengan mata telanjang berbentuk bulat-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter sekitar 300 mikron (Farihah, 2008).

Artemia salina ditemukan hampir pada seluruh tempat pada permukaan perairan di bumi yang memiliki kisaran salinitas 10–20 g/L, hal inilah yang menyebabkannya mudah dibiakkan. Telur *Artemia salina* terlihat seperti partikel-partikel kecil berwarna coklat dengan diameter kira-kira 0,2 mm. Telur-telur tersebut dapat dikumpulkan dan dipisahkan dari pasir dan kotoran lainnya dengan cara pengayakan. Telur-telur tersebut memiliki resistensi yang tinggi terhadap kondisi ekstrim dan dapat disimpan dalam waktu yang lama, jika telur-telur tersebut berada dalam keadaan bebas air. Uji BSLT dengan menggunakan *Artemia salina* dilakukan dengan menetasakan telur-telur tersebut dalam air laut yang dibantu dengan aerasi. Telur *Artemia salina* akan menetas sempurna menjadi larva dalam waktu 24 jam. *Artemia salina* yang baik digunakan untuk uji BSLT ialah yang berumur 48 jam sebab jika lebih dari 48 jam dikhawatirkan kematian *Artemia salina* bukan disebabkan toksisitas ekstrak melainkan oleh terbatasnya persediaan makanan (Meyer, *et al.*, 1982).

Artemia salina digunakan saat sudah berumur 48 jam, karena pada keadaan ini larva udang berada pada keadaan paling peka dimana organ-organ tubuhnya sudah terbentuk lengkap, dengan kata lain *Artemia salina* beraa pada

fase paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Panjaitan, 2011).

Penetasan telur dapat dilakukan dalam wadah bening seperti gelas kimia atau stoples yang diberi bahan plastik, negatif film, atau kaca dengan menggunakan media air laut (*brine = saline*), wadah penetasan dibagi menjadi dua bagian, yaitu bagian terang dan bagian gelap oleh suatu sekat berlubang. Bagian gelap digunakan untuk meletakkan telur yang akan ditetaskan. Sekat berlubang menjadi jalan untuk larva udang telah yang lahir untuk bergerak secara alamiah ke arah terang. Selama penetasan, tempat penetasan diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar/neon 40-60 watt agar suhu penetasan 25-30 °C tetap terjaga (Harmita, 2006).

Sebagai media penetasan telur, digunakan air laut buatan dengan kadar garam (NaCl) 15 g/L. Kadar oksigen yang dibutuhkan selama penetasan harus lebih dari 3 mg/L, oleh karena itu, media air laut harus diberi udara, baik dengan akrator, kompresor, maupun blower. Dalam waktu 24-36 jam biasanya telur-telur sudah menetas menjadi larva yang disebut *nauplii* (larva) yang memiliki ukuran 0,25 mm (0,01 inci). *Nauplii* aktif yang telah berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian (Harmita, 2006).

2.5 Uji Sitotoksisitas dengan Metode BSLT

Sitotoksisitas merupakan istilah relatif yang biasa digunakan dalam memperbandingkan suatu zat dengan lainnya, sehingga merupakan hal biasa untuk mengatakan bahwa suatu zat kimia lebih toksik dari pada zat kimia lain.

Perbandingan zat kimia seperti itu sangat informatif, karena pernyataan tersebut melibatkan informasi tentang mekanisme biologi yang sedang dipermasalahkan dan juga dalam kondisi bagaimana zat kimia tersebut berbahaya (Loomis, 1978).

Uji sitotoksitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik serta untuk menilai batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan suatu senyawa. Proses awal untuk menentukan toksisitas senyawa baru adalah membuat suatu kisaran dosis kasar untuk diberikan pada hewan uji. Tekanan yang dianjurkan paling tidak 4 peringkat dosis, berkisar dari dosis terendah yang belum memberikan efek kematian seluruh hewan uji sampai dosis tertinggi yang dapat mematikan seluruh atau sebagian hampir seluruh hewan uji. Senyawa ini diberikan melalui jalur yang memungkinkan untuk terjadinya efek toksik (Loomis, 1978).

Metode BSLT merupakan metode yang digunakan untuk menentukan toksisitas suatu senyawa dalam ekstrak sampel tertentu. BSLT dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama adalah penetasan telur *Artemia salina* L. dalam air laut buatan (kadar garam laut 3,8 %) dan tahap kedua adalah membuat suatu kisaran dosis senyawa atau ekstrak untuk diberikan pada hewan uji *Artemia salina* L. yang telah berumur dua hari, karena pada umur dua hari larva berada pada keadaan dimana dinding selnya masih dalam kondisi lunak sehingga dengan konsentrasi yang kecil menimbulkan efek yang diinginkan (Loomis, 1978). Keuntungan metode ini karena dapat digunakan untuk mengetahui adanya efek sitotoksik dan untuk memperoleh hewan uji lebih mudah, harganya murah, telurnya dapat bertahan beberapa tahun bila disimpan ditempat yang kering,

mengerjakannya lebih cepat dan sederhana. Di samping itu metode ini telah diuji dan mempunyai korelasi lebih positif dengan metode yang telah biasa digunakan untuk penampisan senyawa antikanker (Widiyati, 2006).

Pada prosedur uji sitotoksitas, digunakan air laut sebagai media uji. Air laut yang digunakan adalah air laut buatan dengan cara melarutkan garam tidak beriodium ke dalam air. Konsentrasi yang digunakan adalah 3,8 % yaitu dengan melarutkan 38 g garam tiap 1 L air. Prosedur uji sitotoksitas dengan metode BSLT ini adalah sebanyak 10 ekor larva udang laut dimasukkan ke dalam tabung uji yang berisi ekstrak dan sekitar 5 mL air laut (Mc Laughlin, *et al.*, 1988 dalam Morshed, *et al.*, 2012). Dimetilsulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. DMSO sering digunakan sebagai pelarut untuk reaksi kimia yang melibatkan garam. DMSO memiliki titik lebur $18,5\text{ }^\circ\text{C}$, titik didih $189\text{ }^\circ\text{C}$, konstanta dielektrikum 46,68. DMSO merupakan cairan yang tidak toksik sering digunakan dalam sintesis farmasi, pembuatan elektronik, dan pemberian obat di dalam tubuh. Penggunaannya didukung oleh lebih dari 45 tahun pengalaman industri dan akademik (Morshed, *et al.*, 2012).

Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. atau BSLT dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah pada uji sitotoksik. Korelasi antara uji toksisitas akut ini dengan uji sitotoksik adalah jika mortalitas terhadap *Artemia salina* L. yang ditimbulkan memiliki harga $\text{LC}_{50} < 1000\text{ }\mu\text{g/mL}$. Parameter yang ditunjukkan untuk menunjukkan adanya aktivitas

biologi pada suatu senyawa pada *Artemia salina* L. adalah kematiannya (Meyer, *et al.*, 1982 dalam Farihah, 2008).

Hasil penelitian (Srisadono & Sunoko, 2008) menyatakan hasil uji sitotoksik ekstrak etanol daun sirih dengan menggunakan metode BSLT menunjukkan ekstrak ini memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ adalah 296,546 $\mu\text{g/ml}$, sehingga dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun sirih memiliki potensi sebagai antikanker.

Menurut Marliyana, *et al.*, (2012) hasil uji BSLT ekstrak etanol dan n-heksana sampel buah merah menunjukkan prosentase kematian ekstrak n-heksana lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol, sebesar 45% diukur pada konsentrasi 400 $\mu\text{g/ml}$. Ekstrak n-heksana selanjutnya dilakukan pemisahan secara kromatografi kolom dengan elusi secara gradien menggunakan pelarut campuran n-heksana-etil asetat untuk memperoleh fraksi aktif. Uji toksisitas secara BSLT menunjukkan fraksi aktif mempunyai nilai LC_{50} sebesar 138,05 $\mu\text{g/mL}$.

2.6 Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman

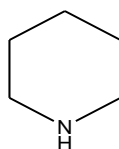
Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa kimia di dalam tumbuhan. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, saponin, triterpenoid dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2006).

Tumbuhan widuri (*Calotropis gigantea* L.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan, baik dari bagian daun, batang, ataupun akarnya. Kandungan kimia pada daun diantaranya flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat serta saponin (Kongkow, 2007). Sahabbudin dan Pasaru (2009) menyatakan dari hasil penelitiannya bahwa senyawa biokatif yang terkandung dalam daun widuri tidak hanya bersifat toksik, tetapi juga berpengaruh terhadap pertumbuhan serangga. Selain itu daun widuri juga mengandung steroid, terpenoid dan flavonoid (Budiman, 1999).

2.6.1 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Semua alkaloid mengandung nitrogen yang sering kali terdapat dalam cincin heterosiklik, tetapi ada yang terdapat dalam struktur alifatiknya, bersifat basa (Lenny, 2006).

Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya, misalnya piridina, piperidina, indol, isokuinolina, dan tropana. Meskalina dan efedrina merupakan golongan alkaloid yang nitrogennya terdapat dalam struktur alifatik. Senyawa ini biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa organik dan sering ditangani di laboratorium sebagai garam dengan asam hidroklorida dan asam sulfat (Robinson, 1995).



Gambar 2.4 Struktur senyawa Alkaloid (Robinson, 1995)

Cara untuk mengklasifikasi alkaloid adalah dengan klasifikasi yang didasarkan pada jenis tumbuhan dari mana alkaloid ditemukan. Alkaloid dapat dipisahkan dari sebagian besar komponen tumbuhan berdasarkan sifat basanya. Oleh karena itu, senyawa golongan ini cenderung sering diisolasi dengan HCl atau H₂SO₄ garam ini atau alkaloid bebasnya berbentuk padat membentuk kristal yang tidak berwarna (Kritanti, *et al.*, 2008).

Pelarut atau pereaksi alkaloid biasanya menggunakan kloroform, aseton, amoniak dan metilena klorida. Pereaksi Mayer (kalium tetraiodomerkurat) paling banyak untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengendapkan hampir semua alkaloid. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5 %, asam tanat 5 %, pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat), iodoplatinat dan larutan asam pikrat jenuh. Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu cara cepat untuk pemisahan alkaloid dengan silika gel sebagai penjerapnya. Pereaksi yang paling umum digunakan untuk menyemprot kromatogram adalah pereaksi Dragendorff (Robinson, 1995).

Alkaloid tidak ditemukan disemua jenis tanaman. Alkaloid juga masih jarang dilaporkan pada organisme selain tanaman seperti bakteri dan jamur. Kebanyakan alkaloid ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi Angiospermae terutama pada tanaman dikotil. Famili *Liliaceae* dan *Amarillidaceae* merupakan dua famili tanaman monokotil yang dilaporkan mengandung alkaloid, termasuk diantaranya pada beberapa tanaman anggrek. Alkaloid ditemukan pada berbagai bagian tanaman mulai dari akar, kulit batang, daun. Transpor aktif alkaloid antara

organ tanaman seperti dari akar ke daun sudah banyak dilaporkan terjadi pada berbagai tanaman.

Meistiani (2001) melakukan isolasi alkaloid ekstrak akar kuning menyatakan hasil identifikasi alkaloid dengan KLT didapatkan eluen terbaik metanol : asam asetat (3:7) didapatkan nilai R_f 0,87-0,12.

Hasil isolasi alkaloid daun binahong pada penelitian (Titis, *et al.*, 2013) dengan KLT dan menggunakan plat silika gel $G_{60}F_{254}$ dan fasa gerak yang digunakan adalah campuran pelarut etanol, etil asetat dan n-heksana (1:2:30). Hasil yang diperoleh pada lampu UV 365 nm yakni dua buah noda yang berwarna biru dan merah dengan R_f 0,65 dan 0,23. Berdasarkan hasil KLT, diketahui noda berwarna biru merupakan alkaloid.

Menurut Susilaningsih (2007) bahwa eluen terbaik untuk pemisahan alkaloid dari Rimpang Lengkuas Merah adalah campuran kloroform : n-heksana (2:1) dan diperoleh 1 noda biru dengan R_f 0,75. Sriwahyuni (2010) menyatakan bahwa identifikasi golongan alkaloid dari ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan eluen kloroform-metanol (9:1) setelah disemprot dengan reagen Dragendorff menunjukkan 4 noda di bawah sinar UV 366 nm yang berwarna ungu kecoklatan-hijau kecoklatan dengan nilai R_f 0,56–0,8. Sedangkan eluen kloroform : metanol (9,5:0,5) menunjukkan 5 noda yang berwarna ungu kecoklatan – jingga kecoklatan dengan nilai R_f 0,27–0,87.

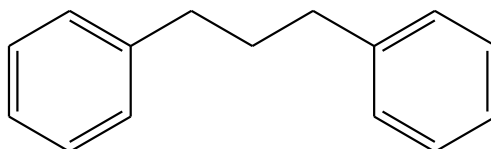
Hasil identifikasi kualitatif kandungan kimia fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang berpotensi sebagai antikanker pada penelitian (Sukardiman, 2006) adalah golongan alkaloid. Analisis dilakukan dengan KLT

dengan menggunakan fase diam silika gel G₆₀F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : metanol (5:1) dihasilkan 3 noda. Lalu digunakan penampak noda sinar UV dan dragendroff dengan panjang gelombang 365 nm dihasilkan satu noda bewarna merah jingga yang memiliki R_f sebesar 0,4, noda 2 dan 3 memiliki noda warna coklat jingga dan hijau dengan R_f sebesar 0,78 dan 0,95.

2.6.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C₆-C₃-C₆ yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C₆ (cincin benzen tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai C₃, sesuai struktur kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995).

Beberapa kemungkinan lain fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tubuh, pengatur proses fotosintesis, sebagai zat mikroba, antivirus dan antinsektisida. Beberapa flavonoid sengaja dihasilkan oleh jaringan tumbuhan sebagai respon terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungi yang menyerangnya (Kritanti, *et al.*, 2008).



Gambar 2.5 Struktur inti senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

Pemisahan dengan KLT dikenal pengembang yang paling populer adalah butanol-asam asetat-air (4:1:5). Pelarut yang bersifat basa cenderung menguraikan flavonoid, sedangkan pelarut asam dapat menyebabkan asilasi bagian gula sehingga menimbulkan bercak jadian. Beberapa senyawa (flavonol, kalkon) akan berfluorosensi di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 365 nm sedangkan senyawa yang lain (glikosida flavonol, antosianin, flavon) menyerap sinar dan tampak sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluorosensi. Glikosida flavon dan flavonol berfluorosensi kuning, flavanol kelihatan kuning pucat, katekin biru pucat. Selanjutnya di bawah cahaya biasa sambil diuapi uap amoniak flavon kelihatan kuning, antosianin kelabu-biru, kalkon dan aouron merah jingga (Robinson, 1995).

Zaini (2006) melakukan isolasi bioaktif flavonoid ekstrak kasar daun dewa *Gynura pseudochina* (Lour) dengan KLT menggunakan fase diam silika gel G₆₀F₂₅₄ plat aluminium dengan eluen BAA (n-butanol–asam asetat–air = 4:1:5) menghasilkan kromatogram dengan perhitungan nilai R_f 0,10-0,74. Hasil analisa menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun dewa menghasilkan spot lebih dari satu. Hal ini berarti terdapat keragaman senyawa metabolit yang terkandung di dalam ekstrak tersebut. Di samping itu, adanya spot yang berwarna kuning, jika diuapi dengan amoniak dapat menunjukkan adanya senyawa flavon atau flavonol di dalam ekstrak.

Halimah (2010) melakukan uji fitokimia golongan senyawa flavonoid dengan KLT menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dan selanjutnya noda diuapi dengan uap amonia. Hasil dari proses tersebut adalah

terbentuknya 4 noda yang terpisah di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm. Noda pertama berwarna biru kehijauan dengan nilai R_f 0,26. Noda kedua berwarna biru kehijauan dengan nilai R_f 0,4. Noda ketiga berwarna ungu dengan nilai R_f 0,56 dan noda keempat berwarna merah keunguan dengan nilai R_f 0,82.

Kusumawati (2003) melakukan identifikasi flavonoid dengan menambahkan heksana pada ekstrak daun rumput bambu sampai heksana tidak berwarna. Residu dilarutkan dalam EtOH. Dengan fase diam adalah silika gel, fase geraknya BAW dan penampak nodanya uap ammoniak. Didapatkan harga R_f 0,68 yang menyatakan adanya kandungan flavonoid.

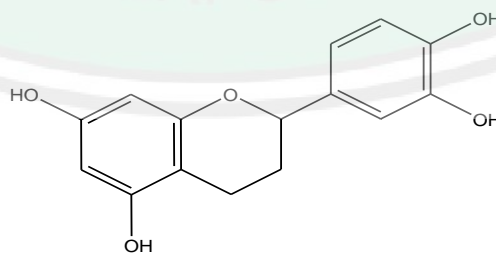
Rohyami (2008) melakukan penelitian untuk menentukan kandungan flavonoid dari ekstrak metanol daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl) dengan metode KLT. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak BAA (9:2:6) menunjukkan adanya 2 noda dengan nilai R_f untuk noda pertama 81,82 berwarna lembayung dan noda kedua 72,73 berwarna kuning redup.

Identifikasi flavonoid ekstrak etanol daun sirih merah dengan KLT menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak etil asetat : asam format : asam asetat : air (100:11:11:27). Pada pengamatan sinar UV 254 nm bercak terlihat berwarna kuning sedangkan pada UV 365nm bercak berwarna biru akibat adanya pepadaman. Nilai R_f bercak sampel ekstrak etanol sirih merah sebesar 0,94 (Windriyati, *et al.*, 2010).

2.6.3 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Secara kimia tanin dibagi menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi atau tanin katekol dan tanin terhidrolisis atau tanin galat (Harborne, 1994).

Tanin terkondensasi merupakan oligomer atau polimer flavonoid (flavan 3-ol atau flavan-3,4-diol) di mana ikatan C-C tidak mudah untuk dihidrolisis, biasanya disebut juga dengan nama proantosianidin. Tanin terkondensasi terdapat dalam paku-pakuan, gimnospermae dan angiospermae, terutama pada jenis tumbuh-tumbuhan berkayu. Tanin terhidrolisis merupakan molekul dengan poliol (umumnya D-glukosa) sebagai pusatnya. Gugus –OH pada karbohidrat sebagian atau seluruhnya teresterifikasi dengan gugus karboksil pada asam galat atau asam elagat. Salah satu fungsi tanin dalam tumbuhan adalah sebagai penolak hewan pemakan tumbuhan (Harborne, 1987). Beberapa tanin terbukti memiliki aktivitas antioksidan, menghambat pertumbuhan tumor dan menghambat enzim seperti "reverse" transkriptase dan DNA topoisomerase (Robinson, 1995).



Gambar 2.6 Struktur senyawa Tanin (Robinson, 1995)

Beberapa kelompok peneliti menggunakan kromatografi kertas untuk deteksi tanin. Pelarut yang digunakan untuk mendeteksi campuran tanin

terkondensasi adalah butanol-asam asetat-air (14:1:5), diikuti dengan asam asetat 6 % merupakan pelarut yang cukup baik. Bercak noda diperiksa dengan sinar UV lalu dengan penyemprot FeCl_3 menghasilkan warna lembayung (Harborne,1987).

Hayati, *et al.*, (2010) dalam penelitiannya melakukan isolasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut aseton : air (7:3) selama 3x24 jam dengan bantuan shaker, kemudian dilakukan fraksinasi. Pemisahan senyawa tanin dari ekstrak dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik untuk mencari eluen terbaik dengan variasi eluen yaitu *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5), etil asetat : kloroform : asam asetat 10 % (15:5:2), asam asetat glasial : H_2O : HCl pekat (Forestal) (30:10:3), metanol : etil asetat (4:1), etil asetat : metanol : asam asetat (6:14:1), toluen : etil asetat (3:1), kemudian dilanjutkan pemisahan dengan KLT preparatif. Identifikasi senyawa tanin dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari daun belimbing wuluh mengandung senyawa tanin, didukung dari uji fitokimia dari ketiga reagen menunjukkan positif mengandung senyawa tanin. Eluen terbaik dalam pemisahan senyawa tanin dengan KLT analitik adalah *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) yang dapat digunakan dalam pemisahan dengan KLT preparatif. Eluen ini memisahkan 3 noda dengan nilai R_f 0,53; 0,61; dan 0,68. Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer UV-Vis, isolat 2 dengan nilai R_f 0,61 memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 331 nm.

Fitriyani (2011) melakukan uji fitokimia golongan senyawa tanin dalam ekstrak metanol daun Sirih Merah dengan KLT menggunakan campuran eluen

kloroform : metanol : air (7:3:0,4). Pada proses KLT tersebut menghasilkan 1 noda berwarna hitam dengan nilai R_f 0,5.

Menurut Mustikasari, *et al.*, (2010) identifikasi kandungan ekstrak metanol tanin pada biji kalangkala dapat dilakukan dengan pendidihan air dan penambahan ferikloroda 1%. Hasil terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan positif mengandung senyawa tanin.

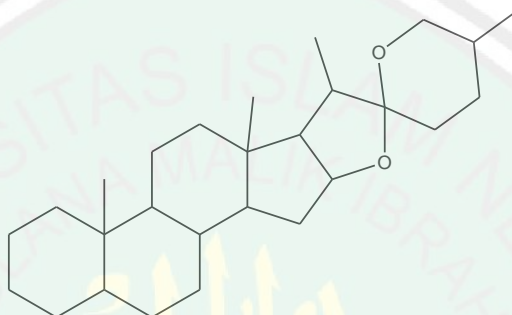
Sriwahyuni (2010) menyatakan bahwa identifikasi golongan tanin dari ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan eluen butanol-asam asetat-air (14:1:5) menunjukkan 2 noda di bawah sinar UV 366 nm yang berwarna ungu (R_f 0,61) dan ungu kehitaman (R_f 0,8) setelah disemprot dengan $FeCl_3$. Sedangkan untuk eluen asam asetat glasial-air-HCl pekat (30:10:3) menunjukkan 2 noda yang berwarna ungu kehitaman (R_f 0,4) dan ungu (R_f 0,489).

Menurut Widyowati dan Rahman (2010) identifikasi tanin ekstrak metanol daun *Garcinia celebica* L. dapat dilakukan dengan menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat : asam format (0,5:9,0:0,5) dan penampak noda $FeCl_3$ diperoleh noda berwarna hitam dengan nilai R_f 0,48 yang positif menunjukkan senyawa tanin.

2.6.4 Saponin

Saponin berasal dari bahasa latin *sapo* yang berarti sabun, karena sifatnya menyerupai sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air dan pada konsentrasi yang rendah sering menyebabkan hemolisis sel darah merah. Saponin dalam larutan yang sangat encer dapat sebagai racun ikan, selain itu saponin juga berpotensi sebagai

antimikroba, dapat digunakan sebagai bahan baku sintesis hormon steroid. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam asam atau menggunakan enzim (Robinson, 1995).



Gambar 2.7 Struktur inti senyawa saponin (Robinson, 1995)

Pemisahan saponin melalui plat silika gel KLT menggunakan larutan pengembang seperti butanol yang dijenuhkan dengan air atau kloroform-methanol-air (13:7:2) (Harborne, 1987). Kristianingsih (2005) menyatakan bahwa larutan pengembang yang menghasilkan resolusi terbaik pada KLT untuk senyawa saponin dari akar tanaman kedondong laut adalah campuran kloroform-metanol-air (20:60:10) yang menghasilkan noda dengan 3 R_f antara 0,55-0,73 dan ketika ditambah H_2SO_4 akan menimbulkan warna ungu-ungu gelap.

Penelitian Wonohadi, *et al.*, (2006) menunjukkan bahwa hasil skrining kandungan kimia secara KLT fraksi etanol ekstrak etanol daun rimpang putih giring menunjukkan adanya golongan saponin yang menggunakan campuran kloroform-metanol-air (64:50:10) dengan penampak noda Lieberman Burchard (110 °C, 5–10 menit) dan menghasilkan noda biru (R_f 0,17).

Marliana, *et al.*, (2005) Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.)

dalam Ekstrak Etanol. Pelarut penegembang yang digunakan pada KLT untuk senyawa saponin adalah n-heksana : aseton (4:1). Hasil KLT menunjukkan timbulnya noda dengan R_f 0,84 dan 0,79 yang berwarna merah jambu pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna kuning pada UV 366 nm menunjukkan adanya saponin pada ekstrak etanol labu siam.

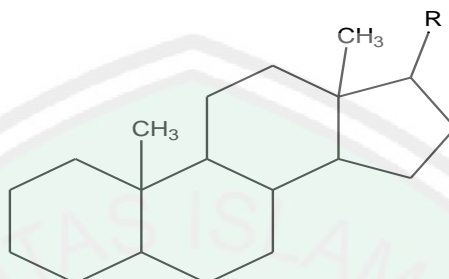
Batubara, (2003) melakukan pemisahan saponin dari sampel ekstrak metanol:diklorometana (1:1) akar kuning dilakukan dengan menggunakan metode KLT preparatif menggunakan silika gel dengan eluen kloroform:metanol (84:16) terlihat bahwa terdapat dua fraksi yang mengandung saponin yakni fraksi pertama memiliki bercak noda dengan R_f 0,80 dan pada fraksi ketiga memiliki nilai R_f sebesar 0,40.

2.6.5 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Poedjiadi, 1994).

Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini

tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, 1995).



Gambar 2.8 Struktur inti senyawa steroid (Robinson, 1995)

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995). Hasil pemantauan dengan metoda KLT pada isolat spon laut memperlihatkan pemisahan noda yang sangat baik menggunakan fase gerak n-heksana: etil asetat (7:3) dengan lampu UV 254. Isolat diduga termasuk golongan steroid karena hasil uji dengan pereaksi metanol/H₂SO₄ 10% berwarna merah muda dan pereaksi Liebermann-Burchard berwarna hijau, sedangkan dengan vanilin asam sulfat berwarna hijau kebiruan (Handayani, *et al.*, 2008).

Halimah (2010) melakukan uji fitokimia golongan senyawa steroid dari ekstrak kloroform tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.). Ekstrak tanaman dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditambahkan dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh warna hijau kebiruan maka ekstrak menunjukkan adanya golongan

senyawa steroid. Hasil dari uji ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform dari tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) positif mengandung senyawa steroid. Pada uji fitokimia dengan menggunakan KLT eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat (7:3), disemprot dengan pereagen Lieberman-Burchard dan diamati dibawah sinar UV 254 nm. Hasil dari uji ini didapatkan 4 noda yang memiliki nilai R_f 0,57, 0,76, 0,94, 0,96 yang ditunjukkan dengan warna masing-masing noda sebelum disemprot dengan pereagen Lieberman-Burchard yaitu hijau terang, hijau kekuningan, hijau, coklat kekuningan dan setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard warnanya menjadi hijau terang, hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan.

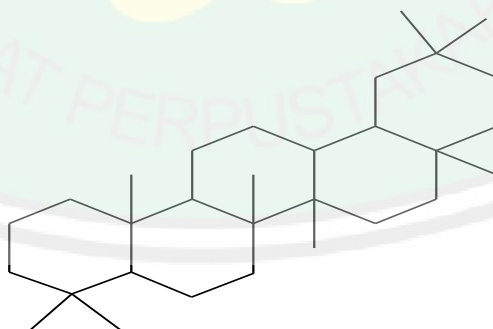
Reveny (2011) melakukan uji fitokimia golongan steroid dari daun Sirih Merah menggunakan eluen n-heksan : etilasetat (8:2) diperoleh R_f 0,41 dan 0,29 (ungu merah), dengan perbandingan (6:4) diperoleh R_f 0,84 dan 0,76 (ungu merah) dengan pereaksi Liebermann Burchard.

Penelitian Hayati, *et al.*, (2012) menyatakan bahwa identifikasi senyawa steroid pada tanaman anting-anting dapat menggunakan KLT dengan eluen heksana:etil asetat (7:3) dan disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan terbentuknya noda berwarna hijau, biru ungu sampai coklat. Pada sinar UV 366 nm ekstrak etil asetat anting-anting terdapat 9 noda dengan nilai R_f berturut-turut adalah 0,66; 0,11; 0,38; 0,47; 0,56; 0,68; 0,77; 0,8; dan 0,83 dengan warna noda berturut-turut hijau kebiruan, hijau kebiruan, merah muda, hijau, merah muda, ungu tengah biru kehijauan, orange, hijau kebiruan, dan hijau kebiruan muda.

Penelitian Restasari (2002) menunjukkan bahwa identifikasi senyawa steroid pada ekstrak kloroform daun ketapang dapat dilakukan dengan menggunakan KLT dengan campuran fasa gerak n-heksana : etil asetat : kloroform (5:3:1) memiliki daya pisah terbaik.

2.6.6 Triterpenoid

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Senyawa ini paling umum ditemukan pada tumbuhan berbiji, bebas dan sebagai glikosida. Triterpenoid yang paling penting dan paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik (Robinson, 1995).



Gambar 2.9 Struktur senyawa Triterpenoid (Robinson, 1995)

Pereaksi Lieberman-Burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi triterpenoid menghasilkan warna violet (Harborne, 1987). Bawa (2009) menyebutkan bahwa isolat golongan senyawa triterpenoid dengan pereaksi

Lieberman-Burchard yaitu akan terjadi perubahan warna yang spesifik dari warna hijau tua (warna isolat) menjadi warna ungu tua.

Identifikasi ekstrak daun mimba dan fraksi n-heksana ekstrak etanol daun mimba dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan adalah silikagel G₆₀ F₂₅₄ dan fase gerak campuran toluen dan etil asetat dengan perbandingan (93:7). Bercak terpenoid ekstrak etanolik daun mimba terdeteksi dengan nilai R_f pada 0.19 ; 0.40 ; 0.85 ; 0.98. Pada fraksi n-heksana ekstrak etanolik daun mimba, bercak terpenoidnya terdeteksi dengan nilai R_f sebesar 0.40 ; 0.58 ; 0.82 ; 0.98 (Djarmiko, 2009).

Rumandong, *et al.*, (2013) dalam penelitiannya isolasi, identifikasi dan uji antibakteri senyawa triterpenoid dari ekstrak n-heksana daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). Uji KLT pertama kali dilakukan pada ekstrak daun tempuyung dengan eluen kloroform : n-heksana dan didapatkan 6 fraksi dengan fraksi terbaik yaitu fraksi 6 yang selanjutnya dipisahkan lebih lanjut dengan KLT preparatif. Hasil KLT preparatif dengan fase diam silika gel₂₅₄ dengan fase gerak kloroform menghasilkan 3 pita. Ketiga pita dikerok dan dilarutkan dengan n-heksana. Pengujian triterpenoid menggunakan LB, hasil yang menunjukkan adanya senyawa triperpenoid adalah pita kedua yang berwarna merah. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian dengan KLT menggunakan berbagai campuran eluen yang berbeda diklorometan : kloroform (1:1), kloroform : n-heksana : diklorometan (3:1:2) dan benzena : diklorometana (1:3). Hasil akhir didapatkan isolat triterpenoid sebanyak 0,4026 gram.

Sukadana, *et al.*, (2008) menyatakan dalam penelitiannya hasil maserasi 500 g serbuk kering biji pepaya menggunakan pelarut *n*-heksana menghasilkan 21,66 g ekstrak kental *n*-heksana menggunakan kromatografi kolom (silika gel 60, *n*-heksana : eter : etilasetat : etanol (2:3:3:2) menghasilkan 127 eluat dan setelah diuji triterpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan reaksi positif untuk triterpenoid dengan perubahan warna dari kuning menjadi merah ungu. Pemisahan dengan kromatografi kolom terhadap ekstrak kental *n*-heksana menghasilkan 0,05 g isolat yang menunjukkan positif untuk triterpenoid (F3) yang berwarna kuning.

Halimah (2010) menyatakan bahwa untuk identifikasi golongan teriterpenoid dalam ekstrak etanol dan *n*-heksana tanaman anting-anting menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (2:8) dengan pereaksi penyemprompt reagen Liebermann Burchard menunjukkan 7 noda pada ekstrak etanol dan 3 noda pada ekstrak *n*-heksana di bawah sinar UV 366 nm. Noda yang diasumsikan sebagai golongan triterpenoid adalah noda ke-2, 5, 6, dan 7 untuk ekstrak etanol menunjukkan warna merah keunguan, coklat, merah keunguan dan kecoklatan dengan nilai R_f berurutan 0,39; 0,79; 0,80; dan 0,87. Sedangkan noda 2 dan 3 hasil ekstrak *n*-heksana ini menunjukkan warna merah keunguan dan kecoklatan dengan nilai R_f 0,36 dan 0,82.

Zahro (2006) dalam penelitiannya identifikasi senyawa katif triterpenoid ekstrak *n*-heksana tanaman anting-anting menyatakan bahwa Pemisahan senyawa triterpenoid dari ekstrak kasar dilakukan dengan KLT analitik untuk mencari eluen terbaik dengan variasi eluen yaitu *n*-heksana : kloroform (1:1), *n*-heksana :

etil asetat (1:1), n-heksana : aseton (7:3), n-heksana : kloroform (2:1), metanol : kloroform (7:3), metanol : kloroform (5:2), metanol : kloroform (1:2), n-heksana : diklorometana (1:9), n-heksana : etil asetat (12:1) dan n-heksana : etil asetat (7:3). Hasil KLTA menunjukkan bahwa eluen n-heksana : etil asetat (7:3) (I) dan n-heksana : kloroform (1:1) (II) menghasilkan 8 noda dengan kisaran harga R_f 0,33-0,87 (I) dan 0,16-0,98 (II). Hasil identifikasi menggunakan reagen Liebermann-Burchard menghasilkan warna merah keunguan yang mengindikasikan bahwa ekstrak n-heksana mengandung senyawa triterpenoid.

2.7 Analisis Probit

Analisis dengan model probit merupakan kependekan dari *Probability Unit*, yaitu model peluang tertua yang pertama kali diperkenalkan oleh Bliss. Selanjutnya model ini dikembangkan dan dipelajari oleh Finney pada tahun 1977. Penggunaan analisis regresi probit sejauh ini sering digunakan untuk menguji daya racun suatu jenis pestisida terhadap hama atau penyakit, sehingga bermanfaat untuk menentukan tingkat dosis terhadap persentase kematian hama yang diinginkan (Setyawati, 1999 dalam Khumaidah, 2000). Analisis data uji toksisitas dengan metode BSLT biasanya dilakukan dengan analisis probit untuk menghitung nilai LC_{50} (Lenny, 2006).

Minitab merupakan salah satu program aplikasi statistika yang banyak digunakan untuk mempermudah pengolahan data statistik. Minitab menyediakan beberapa pengolahan data untuk melakukan analisis regresi, membuat ANOVA, membuat alat-alat pengendalian statistika, membuat design eksperimen (*factorial*,

respon surface dan *Taguchi*), membuat peramalan dengan analisis reabilitas, dan analisis multivariate, serta menganalisis data kualitatif menggunakan *cross tabulation*. Keuntungan minitab adalah dapat digunakan dalam pengolahan data statistik untuk tujuan sosial maupun teknik. Program minitab bila dibandingkan dengan program statistika lainnya, maka minitab telah diakui sebagai program statistika yang sangat kuat dengan tingkat akurasi taksiran statistik yang tinggi (Irawan dan Astuti, 2006).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dengan judul Identifikasi Senyawa Aktif dan Uji Sitotoksitas Ekstrak Daun Widuri (*Calotropis gigantea*. L) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Juli 2014 dan bertempat di Laboratorium Kimia Analitik, Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

3.2.1.1 Analisis Kadar Air

Alat-alat yang digunakan dalam analisis kadar air antara lain adalah, oven, loyang, cawan penguap, desikator, neraca analitik dan kayu penjepit.

3.2.1.2 Preparasi Sampel

Alat-alat yang digunakan proses preparasi sampel diantaranya blender, gunting, dan ayakan ≥ 60 mesh.

3.2.1.3 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Maserasi

Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi senyawa aktif dengan maserasi diantaranya neraca analitik, kaca arloji, erlenmeyer 500 mL, *aluminium foil*, *shaker*, gelas ukur 100 mL, *beaker glass* 100 mL, kertas saring, penyaring *buchner*, *rotary evaporator*, erlenmeyer 500 mL, botol vial, dan desikator.

3.2.1.4 Uji Sitotoksik dengan BSLT

Alat-alat yang digunakan untuk uji sitotoksik dengan BSLT diantaranya botol vial, spatula, tempat penetetasan larva udang neraca analitik, *beaker glass* 50 mL, mikropipet ukuran 0,5 – 100 μ L, pipet tetes, *aerator*, lampu dan labu ukur 10 mL.

3.2.1.5 Uji Senyawa Aktif

Alat-alat yang digunakan untuk uji fitokimia diantaranya tabung reaksi, bola hisap, rak tabung reaksi, pipet tetes, penjepit kayu, *vortex* dan pipet ukur 5 mL.

3.2.1.6 Pemisahan Ekstrak Aktif dengan KLT

Alat-alat untuk pemisahan ekstrak aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan plat silika gel F₂₅₄, bejana pengembang dan lampu UV.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Ekstraksi Seyawa Aktif dengan Maserasi

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian daun tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.), pelarut n-heksana, kloroform dan etanol 80 %.

3.2.2.2 Uji Sitotoksik dengan BSLT

Bahan-bahan yang digunakan dalam uji sitotoksik dengan BSLT diantaranya larva udang *Artemia salina*. Larva udang *Artemia Salina* L., NaCl, larutan ragi roti, dan aquades.

3.3.2.3 Uji Senyawa Aktif

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji fitokimia diantaranya aquades, larutan HCl 2 %, larutan metanol 50 %, logam Mg, larutan FeCl₃, larutan gelatin, reagen Dragendroff, reagen Meyer, pereaksi Lieberman Burchard, larutan H₂SO₄ pekat, larutan formaldehid 3 %, dan Na-asetat.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel diambil dari daun tanaman widuri (*Calotropis gigantea* L.), dengan langkah awal sampel dicuci untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada sampel, kemudian ditiriskan dan dipotong kecil-kecil. Tahapan penelitian yang pertama adalah analisis kadar air. Sebanyak 5 g daun widuri segar diambil untuk dianalisa kadar airnya. Kemudian sampel tersebut diserbukkan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan ≥ 60 mesh.

Tahapan penelitian yang kedua adalah diambil 60 g sampel untuk diekstraksi dengan menggunakan 3 pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu n-heksana, kloroform dan etanol 80 %. Ekstraksi pertama dengan merendam 60 g sampel ke dalam pelarut n-heksana 300 mL selama 24 jam, kemudian *dishaker* selama 3 jam. Setelah itu disaring untuk memisahkan antara filtrat dan ampasnya, selanjutnya ampas dikeringkan dari pelarut n-heksana serta dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan perlakuan yang sama. Ampas yang telah kering direndam dan

diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform kemudian etanol 80 %, dan masing-masing pelarut dilakukan 3 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama.

Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat pada masing-masing pelarut. Kemudian masing-masing ekstrak diuji sitotoksiknya untuk mengetahui tingkat kematian larva udang *Artemia salina* L. melalui nilai LC_{50} dan uji ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali untuk masing-masing ekstrak. Konsentrasi yang digunakan untuk uji sitotoksitas ini adalah 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm, dan 0,7812 ppm, 0,3906 ppm, dan 0,193 ppm. Serta 0 ppm untuk kontrol negatifnya (Morshed, *et al.*, 2012).

Tahap penelitian yang selanjutnya adalah uji fitokimia menggunakan ekstrak yang mempunyai nilai bioaktivitas paling tinggi (nilai LC_{50} paling rendah), untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terkandung di dalamnya. Pengujian dengan reagen ini meliputi golongan senyawa alkaloid dengan reagen Dragendorff dan Meyer, flavonoid dengan logam Mg dan larutan HCl pekat, saponin dengan larutan HCl 1 N, triterpenoid/steroid dengan reagen Liebermann Burcahard, dan tanin dengan larutan gelatin serta $FeCl_3$.

Pengujian yang selanjutnya dilakukan dengan KLT berdasarkan kandungan golongan senyawa yang positif dari hasil uji reagen, untuk mendukung hasil identifikasi adanya kandungan golongan senyawanya. Uji KLT ini menggunakan plat silika gel F₂₅₄ yang disinari di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

3.4 Tahapan Penelitian

Beberapa tahapan dalam pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air
3. Ekstraksi komponen aktif dengan maserasi
4. Uji sitotoksik dengan larva udang *Artemia salina* Leach
5. Uji senyawa aktif dengan uji reagen
6. Pemisahan senyawa aktif dengan KLT

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Sampel daun tanaman widuri diambil bagian daunnya, kemudian dicuci bersih dan dikeringanginkan. Selanjutnya sampel dipotong kecil-kecil dengan gunting dan dikeringkan dengan oven pada suhu 30–37 °C selama 1–2 jam. Kemudian sampel kering dihaluskan dengan blender sampai berbentuk serbuk dan diayak dengan ayakan 60 mesh. Kemudian hasil serbuk daun widuri yang diperoleh ini digunakan sebagai sampel pada proses ekstraksi senyawa aktif dengan metode maserasi.

3.5.2 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan dengan metode gravimetri yaitu dengan cara pemanasan. Analisis ini dilakukan menggunakan sampel kering dengan pengulangan sebanyak 3 kali.

Analisis kadar air dengan sampel daun widuri kering dilakukan dengan cara memanaskan cawan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100-105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan didinginkan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel daun dipotong kecil-kecil, kemudian dimasukkan ke dalam cawan yang telah ditimbang.

Sampel ditimbang 5 g, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 30-37 °C selama sekitar 30 menit. Sampel kering didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven \pm 30 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan.

Kadar air dihitung dengan persamaan :

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

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots (3.2)$$

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif dengan Maserasi

Serbuk daun widuri ditimbang sebanyak 60 g, kemudian diekstraksi maserasi dengan cara direndam menggunakan 300 mL pelarut n-heksana selama 24 jam dan *dishaker* selama 3 jam untuk membantu pengadukan. Maserasi dilakukan seperti perlakuan tersebut diatas sampai diperoleh filtrat berwarna pucat. Selanjutnya disaring dan ampasnya dikeringanginkan di dalam lemari asam agar terbebas dari pelarut n-heksana.

Ampas yang telah kering, selanjutnya dimaserasi kembali menggunakan 300 mL pelarut kloroform selama 24 jam dan *dishaker* selama 3 jam. Maserasi dilakukan seperti perlakuan tersebut diatas sampai diperoleh filtrat berwarna pucat. Setelah diperoleh filtrat dengan warna pucat, dilakukan penyaringan dan ampasnya dikeringanginkan di dalam lemari asam agar terbebas dari pelarut kloroform.

Ampas yang telah kering dimaserasi kembali menggunakan 300 mL pelarut etanol selama 24 jam. Pengadukannya dibantu dengan *shaker* selama 3 jam. Perlakuan tersebut diatas dilakukan pengulangan sampai diperoleh filtrat berwarna pucat. setelah warna filtratnya menjadi pucat kemudian disaring dan ampasnya dikeringanginkan di dalam lemari asam agar terbebas dari pelarut etanol.

Ketiga filtrat yang diperoleh, dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai ekstrak tidak menetes lagi, sehingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana, kloroform etanol 80%, kemudian dialiri dengan gas N₂ untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa pada filtrat. Ketiga ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya

dihitung rendemennya kemudian diuji sitotoksitasnya menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach dan dilakukan uji fitokimia dengan menggunakan reagen dan KLT terhadap ekstrak yang memiliki bioaktivitas tertinggi dengan nilai LC₅₀ terkecil dari hasil uji sitotoksitas.

Rendemen dari masing-masing ekstrak dapat dihitung dengan rumus berikut (Harborne, 1987) :

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{a}{b} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.3)$$

Keterangan :

a = berat ekstrak (g)

b = berat contoh awal (g)

3.5.4 Uji Sitotoksitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

3.5.4.1 Penetasan Telur

Penyiapan larva *Artemia salina* dilakukan dengan menetasakan telurnya sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan selama \pm 48 jam dengan cara merendam 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach dalam air laut sebanyak 250 mL air laut dengan menerangi bagian wadah yang tidak ditempati telur udang dengan sinar lampu pijar/neon 40-60 watt agar suhu penetasan 25-30 °C tetap terjaga.

3.5.4.2 Uji Sitotoksitas

Perlakuan untuk uji sitotoksitas dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing ekstrak sampel. Disiapkan beberapa botol untuk pengujian, yaitu 30 botol untuk masing-masing ekstrak sampel dan 3 botol untuk kontrol. Ekstrak kental etanol, kloroform dan n-heksana ditimbang sebanyak 10

mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL untuk membuat larutan stok 1000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet masing-masing sebanyak 1 mL; 0,5 mL; 0,25 mL; 0,125 mL; 0,0625 mL; 0,03125 mL; 0,015625 mL; 0,0078 mL; 0,003906 mL; dan 0,00193 mL. sehingga konsentrasinya menjadi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm, 0,78 ppm, 0,3906 ppm, dan 0,1953 ppm. Kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Selanjutnya masing-masing ekstrak sebanyak 2 mg kedalam *beaker glass* 100 mL dan ditambahkan dimetil sulfoksida sebanyak 100 μ L, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok hingga homogen. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach.

Kontrol dibuat dengan dimasukkan 100 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach (Morshed *et al.*, 2012). Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai LC_{50} dengan analisis probit. Ekstrak yang memiliki tingkat sitotoksik yang paling tinggi (nilai LC_{50} paling rendah), kemudian dilakukan fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Sehingga dapat dipisahkan menggunakan metode KLT Analitik.

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah total larva awal}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.4)$$

3.5.5 Uji Fitokimia dengan Uji Reagen

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat daun yang memiliki sitotoksitas tertinggi, kemudian dilarutkan dengan sedikit masing-masing dari pelarutnya. Setelah itu dilakukan uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan triterpenoid/steroid (Indrayani dkk., 2006).

3.5.5.1 Uji Alkaloid

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik tertinggi diambil sebanyak 2 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 0,5 mL tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 0,5 mL tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

3.5.5.2 Uji Flavonoid

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik tertinggi di ambil sebanyak 2 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu ditambah logam Mg dan 0,5 mL tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid.

3.5.5.3 Uji Saponin

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik tertinggi di ambil sebanyak 2 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa

yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit, jika busa yang terbentuk tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin.

3.5.5.4 Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik tertinggi di ambil sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

3.5.5.5 Uji Tanin

3.5.5.5.1 Uji dengan FeCl₃

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik yang paling tinggi diambil sebanyak 2 mg kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta, maka bahan tersebut mengandung tanin.

3.5.5.5.2 Uji dengan Larutan Gelatin

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik yang paling tinggi diambil sebanyak 2 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin.

3.5.5.5.3 Uji Tanin Katekol dan Tanin Galat

Ekstrak daun widuri yang memiliki tingkat sitotoksik yang paling tinggi diambil sebanyak 2 mg dan ditambahkan dengan larutan formaldehid 3 %: asam

klorida pekat (2:1) dan dipanaskan dalam air panas dengan suhu 90 °C. Jika terbentuk endapan merah, menunjukkan adanya tanin katekol. Filtrat dijenuhkan dengan Na-asetat dan ditambahkan larutan FeCl₃ 1 %. Jika terbentuk warna biru tinta/hitam, menunjukkan adanya tanin galat.

3.5.5 Uji Fitokimia dengan KLT

Uji fitokimia dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen. Proses kromatografi lapis tipis ini meliputi beberapa tahapan, yaitu: *pertama*, aktivasi plat KLT yang dilakukan dengan cara pemanasan dalam oven pada suhu 60-70 °C selama 10 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat. *Kedua*, persiapan plat, masing-masing plat dengan ukuran 1x10 cm. Pemotongan dilakukan dengan cara membalik plat, kemudian diukur dan diberitanda menggunakan pensil, selanjutnya dipotong menggunakan *cutter* yang tajam.

Ketiga, penjenuhan eluen. Penjenuhan dilakukan dengan menambahkan kertas saring di dalam chamber agar penguapan yang terjadi di dalam chamber merata sehingga udara di dalam chamber tetap jenuh. Selama penjenuhan, chamber dalam keadaan tertutup rapat dan didiamkan selam 30 menit serta dijaga agar chamber tidak bergeser sehingga dapat mencegah terjadinya ketidakjenuhan pelarut.

Keempat, penotolan. Ekstrak daun widuri sebanyak 0,5 mg dilarutkan dalam 1 mL pelarut kemudian ditotolkan pada jarak \pm 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler, kemudian dikeringkan. Setelah kering ditotolkan kembali ekstrak dan dikeringkan lagi (diulang sampai sebanyak \pm 10 totolan). *Kelima*,

elusi/pengembangan. Plat KLT yang sudah ditotoli dengan ekstrak daun widuri kemudian dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Tepi bagian bawah lempeng tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan kedalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam chamber dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel. Elusi dihentikan setelah fase gerak sampai garis batas. *Keenam*, deteksi bercak. Identifikasi senyawa dilakukan dengan memeriksa noda-noda yang muncul pada permukaan plat menggunakan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Pengembang dan reagen penguji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

1. Golongan Alkaloid

Penentuan golongan senyawa alkaloid dalam beberapa penelitian yang telah dilakukan menggunakan eluen terbaik metanol : asam asetat (3:7) (Meistiani, 2010), campuran pelarut etanol, etil asetat dan n-heksana (1:2:30) dan menghasilkan dua noda berwarna biru dan merah (Titis, *et al.*, 2013). Susilaningih (2007) menggunakan campuran kloroform : n-heksana (2:1) dan diperoleh 1 noda berwarna biru, kloroform : metanol (5:1) dihasilkan 3 noda berwarna merah jingga coklat jingga dan hijau.

2. Golongan Flavonoid

Pada penentuan senyawa golongan flavonoid digunakan eluen BAA (n-butanol–asam asetat–air = 4:1:5) terdapat spot yang berwarna kuning (Zaini, 2006), halimah (2010) menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) didapat 4 noda berwarna biru kehijauan, ungu dan merah kehijauan. Identifikasi dengan fase gerak BAA (9:2:6) menunjukkan adanya 2 noda berwarna lembayung

dan kuning (Royami, 2008), fase gerak etil asetat : asam format : asam asetat : air (100:11:11:27) dengan penampak nodanya uap amoniak (Windriyati, *et al.*, 2010).

3. Golongan Tanin

Pada penentuan golongan senyawa ini digunakan eluen terbaik *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) (Hayati, *et al.*, 2010), (Fitriyani, 2011), eluen butanol : asam asetat : air (14:1:5) dan eluen asam asetat glacial : air :HCl pekat (30:10:3) yang menghasilkan 2 noda berwarna ungu dan ungu kehitaman (Sriwahyuni, 2010), kloroform : etil asetat : asam format (0,5:9,0:0,5) dengan penampak noda FeCl₃ diperoleh warna hitam (Widyowati dan Rahmaan, 2010).

4. Golongan Saponin

Pada penentuan golongan senyawa ini digunakan campuran kloroform-metanol-air (20:60:10) menghasilkan warna ungu-ungu gelap (Kristianingsih, 2005), Wonohadi, *et al.*, (2006) menggunakan campuran kloroform-metanol-air (64:50:10) dengan penampak noda Lieberman Burchard menghasilkan warna biru. *n*-heksana : aseton (4:1) menunjukkan warna merah jambu (Marliana, *et al.*, 2005), (Batubara, 2003) menggunakan eluen kloroform : methanol : akuades dengan konsentrasi (20:60:4).

5. Golongan Steroid

Penentuan golongan ini digunakan campuran *n*-heksana: etil asetat (7:3) (Handayani, *et al.*, 2008), *n*-heksana : etil asetat (7:3), disemprot dengan pereagen Lieberman-Burchard menghasilkan 4 warna hijau terang, hijau kekuningan, hijau, coklat kekuningan (Halimah, 2010). Reveny (2011) dengan eluen heksana:etil

asetat (7:3) terbentuknya noda bewarna hijau, biru ungu sampai coklat, n-heksana : etil asetat : kloroform (5:3:1) (Restari, 2002).

6. Golongan Triterpenoid

Penentuan golongan senyawa ini digunakan campuran toluen dan etil asetat dengan perbandingan (93:7) (Djatkiko, 2009), *n-heksana* : eter : etilasetat : etanol (2:3:3:2) dan adanya perubahan warna isolat dari kuning menjadi merah dengan pereaksi Liebermann-Burchard (Sukadana, *et al.*, 2008). Halimah (2010) menggunakan eluen *n-heksana*:etil asetat (2:8), eluen *n-heksana* : etil asetat (7:3) (I) dan *n-heksana* : kloroform (1:1) (II) menghasilkan warna keunguan dengan pemberian reagen Lieberman-Burchard.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat kematian larva udang *Artemia salina* Leach dapat diketahui dengan melakukan uji LC₅₀ dengan analisis probit dengan tingkat kepercayaan 95 % untuk masing-masing konsentrasi menjadi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm, 0,78 ppm, 0,3906 ppm, 0,193 ppm dan 0 ppm menggunakan program MINITAB 14.

Penggolongan senyawa aktif dapat dilakukan dengan identifikasi hasil uji warna dengan kepekatan warna yang dihasilkan pada masing-masing ekstrak dengan tanda berikut:

1. ++ : terkandung senyawa lebih banyak/warna pekat.
2. + : terkandung senyawa /warna muda.

3. - : tidak terkandung senyawa/tidak terbentuk warna.

Identifikasi kemurnian senyawa aktif dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji KLT dari pengukuran jarak migrasi dan bentuk bercak noda senyawa pada dua fasa yang berbeda menggunakan parameter harga R_f .



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan untuk mengetahui kandungan air yang terkandung dalam sampel. Prinsipnya adalah penghilangan air yang terkandung dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu di atas titik didih air yaitu 100–105 °C hingga diperoleh berat konstan sampel (Winarno, 2002).

Analisis kadar air dilakukan dengan memanaskan cawan pada suhu 100-105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan kandungan air pada cawan, kemudian diletakkan dalam desikator selama kurang lebih 10 menit dan ditimbang beratnya. Perlakuan ini dilakukan berulang kali hingga beratnya konstan. Sampel daun widuri ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya kemudian dikeringkan sampel di dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan kadar airnya kemudian sampel disimpan dalam desikator selama 15 menit. Sampel tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat konstan. Selisih berat sampel sebelum dan sesudah pengeringan menunjukkan banyaknya air yang telah diuapkan. Dari hasil perhitungan pada lampiran 4 diperoleh kadar air sampel daun widuri (*Calotropis gigantea L.*) kering sebesar 4,116 %.

Kadar air daun widuri yang didapatkan relatif kecil, hal ini dikarenakan sampel telah dikeringkan selama 5-7 hari, sehingga kandungan air yang terdapat pada sampel berkurang. Bila kadar air yang terkandung kurang dari 10 % maka

kestabilan optimum bahan akan dapat tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi (Puspita, 2009). Menurut Kumala (2007) semakin sedikit kadar air yang terkandung dalam sampel, maka semakin mudah pelarut mengekstrak komponen senyawa aktif dalam sampel, sehingga akan didapatkan hasil ekstrak yang lebih besar. Selain itu, rendahnya kadar air sampel juga mempercepat proses pemekatan ekstrak.

4.2 Preparasi Sampel

Preparasi sampel meliputi pencucian, pengeringan dan penghalusan sampel. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan pengotor berupa getah yang terdapat pada sampel daun widuri. Selanjutnya daun widuri dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Proses pengeringan sampel dilakukan pada suhu 30-37 °C bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada sampel, mencegah terjadinya reaksi enzimatik dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama serta tidak merubah komponen senyawa yang terkandung dalam sampel.

Penghalusan sampel dilakukan dengan menggunakan mesin penggiling dengan ayakan ukuran 40-60 mesh. Pengayakan dilakukan untuk menyamakan ukuran partikel sampel. Pada ukuran tersebut, dinding sel mulai terbuka sehingga memaksimalkan kontak antara pelarut dan sampel pada saat maserasi, serta senyawa dalam sampel yang terekstrak akan lebih maksimal (Kumala, 2007).

4.3 Ekstraksi Komponen Aktif Daun Widuri (*Calotropis gigantea. L*)

Ekstraksi maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan jalan membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut (Kristanti, *et al.*, 2008).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi maserasi bertingkat dengan menggunakan variasi pelarut n-heksana, kloroform dan etanol. Metode ini bertujuan untuk mengekstrak kandungan senyawa aktif dalam sampel berdasarkan kepolarannya. Sifat kelarutan zat didasarkan pada teori *like dissolves like*, dimana zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan zat yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar (Khopkar, 2003). Dalam penelitian ini diharapkan senyawa-senyawa non polar yang terkandung dalam sampel akan terekstrak dalam pelarut n-heksana, untuk senyawa-senyawa semi polar diharapkan terekstrak dalam pelarut kloroform dan senyawa-senyawa polar akan terekstrak pada pelarut etanol.

Sampel serbuk daun widuri di timbang sebanyak 60 g, selanjutnya dimaserasi dengan pelarut n-heksana sebanyak 300 mL selama 24 jam. Pemilihan pelarut ini diharapkan senyawa aktif dalam sampel yang bersifat non-polar dapat terekstrak sempurna. Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* berkecepatan 120 rpm selama 3 jam supaya ekstrak lebih homogen serta mampu mengekstrak lebih banyak senyawa aktif dalam sampel. Baraja (2008) menyatakan bahwa pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi antara di dalam dan di luar sel. Setelah dimaserasi selama 24 jam, kemudian ekstrak disaring menggunakan *corong buchner* dan kertas

saring. Adapun prinsip penyaringan dengan *corong buchner* adalah penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan pada kertas saring (Vogel, 1978).

Ampas hasil penyaringan yang terakhir selanjutnya dikeringanginkan di dalam lemari asam untuk menghilangkan pelarutnya, kemudian dimaserasi kembali menggunakan pelarut kloroform sampai diperoleh filtrat berwarna bening. Begitu juga untuk pelarut etanol dilakukan perlakuan yang sama seperti maserasi menggunakan pelarut n-heksana. Hasil maserasi dari masing-masing pelarut menghasilkan warna ekstrak yang berbeda, untuk ekstrak n-heksana berwarna coklat kekuningan, untuk ekstrak kloroform berwarna hijau kehitaman, sedangkan untuk ekstrak etanol didapatkan ekstrak berwarna coklat.

Filtrat masing-masing pelarut yang diperoleh dari proses maserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vaccum* hingga didapatkan ekstrak pekat sampel. Prinsip kerja *rotary evaporator vaccum* adalah penurunan tekanan dan dipercepatnya perputaran labu alas bulat sehingga pelarut akan menguap 5-10 °C dibawah titik didih pelarut (Vogel, 1978). Berikut rendemen ekstrak pekat masing-masing pelarut yang diperoleh dari hasil maserasi:

Tabel 4.1 Rendemen hasil maserasi masing-masing pelarut

Ekstrak	Jumlah sampel	Volume pelarut	Rendemen
n-heksana	60,001 g	900 mL	1,737 % b/b
Kloroform	60,001 g	1500 mL	6,454 % b/b
Etanol	60,001 g	900 mL	9,569 % b/b

Hasil rendemen yang tertinggi diperoleh dari hasil maserasi daun widuri menggunakan pelarut polar etanol yaitu sebesar 9.569 %. Usman, *et al.*, (2012)

telah melakukan ekstraksi daun widuri dengan pelarut petrolium eter, kloroform, etil asetat, n-butanol dan etanol didapatkan hasil rendemen tertinggi pada pelarut etanol sebesar 2,45 % . Pelarut polar dapat melarutkan hampir semua senyawa baik yang bersifat polar, semi polar maupun yang non polar (Harbone, 1996). Akibatnya senyawa metabolit sekunder lebih banyak terekstrak pada pelarut polar. Hasil ekstrak pekat masing-masing pelarut yang diperoleh selanjutnya digunakan dalam uji BSLT, uji fitokimia dengan reagen dan Kromatografi Lapis Tipis.

4.4 Uji Sitotoksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Uji BSLT dengan menggunakan *Artemia salina* merupakan salah satu metode skrining awal untuk menentukan kemampuan sitotoksisitas suatu senyawa atau ekstrak. Prinsip metode ini adalah uji sitotoksisitas (kematian) larva udang *Artemia salina* L. terhadap ekstrak sampel yang digunakan dengan penentuan nilai LC_{50} setelah pemaparan selama 24 jam. Menurut McLaughin, *et al.*, (1991) *Artemia salina* L. dapat digunakan sebagai hewan uji karena organisme ini dapat bereaksi pada dosis rendah sedangkan senyawa bioaktif dalam dosis rendah berfungsi dalam bidang farmakologi dan bersifat racun dalam dosis tinggi. Daya toksisitas suatu senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *A.salina* dengan parameter *Lethal Concentration 50* (LC_{50}). Lisdawati (2002) menyatakan bahwa semakin kecil nilai LC_{50} suatu tanaman semakin bersifat toksik dan memiliki bioaktivitas semakin tinggi.

Pada penelitian ini, uji BSLT dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Botol vial disiapkan untuk tempat pengujian masing-masing ekstrak n-heksana, kloroform dan etanol. Untuk masing-masing konsentrasi dibutuhkan 3 botol untuk

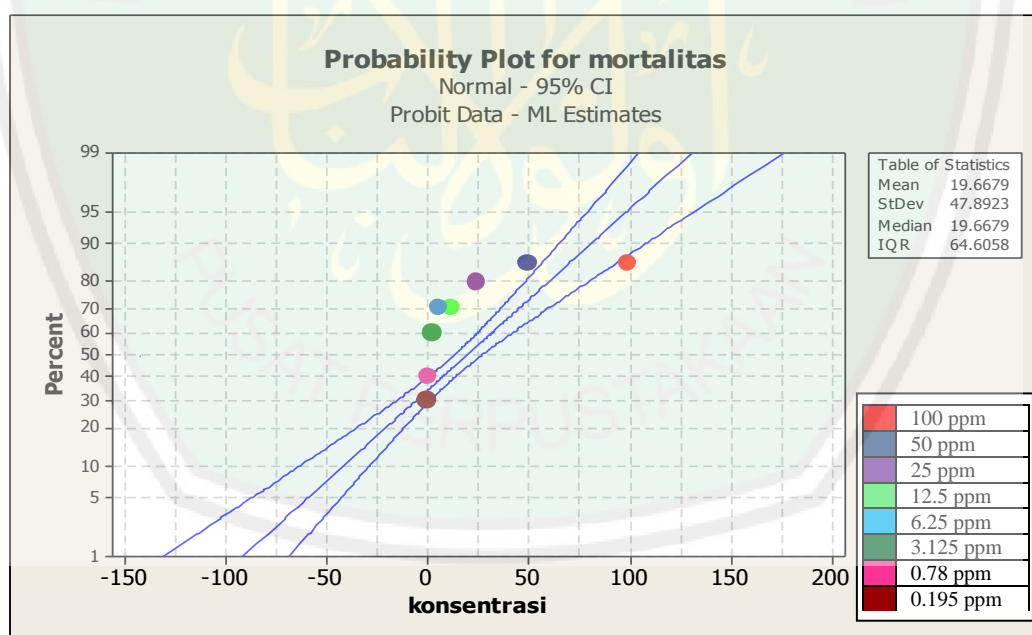
uji dan 3 botol sebagai kontrol. Adapun kontrol dibuat 3 yakni kontrol air laut, DMSO dan pelarut. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh penambahan air laut, DMSO ataupun pelarut terhadap uji sitotoksisitas ekstrak daun widuri. Fase *Artemia salina* yang digunakan adalah *nauplius* (berumur 48 jam), karena pada keadaan ini larva udang berada pada keadaan paling peka dimana organ-organ tubuhnya sudah terbentuk lengkap, dengan kata lain *Artemia salina* berada pada fase paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Panjaitan, 2011).

Ekstrak kental etanol, kloroform dan n-heksana ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL untuk membuat larutan stok 1000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet masing-masing sebanyak 1 mL; 0,5 mL; 0,25 mL; 0,125 mL; 0,0625 mL; 0,03125 mL; 0,015625 mL; 0,0078 mL; 0,003906 mL; dan 0,00193 mL. sehingga konsentrasinya menjadi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm, 0,78 ppm, 0,3906 ppm, dan 0,1953 ppm.

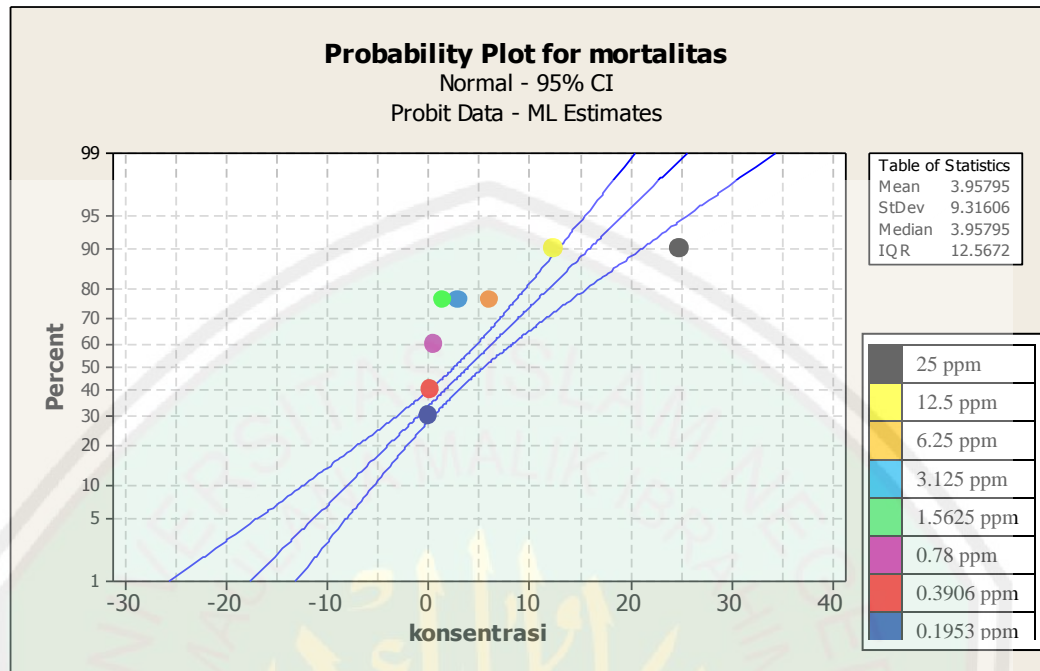
Selanjutnya pelarut masing-masing ekstrak diuapkan sampai kering agar kematian larva hasil uji hanya dipengaruhi oleh sifat toksik ekstrak bukan pengaruh dari pelarut yang digunakan. Setelah itu ditambahkan DMSO sebanyak 100 μ L, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL dan dikocok hingga homogen. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach. Kontrol dibuat dengan cara yang sama, akan tetapi tanpa penambahan ekstrak,

untuk kontrol DMSO hanya ragi roti, air laut dan DMSO. Untuk kontrol air laut hanya campuran ragi roti dan air laut, sedangkan untuk kontrol pelarut ragi roti, air laut dan pelarut masing-masing ekstrak.

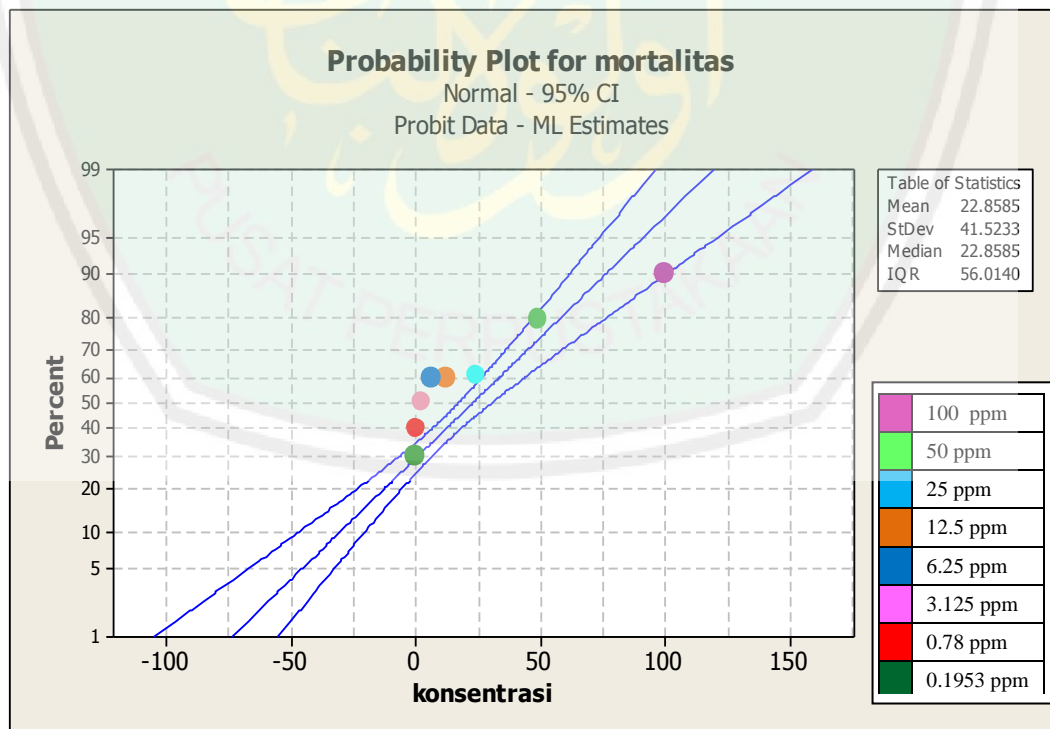
Uji sitotoksisitas dapat dilakukan dengan waktu paparan sehari 24 jam, sehingga nilai LC_{50} yang digunakan pada penelitian ini adalah nilai LC_{50} dari uji penelitian selama 24 jam. Adapun hasil pengujian ketiga ekstrak daun widuri dengan metode BSLT ditunjukkan pada lampiran (6) yang selanjutnya dianalisis probit menggunakan program MINITAB 16 dan disajikan dalam bentuk kurva mortalitas. Kurva mortalitas larva udang seperti pada Gambar 4.1, 4.2, dan 4.3.



Gambar 4.1 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak *n*-heksana dengan nilai LC_{50} 19,667 ppm



Gambar 4.2 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak kloroform dengan nilai LC_{50} 3,95795 ppm



Gambar 4.3 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach ekstrak etanol dengan nilai LC_{50} 22,8585 ppm

Kurva mortalitas merupakan persentase mortalitas (sumbu Y) vs konsentrasi larutan uji dalam satuan ppm (sumbu X). Kurva mortalitas terdiri atas tiga garis, yaitu *lower*, *percentile*, dan *upper*. *Lower* (batas bawah) menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap persentase mortalitas, *percentile* berarti konsentrasi pada setiap persentase mortalitas dan *upper* (batas atas) yang menunjukkan konsentrasi tertinggi pada setiap persentase mortalitas.

Berdasarkan kurva diatas menunjukkan pada setiap kurva hanya terdapat beberapa titik konsentrasi yang muncul. Pada masing-masing kurva terdapat 8 titik konsentrasi yang muncul dari 10 konsentrasi yang digunakan. Hal tersebut disebabkan karena pada konsentrasi 0 ppm (kontrol) tidak terdapat larva yang mati, sedangkan pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati. Pada keadaan tersebut titik konsentrasi pada kurva tidak muncul. Apabila pada konsentrasi tertentu semua larva yang diuji mati atau kematiannya mencapai 100 % dan pada konsentrasi selanjutnya juga sama, maka persen kematiannya akan konstan (data *uniform*).

Berdasarkan kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* masing-masing ekstrak diperoleh nilai LC_{50} yang dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak daun widuri

Ekstrak Pelarut	Nilai LC_{50} (ppm)
n-heksana	19,6679
Kloroform	3,9579
Etanol	22,8585

Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh dari masing-masing ekstrak daun widuri, dapat diketahui bahwa semua ekstrak bersifat toksik terhadap hewan uji

karena memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm (Meyer *et. al.*, 1982). Nilai LC_{50} terbaik ditunjukkan dengan nilai LC_{50} yang terendah yaitu pada ekstrak kloroform dengan nilai LC_{50} 3,9579. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat sitotoksitas dalam ekstrak kloroform lebih tinggi daripada ekstrak n-heksana dan etanol. Bakavathiappan, *et al.*, (2012) melakukan uji toksisitas terhadap daun *Calotropis procera* yang merupakan tanaman sefamili dengan widuri (*Calotropis gigantea*) menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, etil asetat, metanol, aseton dan etanol menyatakan bahwa ekstrak kloroform mempunyai nilai LC_{50} terendah yaitu 2,854 ppm.

Golongan senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman berkaitan dengan aktivitas biologis suatu tanaman. Dalam penelitian ini dugaan sementara kandungan senyawa aktif dalam ekstrak daun widuri adalah senyawa steroid. Jayakumar, *et al.*, (2010) dalam penelitiannya menyatakan adanya kandungan steroid dalam daun widuri. Senyawa steroid merupakan senyawa bioaktif sebagai zat toksik yang dapat masuk melalui membran sel *Artemia salina* secara difusi. Membran sel merupakan lapisan luar sel yang mengatur perpindahan zat ke dalam dan ke luar sel pada organel sel. Masuknya senyawa tersebut dapat merusak permeabilitas membran dan mengganggu proses biokimiawi *Artemia salina* yang menyebabkan *Artemia salina* tidak selektif terhadap paparan yang masuk ke dalam pencernaannya, sehingga apa saja yang masuk dianggap makanannya (Kartikasari, 2010).

4. 6 Uji Fitokimia Kandungan Senyawa Aktif Daun Widuri

Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa metabolit sekunder di dalam tumbuhan. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas yang berfungsi sebagai pelindung tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2006). Prinsipnya adalah reaksi pengujian warna (*spot test*) dan busa dengan suatu pereaksi warna serta pemisahannya (Kristanti, *et al.*, 2006).

Uji fitokimia dalam penelitian ini dilakukan dengan uji reagen pada masing-masing ekstrak daun widuri. Uji fitokimia dilakukan terhadap 6 golongan metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, tanin dan saponin. Hasil uji kandungan golongan senyawa aktif ekstrak n-heksana, kloroform dan etanol daun widuri ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Uji fitokimia masing-masing ekstrak daun widuri (*Calotropis gigaintea* L.)

Golongan senyawa	Ekstrak		
	n-heksana	Kloroform	Etanol
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	-	-	-
Saponin	-	-	-
Triterpenoid	+	-	+
Steroid	-	+++	-
Tanin	-	-	+

Keterangan: +++ = Kandungan senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)

++ = Mengandung senyawa (warna cukup pekat)

+ = Mengandung senyawa (berwarna)

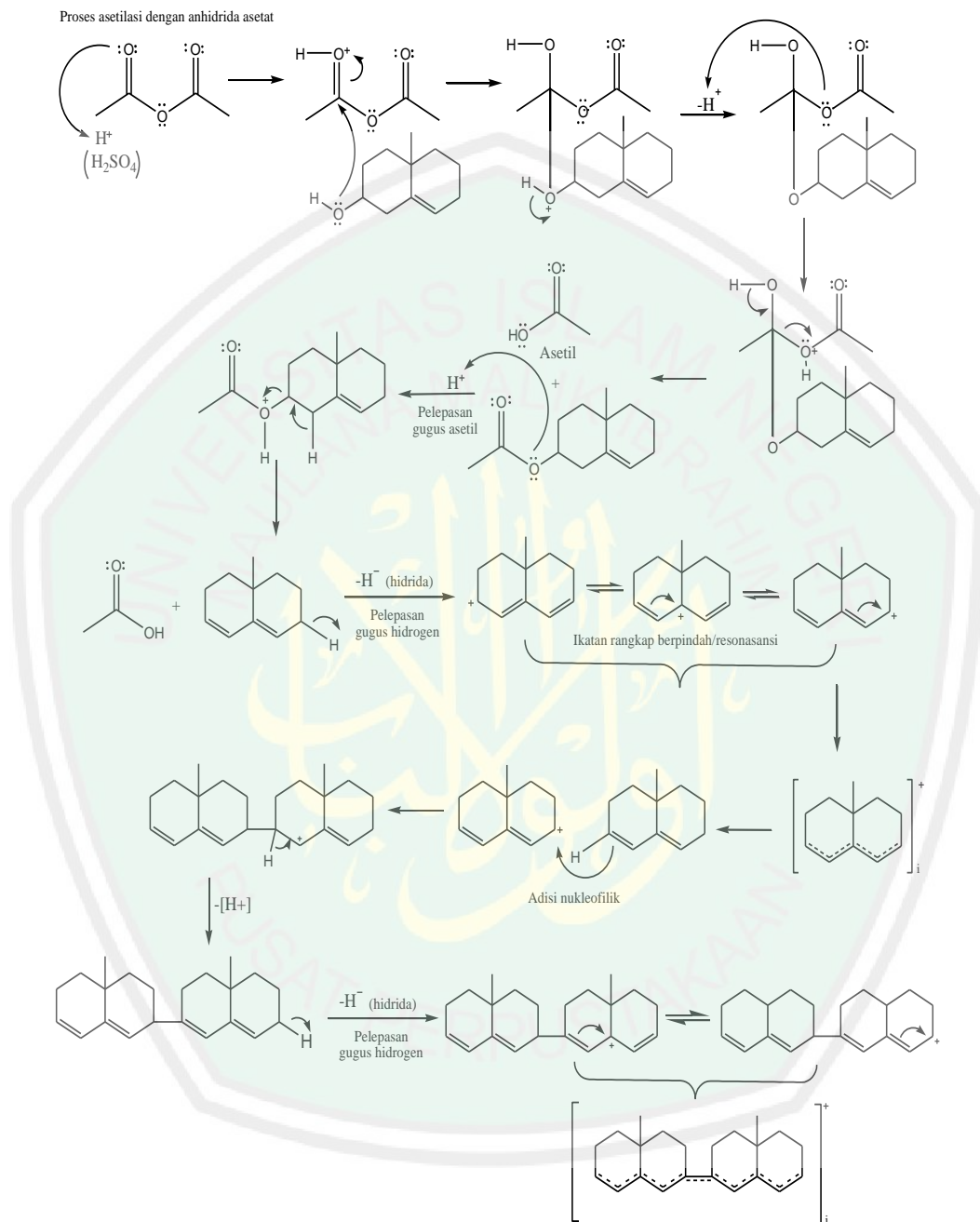
- = Tidak terkandung senyawa

4.6.1 Triterpenoid

Golongan triterpenoid ditunjukkan dengan reaksi terbentuknya cincin kecoklatan ketika senyawa atau ekstrak ditambahkan dengan asam sulfat melalui

dinding tabung reaksi (Robinson, 1995). Hasil uji fitokimia ditunjukkan senyawa triterpenoid terekstrak pada pelarut non polar n-heksana dan pelarut polar etanol. Triterpenoid tersusun dari rantai panjang hidrokarbon C₃₀ yang menyebabkan sifatnya non-polar sehingga mudah terekstrak dalam pelarut yang bersifat non polar (Harborne, 1987). Menurut Robinson (1995) bahwa senyawa triterpenoid dapat diekstrak oleh metanol panas. Metanol bersifat polar yang mempunyai konstanta dielektrium 33.6 D, sedangkan etanol juga pelarut yang bersifat polar yang mempunyai konstanta dielektrium 24.3 D (Sudarmadji, *et al.*, 2003). Berdasarkan selisih yang tidak begitu jauh nilai konstanta dielektrium yang dimiliki kedua pelarut tersebut, maka dapat dikatakan bahwa tingkat kepolarannya juga tidak terlalu jauh. Sehingga triterpenoid juga dapat terekstrak dalam pelarut etanol yang bersifat polar.

Ekstrak dilarutkan dalam kloroform, kemudian ditambahkan 0.5 mL larutan H₂SO₄ melalui dinding tabung. Hasil positif kandungan triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut (Indrayani, *et al.*, 2006). Penambahan kloroform dilakukan untuk melarutkan senyawa triterpenoid dalam sampel. Asam asetat anhidrat akan bereaksi dengan atom O pada gugus -OH yang ada pada senyawa triterpenoid. Reaksi yang terjadi merupakan reaksi esterifikasi, dimana senyawa ester dan asam karboksilat dibentuk oleh senyawa triterpenoid dengan anhidrida asam.



Gambar 4.4 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji terpenoid (Siadi, 2012)

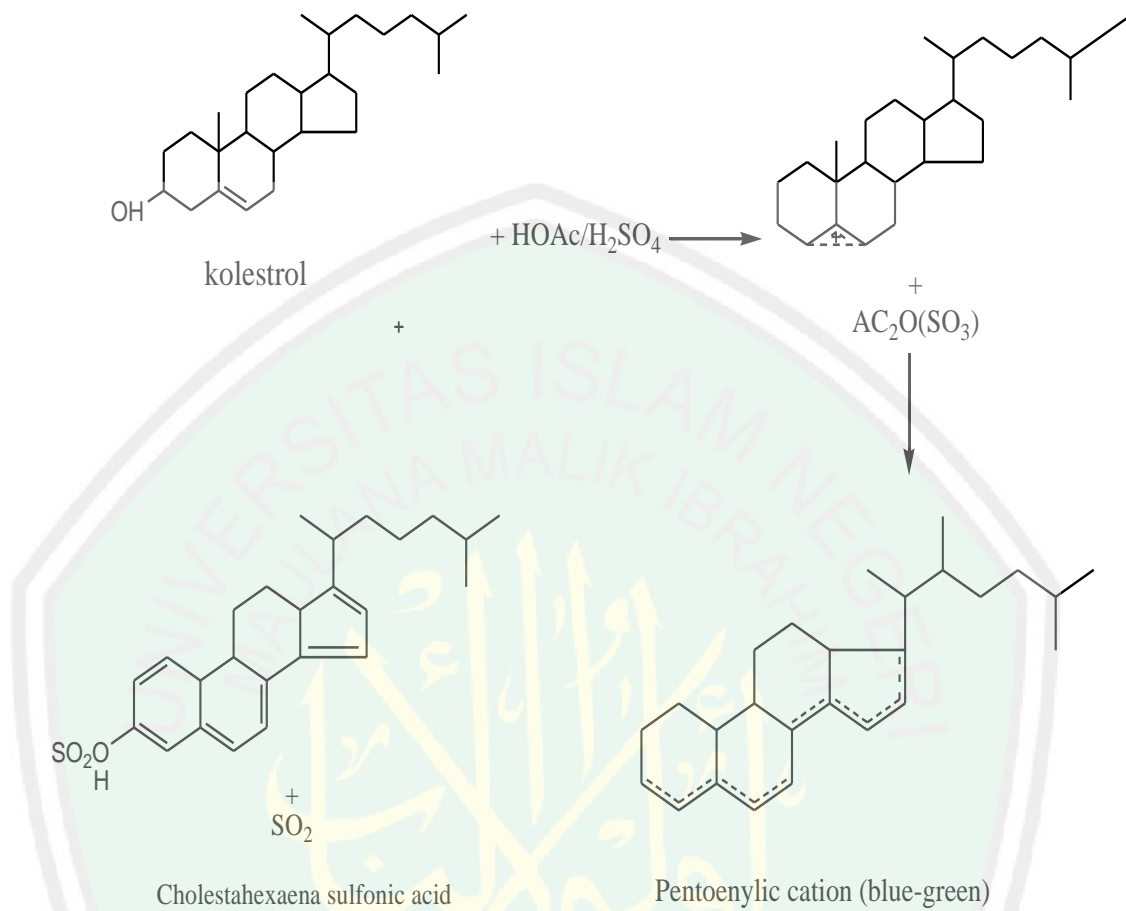
Hasil pengujian kandungan triterpenoid dalam ekstrak etanol menunjukkan bahwa ekstrak etanol positif mengandung senyawa golongan

triterpenoid yang ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut.

Siadi (2012) menjelaskan terbentuknya warna merah-ungu dan cincin kecoklatan pada pengujian senyawa triterpenoid. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan anhidrida asetat. Gugus asetil yang terbentuk pada proses ini merupakan gugus pergi yang baik dan akan lepas, kemudian membentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya yang mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa yang terbentuk mengalami resonansi karbokation. Adanya serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik dengan diikuti pelepasan hidrogen. Akibat pelepasan gugus hidrogen ini, senyawa akan mengalami perpanjangan konjugasi yang akan memunculkan warna pada ekstrak.

4.6.2 Steroid

Penambahan kloroform pada uji steroid untuk melarutkan senyawa steroid yang terkandung dalam ekstrak. Asam asetat anhidrat digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Jika dalam larutan uji terdapat molekul air maka asam asetat anhidrat akan berubah menjadi asam asetat sebelum berjalan dan turunan asetil tidak terbentuk. Senyawa steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam dengan memberikan sejumlah warna (Mukhlisoh, 2010). Perubahan warna ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi pada golongan steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik) (Sriwahyuni, 2010).

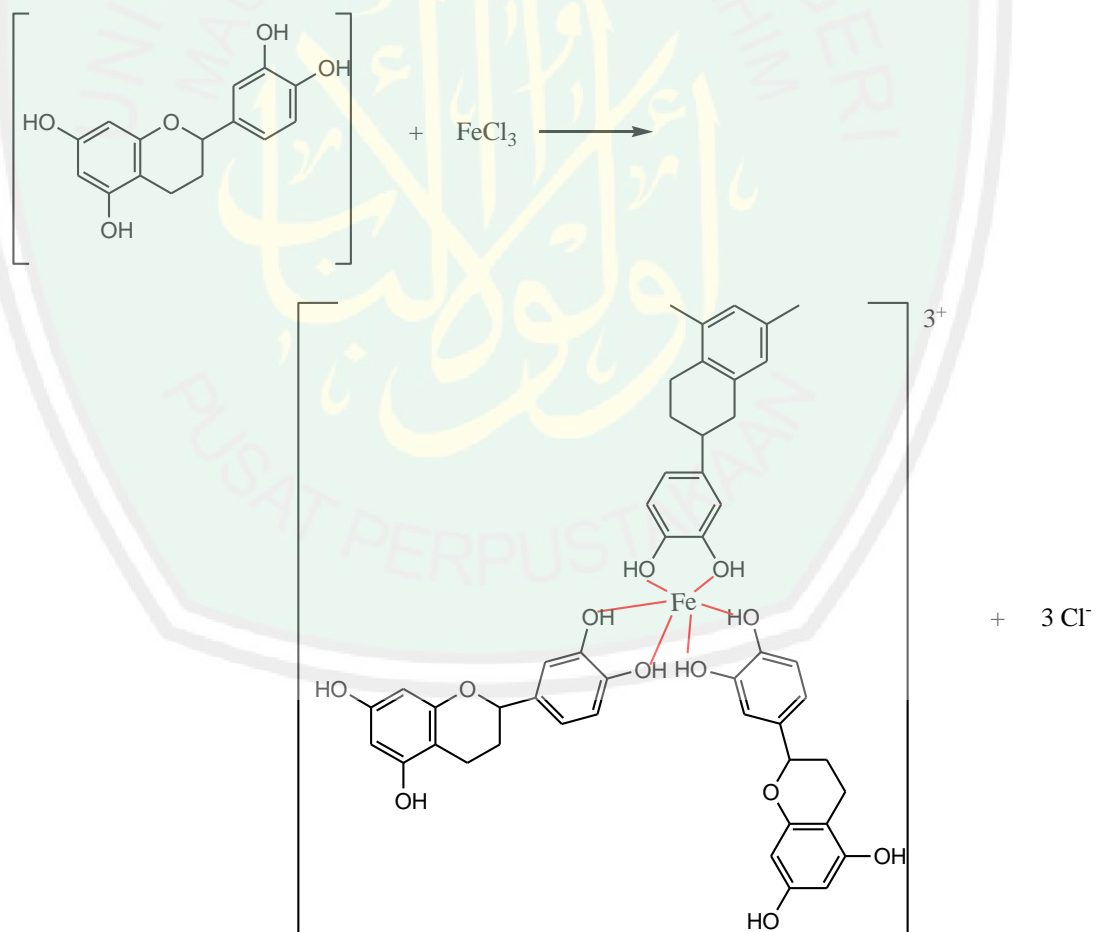


Gambar 4.5 Contoh reaksi suatu steroid (kolesterol) (Burke, 1974)

Uji steroid menunjukkan hasil yang positif pada ekstrak kloroform daun widuri, yaitu dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman. Perubahan warna ini disebabkan adanya penambahan asam sulfat pekat pada dinding tabung reaksi. Hasil uji BSLT menunjukkan ekstrak kloroform mempunyai nilai LC_{50} terendah yaitu 3,9579 ppm yang menunjukkan adanya kandungan senyawa steroid dalam ekstrak bersifat toksik.

4.6.3 Tanin

Uji tanin dilakukan dengan beberapa metode yaitu uji tanin dengan FeCl_3 , uji dengan larutan gelatin, uji tanin katekol dan uji tanin galat. Uji tanin menunjukkan hasil positif menggunakan FeCl_3 pada ekstrak etanol daun widuri. Dengan adanya perubahan warna dari coklat menjadi hijau keruh. Terjadinya perubahan warna hijau ini karena terbentuknya kompleks antara logam Fe dan tanin. Terjadi pembentukan senyawa kompleks karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion atau atom logam dengan atom non logam (Effendy, 2007).



Gambar 4.6 Dugaan reaksi tannin dengan FeCl_3 (Deny, 2007)

4.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT

Kromatografi lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase yakni fase gerak (eluen) dan fase diam (adsorben) yang berbeda tingkat kepolarannya (Sastrohamidjojo, 1991). Fase gerak (eluen) yang digunakan adalah campuran pelarut yang hampir sama kepolarannya dan fase diam berupa plat KLT silika gel F₂₅₄. Pemisahan dikatakan baik apabila menghasilkan komponen senyawa berupa noda yang banyak, noda yang terbentuk bulat tidak berekor, dan pemisahan nodanya jelas (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada penelitian ini, KLT dilakukan terhadap ekstrak yang mempunyai nilai LC₅₀ terbaik (terkecil) dan memiliki kandungan senyawa aktif pada uji fitokimia dengan reagen. Adapun dari hasil penelitian terhadap ekstrak kloroform daun widuri menunjukkan positif mengandung senyawa steroid dan mempunyai nilai LC₅₀ terkecil dari pada ekstrak yang lainnya dengan nilai 3,9579 ppm.

Langkah yang dilakukan untuk identifikasi menggunakan KLT adalah dengan melarutkan sejumlah ekstrak kloroform ke dalam pelarutnya, kemudian ditotolkan pada plat KLT yang sudah diaktifasi menggunakan pipa kapiler 4-8 totolan kemudian dikeringkan menggunakan *hairdryer*. Setelah totolan kering, dilakukan proses elusi dengan memasukkan plat KLT ke dalam gelas pengembang yang telah diisi dengan eluen yang telah dijenuhkan. Hasil pemisahan dengan KLT berupa spot-spot yang selanjutnya dideteksi dengan lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm sebelum disemprot dengan pereaksi Lieberman Buchard maupun sesudahnya.

Penampakan noda pada λ 366 nm terjadi karena noda terlihat terang pada lampu UV λ 366 nm sedangkan silika gel tidak berfluorosensi pada lampu UV λ 366 nm. Timbulnya warna pada noda disebabkan karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat pada aoksokrom yang ada pada noda. Kromofor merupakan senyawa organik yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat menyerap warna sedangkan aoksokrom adalah gugus fungsional yang memiliki elektron bebas yang apabila terikat pada kromofor menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang. Fluorosensi cahaya yang nampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi (Sudjadi, 1988).

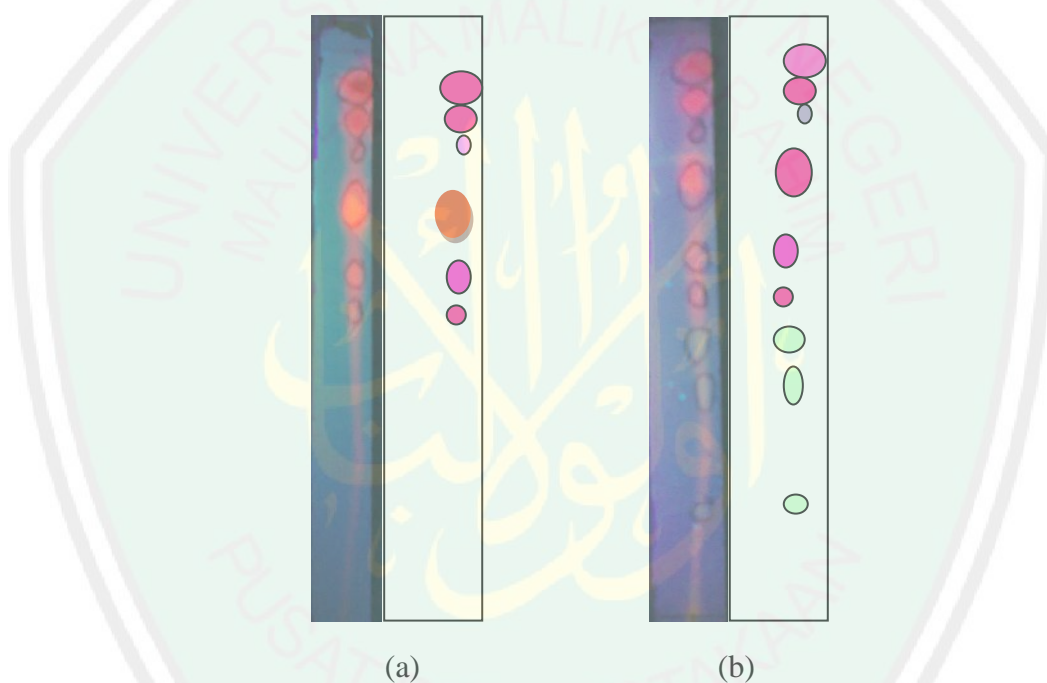
Tabel 4.4 Data penampakan noda senyawa steroid dari hasil pemisahan menggunakan KLT ekstrak kloroform daun widuri pada 5 variasi eluen dengan deteksi lampu UV 366 nm.

Eluen	Jumlah spot yang dihasilkan	Kisaran nilai Rf
n-heksana : etil asetat (3:7)	8 spot	0.32-0.91
n-heksana : etil asetat (8:2)	7 spot	0.06-0.71
n-heksana : etil aetat : kloroform (5:3:1)	7 spot	0.37-0.85
n-heksana : etil asetat (6:4)	9 spot	0.19-0.94
Kloroform : metanol (3:7)	Tidak menghasilkan spot	-

Eluen n-heksana : etil asetat (6:4) menghasilkan spot lebih banyak, sehingga kemungkinan senyawa yang dipisahkan juga lebih banyak. Pemisahan menghasilkan 9 spot tersebut menunjukkan bahwa eluen n-heksana : etil asetat

(6:4) mempunyai kemampuan lebih besar dalam memisahkan golongan senyawa dalam ekstrak.

Hasil pemisahan KLT golongan senyawa aktif steroid ekstrak kloroform daun widuri dengan eluen n-heksana : etil asetat (6:4) menunjukkan adanya 9 spot yang disinari dengan sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dengan reagen penyemprot Liebermann-Burchard.



Gambar 4.7 Hasil KLT senyawa aktif steroid ekstrak kloroform daun widuri dengan eluen n-heksana : etil asetat (6:4):

- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{366 \text{ nm}}$ sebelum disemprot reagen Liebermann-Burchard
- Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada $\lambda_{366 \text{ nm}}$ setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard

Tabel 4.5 Hasil KLT senyawa aktif steroid ekstrak kloroform daun widuri dengan eluen n-heksana : etil asetat (6:4)

No.	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Dugaan senyawa
		Sebelum disemprot reagen Liebermann-Buchard	Setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard	
1	0,19	Tidak berwarna	Hijau	Steroid
2	0,38	Tidak berwarna	Hijau	Steroid
3	0,46	Tidak berwarna	Hijau	Steroid
4	0,54	Merah muda	Merah muda	-
5	0,61	Merah muda	Merah muda	-
6	0,74	Orange	Merah muda	-
7	0,83	Merah muda	Ungu muda	Steroid
8	0,88	Merah muda	Merah muda	-
9	0,94	Merah muda	Merah muda	-

Nilai *Rf* (*Retardation Factor*) atau waktu retensi merupakan nilai yang menunjukkan kecepatan elusi pemisahan suatu senyawa dalam spot/noda. Hasil perhitungan nilai *Rf* yang ditunjukkan pada Tabel 4.5 berada pada jarak antara 0,19-0,94 dengan warna spot yang berbeda. Perbedaan Nilai *Rf* terkait dengan sifat eluen yang digunakan yakni n-heksana : etil asetat (6:4) yang bersifat non polar dan polar. Komposisi n-heksana lebih besar, sehingga eluen cenderung bersifat non polar. Spot dengan nilai *Rf* terkecil (0,19) menunjukkan adanya senyawaan yang bersifat lebih polar, karena dalam keadaan ini noda lebih tertahan kuat pada fase diam yang bersifat polar atau memiliki nilai koefisien distribusi senyawa : $C_{stationer} > C_{mobile}$. Sedangkan spot yang mempunyai nilai *Rf* tertinggi menunjukkan adanya senyawa yang bersifat non polar, karena dalam keadaan ini noda lebih terikat kuat pada fase gerak yang bersifat non polar atau memiliki koefisien distribusi senyawa : $C_{stationer} < C_{mobile}$.

Hasil pemisahan KLT senyawa steroid ekstrak kloroform daun widuri menunjukkan 9 spot, akan tetapi hanya 4 spot yang dapat diasumsikan mengandung golongan senyawa steroid, yaitu pada nilai Rf 0,19; 0,38; 0,46 yang menunjukkan terbentuknya warna hijau dan pada nilai Rf 0,83 yang menunjukkan terbentuknya warna ungu muda. Spot dengan nilai Rf terkecil 0,19 bersifat polar, sedangkan spot yang lainnya dengan nilai Rf 0,38; 0,46 dan 0,38 bersifat semi polar.

Penelitian sebelumnya, (Handayani, *et al.*, 2008) hasil KLT golongan senyawa steroid dengan pereaksi LB menunjukkan noda berwarna hijau. Reveny, (2011) melaporkan hasil KLT steroid menunjukkan 2 bercak berwarna ungu dengan nilai Rf 0,84 dan 0,76. Berdasarkan keterangan tersebut, dapat diasumsikan bahwa hasil KLT steroid ekstrak kloroform daun widuri dalam penelitian ini positif mengandung golongan senyawa aktif steroid.

4.7 Dugaan Mekanisme Senyawa Pada Ekstrak Kloroform Daun Widuri Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Uji fitokimia menunjukkan hasil positif kandungan senyawa aktif dalam daun widuri antara lain triterpenoid, steroid dan tanin. Dari ketiga senyawa tersebut yang mempunyai nilai bioaktivitas tertinggi adalah senyawa steroid. Pernyataan tersebut menunjukkan bahwa steroid mempunyai pengaruh terhadap kematian larva udang *Artemia salina* L. Kematian larva udang disebabkan karena senyawa steroid mampu masuk ke dalam tubuh larva melalui proses difusi dan transpor aktif. Selanjutnya senyawa steroid akan mengakibatkan terjadinya kerusakan pada permeabilitas membran, sehingga dapat mengganggu proses transpor ion dan mengakibatkan terjadinya penurunan produksi ATP (Connel dan

Miller, 1995 dalam Krisyuninda, 2012). Dalam hal ini, senyawa steroid tersebut akan menghambat daya makan dengan cara berperan sebagai racun perut *stomach poisoning*, yaitu sebuah interaksi penyerangan yang dapat membunuh larva udang dengan cara menyerang sistem pencernaannya dan mengakibatkan pencernaan menjadi terganggu.

Selain menyerang alat pencernaan, menurut Nguyen, *et al.*, (1999) dalam Krisyuninda (2012) bahwa senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut *Artemia salina*, sehingga mengakibatkan larva tidak dapat stimulus rasa untuk mengenali makanannya, akibatnya hewan ini akan mati karena kelaparan.

4.5 Tanda-Tanda Kebesaran Allah dalam Daun Widuri (*Calotropis gigantea* L.)

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ
 السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka (QS. Ali Imron : 190-191).

Tafsir Jalalain menjelaskan bahwa surat Ali Imran ayat 190 merupakan suatu gambaran yang menegaskan sekelumit tentang penciptaan Allah SWT di bumi ini yang menjadi bukti atas kebesaranNya. Segala ciptaanNya menunjukkan betapa Maha Sempurna dan Maha Kuasa Allah sebagai *Rabbul 'alamin*. Selanjutnya disebutkan kata "*ulul albab*" yang artinya adalah orang-orang yang mau berfikir akan ciptaan dan kebesaran Allah. Pengertian *ulul albab* diperluas dalam ayat 191 yaitu orang-orang yang selalu mengingat Allah dalam keadaan apapun dengan cara memikirkan kejadian langit dan bumi untuk mensyukuri penciptaan Allah SWT.

Seseorang yang mempunyai sifat *Ulul Albab* mampu menggunakan karunia akal yang telah diberikan oleh Allah SWT untuk merenungi setiap kejadian dan segala yang telah diciptakan di alam semesta ini. *Ulul Albab* adalah profil seorang muslim yang mampu memadukan dua cara dalam proses pemahaman, yaitu berdzikir dan berfikir. Berdzikir sebagai cara memahami dengan hati yang selanjutnya menjadi sumber pengembangan kecerdasan emosional dan spiritual. Berfikir sebagai cara memahami dengan otak yang biasa menjadi pusat pemikiran dan kecerdasan intelektual. Kegiatan berfikir lebih berorientasi pada proses pemikiran pencarian kebenaran akan keagungan Allah SWT yang terdapat dalam setiap ciptaanNya, sehingga dapat mempertebal keimanan kita dengan selalu mengingat Allah SWT. Quraish Shihab (2006) menjelaskan bahwa *ulul albab* adalah orang-orang yang memiliki akal, yang merenungkan tentang fenomena alam raya dan sampai kepada bukti yang nyata tentang keesaan Allah SWT.

Manusia sebagai salah satu makhluk Allah yang diberikan kelebihan akal mempunyai kewajiban untuk memikirkan cara memanfaatkan nikmat-nikmat Allah sebagai bentuk rasa syukur kepada sang Pencipta. Allah memerintahkan kita untuk berfikir lebih jauh dalam memperhatikan ciptaan-ciptaan-Nya. Tujuannya adalah untuk menunjukkan pentingnya mensyukuri nikmat yang telah diberikan oleh Allah, sehingga menjadikan kita lebih tunduk dan patuh atas kebesarannya

Penelitian ini merupakan salah satu upaya untuk mengkaji ciptaan Allah, yaitu untuk mengetahui kemampuan bioaktivitas dalam daun widuri. Tanaman widuri merupakan tanaman liar yang tidak banyak diperhatikan oleh masyarakat, akan tetapi dengan kekuasaan Allah tanaman widuri mampu menyimpan banyak manfaat untuk manusia. Saat ini, sebagian masyarakat memanfaatkan daun widuri sebagai obat-obatan yaitu obat sakit gigi, obat gata-gatal dan obat diare. Sebagaimana dalam penelitian ini, yang menunjukkan adanya kandungan senyawa aktif dalam daun widuri yaitu steroid, triterpenoid dan tanin.

Daun merupakan bagian tumbuhan yang berumur muda karena tumbuh paling akhir setelah akar dan batang dapat tumbuh dengan baik. Akan tetapi, daun mempunyai peran penting dalam berlangsungnya proses hidup tumbuhan. Pada bagian daun terjadi proses fotosintesis, yang merupakan proses penting dalam tumbuhan untuk menghasilkan makanan yang dibutuhkan oleh bagian tanaman yang lain. Pernyataan tersebut dapat diartikan bahwasanya meskipun daun adalah bagian terkecil dalam tanaman dan mempunyai sistem kerja yang sangat rumit, namun dengan kekuasaan Allah SWT daun masih mampu memberikan manfaat untuk yang lainnya.

Semua kejadian di alam ini merupakan kuasa dan rahasia Allah. Daun adalah bagian tanaman yang sangat mudah untuk didapatkan, sehingga untuk memanfaatkannya manusia tidak membutuhkan waktu atau biaya yang mahal. Hal ini menjadi salah satu bukti akan sifat Allah sebagai *Ar-Rahman* dan *Ar-Rahim*. Bahwasannya Allah selalu memberikan kemudahan kepada makhluknya sebagai bentuk kasih sayangNya. Allah tidak akan memberikan suatu musibah atau sakit kepada makhluknya tanpa menyediakan obatnya. Sebagaimana dalam surat asy Syu'araa' ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku” (QS. asy Syu'araa': 80).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Tingkat sitotoksitas ekstrak n-heksana, kloroform dan etanol daun widuri terhadap larva udang *Artemia salina* Leach secara berturut-turut adalah 19,6679 ppm, 3,9579 ppm dan 22, 8585 ppm. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan semua ekstrak bersifat toksik karena mempunyai nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Potensi bioaktivitas tertinggi terdapat pada ekstrak kloroform karena mempunyai nilai LC_{50} yang terkecil.
2. Kandungan golongan senyawa aktif berdasarkan uji fitokimia dengan reagen adalah senyawa steroid yang terdapat pada ekstrak kloroform daun widuri. Hasil ini diperkuat dengan pemisahan KLT yang menunjukkan positif adanya kandungan steroid dengan menggunakan eluen terbaik n-heksana : etil asetat (6:4) menghasilkan spot pada nilai Rf 0,19; 0,38; 0,46 berwarna hijau dan pada Rf 0,38 berwarna ungu.

5.2 Saran

Hasil uji pendahuluan dengan metode BSLT menunjukkan semua ekstrak bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, sehingga perlu dilakukan pengujian aktifitas antikanker daun widuri dari masing-masing pelarut yang digunakan. Perlu dilakukan pemisahan senyawa aktif lebih lanjut terhadap masing-masing ekstrak hingga didapatkan isolat murni.

Selanjutnya diidentifikasi menggunakan instrumen seperti GC-MS, LC-MS untuk mengetahui spesifikasi golongan senyawa aktifnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A. 2009. Ilmu Kimia dan Kegunaan Tumbuh-Tumbuhan Obat Indonesia. Bandung: ITB
- Anonimous. 2008. *Artemia, Pakan Berkualitas Untuk Ikan dan Udang. Alami* <http://mantauresearcher.blogspot.com/2008/01/artemia-pakan-alami-berkualitas-untuk.html>. Diakses tanggal 14 Mei 2013.
- Anonimous. 2009. Brine Shrimp. www.konabaymarine.com. Diakses tanggal 20 Mei 2013.
- Arisandi, Y. dan Andriani, Y. 2008. *Khasiat Tanaman Obat*. Jakarta: Pustaka Buku Murah.
- As-Syuyuti, J dan Al-Mahali, J. 2004. *Terjemahan Tafsir Jalalain Jilid 1*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Bakavathiappan, Ga., Baskara, M. P., dan Jeyaparvathi, S. 2012. Effect of *Calaotropis procera* leaf extract on *Spodoptera litura* (Fab.). *Jbiopest*. 134-138.
- Baraja, M. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus elastica* Nois ex Blume terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Basyir, H. 2011. Tafsir al Muyassa Jilid 3. Solo: Penerbit An-Naba.
- Batubara, I. 2003. Saponin Akar Kuning (*Arcangelisia flava* (L) Merr) sebagai Hepatoprotektor: Ekstraksi, Pemisahan dan Bioaktivitasnya. *Tesis* Diterbitkan. Bogor : Jurusan Kimia ITB.
- Bawa, I. G. A. G. 2009. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Toksik dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L.). *Jurnal Kimia* 3(2). ISSN 1907-9850: 1117-124.
- Burke, R.W. 1974. Mechanisms Of The Liebermann-Berchard and Zak Color Reaction Of Cholestrol. *Journal of Chemistry*. Washington. Clinical Chemistry.
- Deny. 2007. Pemanfaatan Tannin Sebagai Obat Perekat. *Skripsi*. Diterbitkan Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB Bogor.

- Dipalaya., Nur, Q., dan Majid. 2009. Pemanfaatan Tanaman Biduri (*Calothropis Gigantea*) Sebagai Alternatif Pembasmi Jentik Nyamuk. Program kreatifitas mahasiswa. Universitas negeri Makasar.
- Djatkiko, M., Yance, A., Dan Sri M. H. 2009. Uji Aktifitas Repellent Fraksi n-Heksana Ekstrak Etanolik Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- Elakkiya dan Prasanna. 2012. A study On Phytochemical Screening And invitro Antioxidant Activity Of *Calatropis gigantea* L. *Internasional Journal of Pharm Tech Research*. ISSN 0974-4304. 4(4).
- Fariyah. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus benjamina* L terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Farooqi, M. I. H. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam; Manfaat Tumbuhan Menurut Al-Qur'an dan Sunah Nabi*. Terjemahan Ahmad Y. Samantho, Jakarta: Penerbit Hikmah (PT Mizan Publika).
- Faruki, Z., Mithilesh, K. J., Mofizur, R., Alam, M. B., Mazumder, dan Rana, S. 2011. In-Vitro Antioxidant and Cytotoxic Potential Of *Calothropis procera* (R. BR.) Root. Bangladesh. *IJPSR*: ISSN 0975-8232. 2 (8).
- Fitriyani, A., Winarti, L., Muslichah, S., dan Nuri. 2011. Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* ruiz & Pav) pada Tikus Putih. *Majalah Obat Tradisional*: 16(1), 34-42.
- Gandjar, I dan Rohman, A. 2007. *Kimia Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R. J., Robbit, J. M., dan Schwarting, S. E. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Habib, R. M., Alam, M. A., Haue, M. A., Farjana, N., Rezaul., M. R. 2009. Cytotoxicity and Antifungal Acivities of Root Bark of *Calotropis gigantea* L. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences* : Vol 2(2), 38-41.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Handayani, D., Sayuti, N., dan Dachriyanus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans*,

Asal Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi- II 2008*. Lampung: Universitas Lampung.

Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.

Harmita, R., M., dan Biomend. 2006. *Buku Ajar Analisis Hayati, Ed.3*. Jakarta: EGC.

Hayati, E. K., Akyunul, J., dan Rahmawati, N. 2012. Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.). *molekul*, Vol. 7. N0.1. hal:20-32.

Hayati, E. K., Ghanaim, A. F., dan Lailis, S. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. ISSN 1907-9850. 4(2) : 193-200.

Helrich, K. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists Inc.

Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale. 2006. Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. *Vahl*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.

Irawan, N. dan Astuti, S. P. 2006. *Mengolah data statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. Yogyakarta: CV Andi Offset.

Jayakumar, S., Jhancy, M., dan Jaya, R. 2010. Evaluation of antioksidant potential and antibacterial activity of *Calotropid gigantea* and *Vinca rosea* using in vitro model. *Indian Journal of Science and Technology*. ISSN 0974-6864. Vol. 3. No.7.

Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Terjemahan A. Saptorahardjo. Jakarta: UI Press.

Koirewo, A.Y., Fatimawali, dan Wiyono, W.I. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.). Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115.

Kristanti, Aminah, Tanjung dan Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Airlangga.

- Kristianingsih. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid dari Akar Tanaman Kedondong Laut (*Polyscias fruticosa*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Kumala, L.D. 2007. *Kajian Ekstrak Umbi Gadung (Dioscorea hispida), Rerak (Sapindus rarak) dan Biji Sirsak (Annona muricata L.) sebagai Bahan Pengawet Alami Kayu*. *Skripsi*. Bandung: Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor.
- Kumar, G., Loganathan, K., dan Kokati, V. 2010. Antibacterial Activity of Aqueous Extract of *Calatropis gigantea* Leaves-An In Vitro Study. *International Journal of Pharamaceutical Sciences Review dan Research* . ISSN 0974-044x. Vol 4. (2).
- Kumar, G., Loganathan, K., dan Kokati, V. 2011. A Review on Pharmlogical and Pithochemical Profile of *Calatropis gigantea* L. *Pharmacologionline*. 1:1-8.
- Kumar, S., Suresh, E., Kalavanthy, S. 2013. Review on potential herl (*Calotropis gigantea* L.) R. Br. Review article. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. ISSN 2320-4206. 2(2) : 135-143.
- Kusumawati, I., Djatmiko, W., Rohman, R., Studiawan, H., dan Ekasari, W. 2003. Eksplorasi Keanekaragaman dan Kandungan Kimia Tumbuhan Obat di Hutan Tropis Gunung Arjuna. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. ISSN 1412-2855,2(3): 100-104.
- Lenny, S. 2006. *Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shirmp*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Lisdawati, V., Sumali, W., dan Broto, S. K. 2006. Biossai In Vitro Antikanker Terhadap Sel Leukimia L1210 dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocaepa*). *Jurnal Bahan Alam*. ISSN 1412-2855. 5(1).
- Loomis, T. A. 1978. *Toksologi Dasar*, diterjemahkan oleh Imono Argo Donatus, Edisi III hlm 16-20. Semarang: IKIP Semarang.
- Mahrana, J dan Mubasyir, A. 2006. *Al-Qur'an Bertutur Tentang Makanan dan Obat-Obatan*. Yogyakarta: Mitra Pustaka.
- Marliana, S. D., Suryanty, V., dan Suyono. 2005. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq.Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Jurnal Biofarmasi*. ISSN: 1693-2242.

- Mc Laughlin J. L., Chang C. J., dan Smith D. L. 1991. Bench top bioassays for the discovery of bioactive natural products an update. In: Attaur-Rahman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 9 : 388–409.
- Meistiani, Y. 2001. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Akar Kuning (*Arcangelisia flava (L) Merr*). *Skripsi*. Diterbitkan. Bogor: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor
- Meyer, B.N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E and Mc Laughlin, J. L. 1982. *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Planta Medica* 45: 31-34.
- Morshed, H, *et al.*, 2012. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of the Methanol Extract of *Paederia foetida Linn. (Rubiaceae)*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (01): 77-80.
- Mustikasari, K. dan Aryani, D. 2010. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Biji Kalangkala (*Litsea Angulata*). *Sains dan Terapan Kimia*, Vol.4, No. 2: 131-136.
- Panjaitan, R. B. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Batang Pulasari (*Alyxia Cortex*) dengan Metode BSLT. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Pertamawati, 2010. Pengaruh Fotosintesis Terhadap Pertumbuhan Tanaman Kentang (*Solanum Tuberosum L.*) Dalam Lingkungan Fotoautotrof Secara *In vitro*. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 12(1): Hal 31-37.
- Poedjiadi, A., dan Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Purwaningsih, Y. 2003. Isolasi dan Identifikasi senyawa flavonoid dari Biji Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata L. Walp*). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.
- Puspita, M. D. A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi*. Bogor: departemen Kimia Fakultas MIPA ITB.
- Ravi, G. R., Dubey, H., Tenpe R. C., Yeole, G. P., Patole, M. A. 2011. Cytotoxic activity of Ethanol root extract of *Calotropis gigantea Linn*. *International Journal of Drug Development & Research*, ISSN 0975-9344. 3(4).

- Restasari, A., Kusriani, K., dan Fachriyah, E. 2002. Isolasi Dan Identifikasi Fraksi Teraktif Dari Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (*Terminalia Catappa* Linn). *Skripsi* Diterbitkan. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang.
- Reveny, J. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). Daya Antimikroba. Sumatra Utara: Fakultas Farmasi Sumatra Utara.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Rohyami, Y. 2008. Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). *Logika*. ISSN 1410-2315. 5(1): hal 1-8.
- Rumandong, M., Dewi. K., dan Enny, F. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Chem Info*. 1(1) : 157-164.
- Sastrohamidjojo. H. 1991. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Press.
- Shahabbudin dan Pasaru. F. 2009. Pengujian Efek Penghambatan Ekstrak Daun Widuri Terhadap Pertumbuhan Larva *Spodoptera Exigua* Hubn. (*Lepidoptera: Noctuidae*) Dengan Menggunakan Indeks Pertumbuhan Relatif. *J. Agroland*, ISSN 0854-641x. 16(2) : 148-154.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcus*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*. ISSN 0215-9945. 35(1).
- Soemirat, J., 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Srisadono, A., dan Sunoko, H. A. 2008. Skrining Awal Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper Betle* Linn) Sebagai Antikanker dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Blt). *Artikel karya tulis ilmiah*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponego.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Diterbitkan. Malang:

Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. Bandung: Penerbit ITB.

Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.

Sukadana, I. M., Santi, S. R., dan Juliarti, N. K. 2008. Aktifitas Antibakteri Golongan Triterpenoid dari Biji Pepaya (*Carica papaya L.*). *Jurnal Kimia*. ISSN 1907-9850. 2 (1) : 15-18.

Sukardiman, Ekasari, W., dan Hapsari, P.P. 2006. Aktivitas Anti Kanker dan Induksi Apoptosis fraksi kloroform daun pepaya (*Carica papaya L*) terhadap Kultur Sel Kanker Mieloma. *Jurnal Media Kedokteran Hewan*. Vol.22. No. 2.

Susilaningsih, R. 2007. Isolasi, Identifikasi dan Uji Toksisitas Senyawa Alkaloid Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia galanga*). *Ringkasan Jurnal*.

Titis, M. B. M., Enny, F dan Dewi, K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktifitas Senyawa Alkaloid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis). *Chem Info*. 1(1): 196-201.

Urmi, K. F., Sabrina, M. Kamal, Md. H., Prabhat, B., dan Kaiser, H. 2012. Antioxidant Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of Different Parts of the Plant *Calotropis gigantea* R.Br. *International of Pharamaceutical Sciences and Research*, ISSN 0975-1459. 4(12).

Widi, R.K. 2007. Penjaringan dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Batang Kayu Kuning (*Arcangelisia flava Merr*). *Jurnal ILMU DASAR*, Vol. 8 no. 1: 24-29.

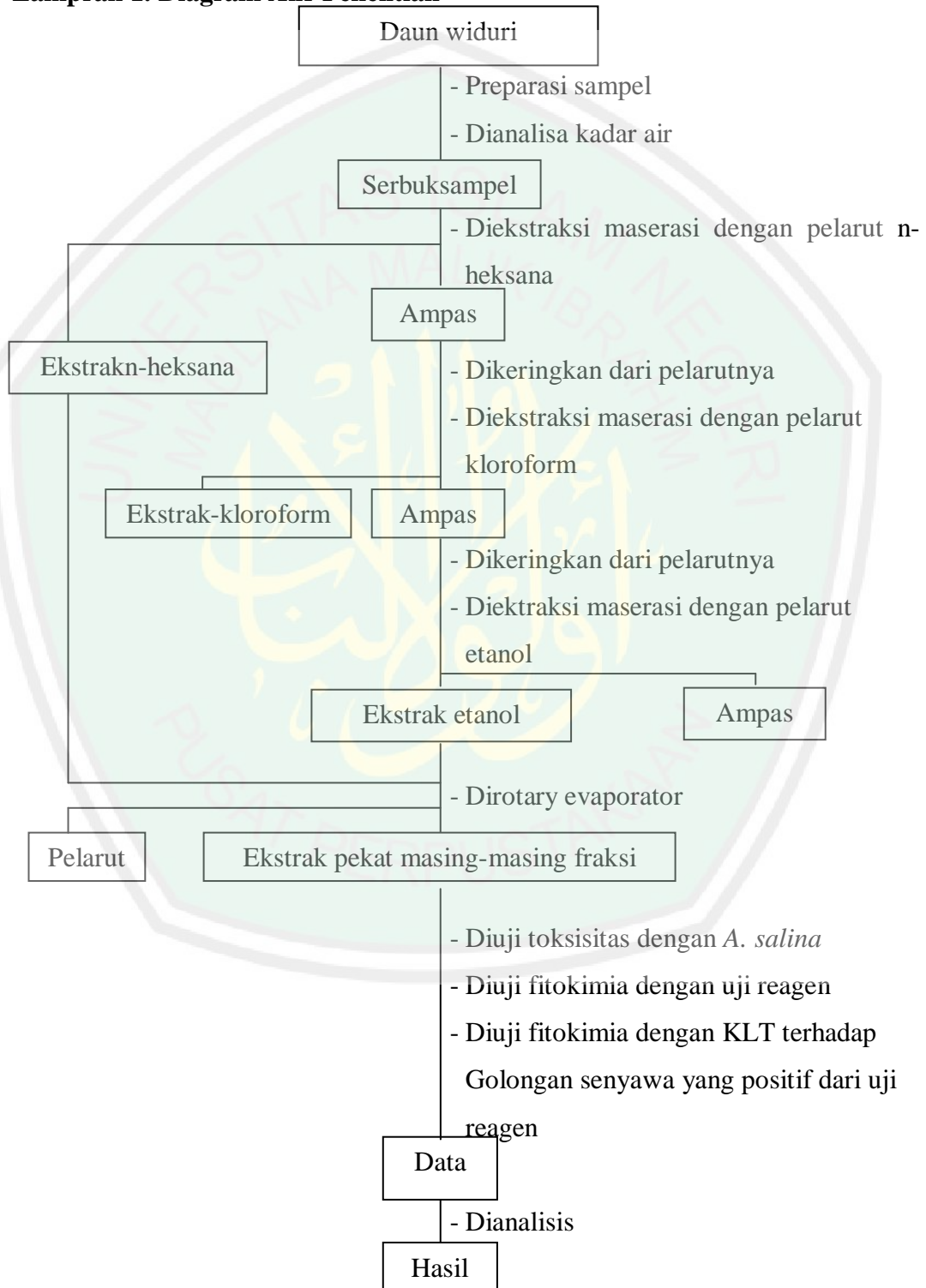
Widiyati, E. 2006. Penentuan Adanya Senyawa Triterpenoid dan Uji Aktivitas Biologis pada Beberapa spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *Jurnal gradient*. Vol.2 No.1:116-122.

Widyowati, R. dan Rahman, A. 2010. Kandungan Kimia dan Aktivitas Antimikroba Ekstrak *Garcinia Celebica* l. terhadap *Staphylococcus Aureus*, *Shigella Dysenteriae* dan *Candida Albicans*. *Majalah Farmasi Airlangga*, Vol. 8 no. 2.

- Windriyati, Y, N., Aqnes, B., dan Igustin A. S. 2010. Aktifitas Mukolitik In Vintro Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocotun* Ruiz dan Pav.). Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- Wonohadi, E., Ayu, D., Agustin, D., Liasthirani, S., dan Melani. 2006. Identifikasi Senyawa Anti Mikroba Rimpang Temu Giring (*Curcuma heyneana val* dan *van zijp*) secara Bioautografi. *Jurnal Farmasi Indonesia*, Vol. 3 No. 2. hal: 89 – 96.
- Yaligar, K. 2011. Preliminary Phytochemical Investigation and Screening of Anticonvulsant Activity of Leaves of *Calatropis giganyra* L. *Skripsi*. Karnataka: Rajiv Gandhi University of Health School.
- Zahro, I. M. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak n-Heksana Tanaman Ating-Anting (*Acalypha Indica* Linn). Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS dan FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Zaini, R. 2006. Isolasi Bioaktif Flavonoid dari Tanaman Dun Dewa *Gynura pседochina* (Lour) DC. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

LAMPIRAN

Lampran 1. Diagram Alir Penelitian



Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Analisis Kadar Air (Helrich, 1984)

Sampel

- Dipotong kecil-kecil
- Dimasukkan kedalam cawan yang telah diketahui berat konstannya
- Ditimbang sekitar 5 g
- Dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105°C selama sekitar ± 15 menit
- Didinginkan dalam desikator selama ± 10 menit
- Ditimbang
- Dipanaskan kembali dalam oven ± 30 menit
- Didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali
- Diulangi perlakuan ini sampai tercapai berat konstan
- Dihitung kadar airnya menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\%$$
- Keterangan: a = berat konstan cawan kosong
 b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan
 c = berat konstan cawan + sample setelah dikeringkan
- Faktor koreksi = $\frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$
- % Kadar terkoreksi = Kadar air - Faktor koreksi
- dilakukan 3 kali pengulangan

Hasil

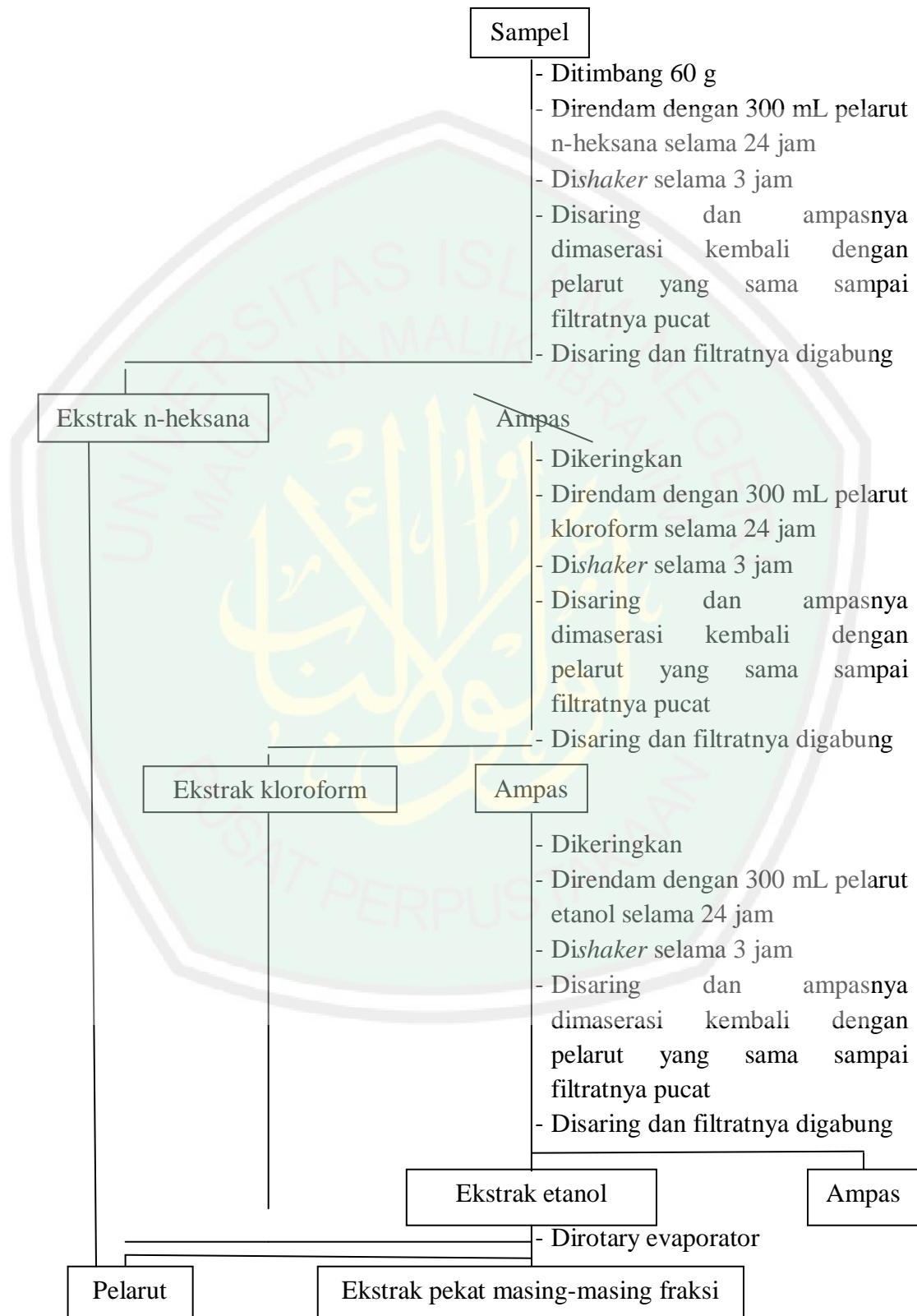
L.2.2 Preparasi Sampel

Sampel

- Dicuci daun tanaman tersebut
- Dipotong kecil-kecil
- Dikeringkan dengan oven pada suhu sekitar 30-37 °C selama 1-2 jam
- Dihaluskan sampai terbentuk serbuk
- Diayak dengan ayakan 60 mesh

Hasil

L.2.3 Ekstraksi Komponen Aktif



L.2.4 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

L.2.4.1 Penetasan Telur

Air laut 250 mL

- Ditempatkan pada botol penetasan
- Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach
- Diaerasi selama \pm 48 jam

Lava udang dalam air laut

L.2.4.2 Uji Toksisitas

10 mg ekstrak pekat etanol, kloroform dan n-heksana

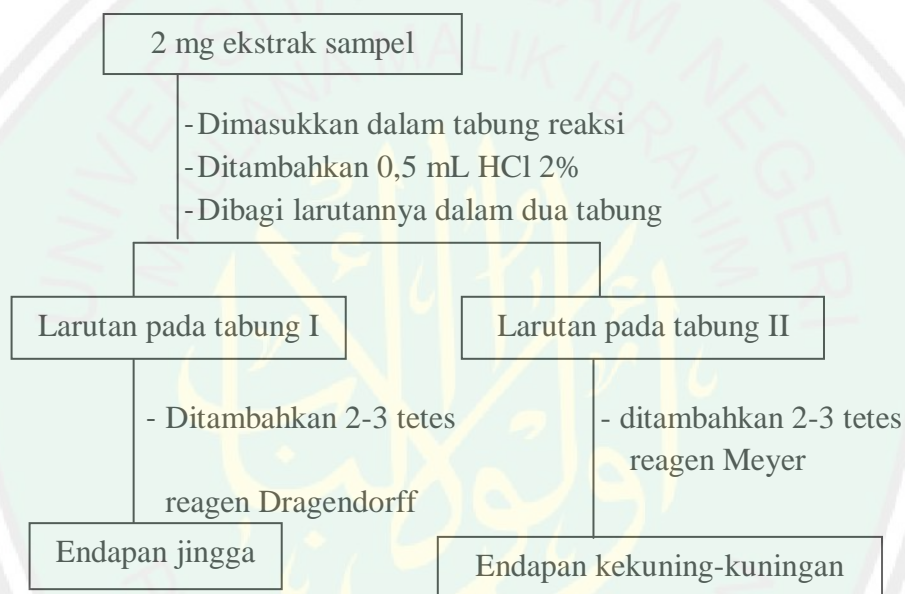
- Dilarutkan dengan menggunakan 10 mL pelarutnya masing-masing
- Diperoleh dipipet masing-masing larutan sebanyak 1 mL; 0,5 mL; 0,25 mL; 0,125 mL; 0,0625 mL; 0,03125 mL; 0,015625 mL; 0,0078 mL; 0,003906 mL; dan 0,00193 mL. sehingga konsentrasinya menjadi 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm, 3,125 ppm, 1,5625 ppm, 0,78 ppm, 0,3906 ppm, dan 0,1953 ppm
- Dimasukkan ke dalam botol vial
- Diuapkan pelarutnya sampai kering
- Dimasukkan 100 μ L dimetilsulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut
- Dikocok hingga ekstraknyalarut
- Dimasukkan 10 ekor larva udangnya
- Ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL
- Diamati kematian larva udang setelah 24 jam
- Perlakuan dilakukan pengulangan masing-masing sebanyak 3 kali
- Dianalisis datanya untuk mencari LC₅₀

Hasil

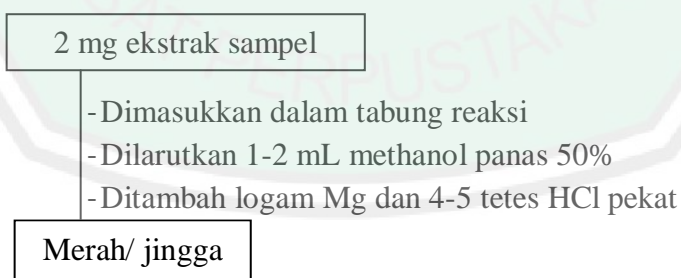
L.2.5 Uji Fitokimia dengan Reagen

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat etanol, kloroform dan n-heksana dari daun widuri dilarutkan dengan sedikit masing-masing pelarutnya, kemudian dilakukan untuk uji alkaloid, flavonoid, triterpenoid/ steroid.

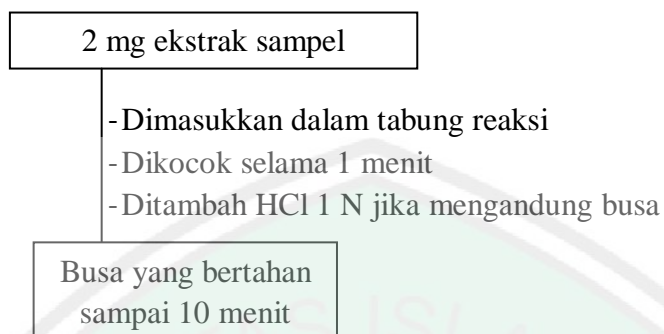
L.2.5.1 Uji Alkaloid



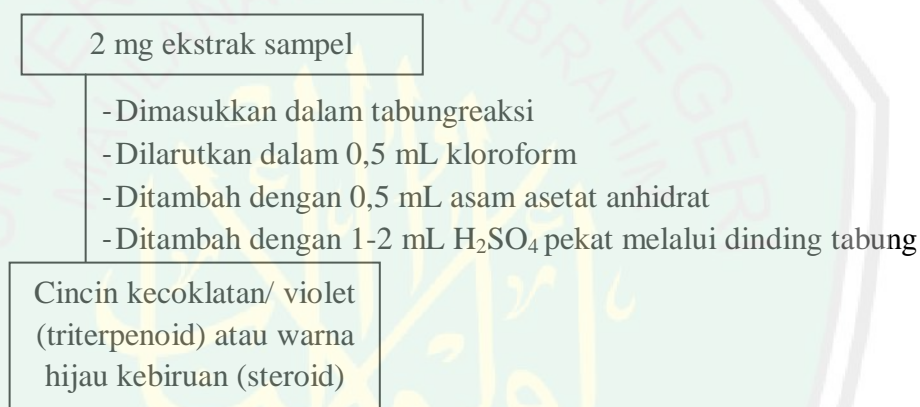
L.2.5.2 Uji Flavonoid



L.2.5.3 Uji Saponin

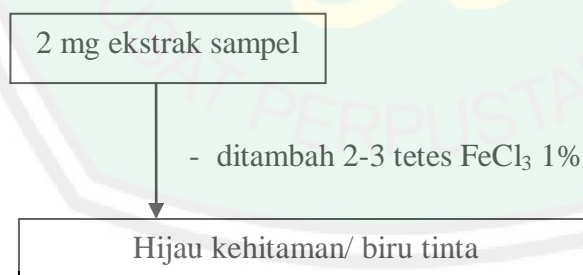


L.2.5.4 Uji Triterpenoid/ Steroid

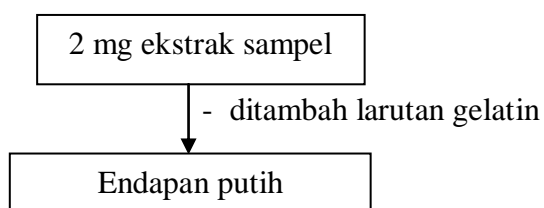


L.2.5.5 Uji Tanin

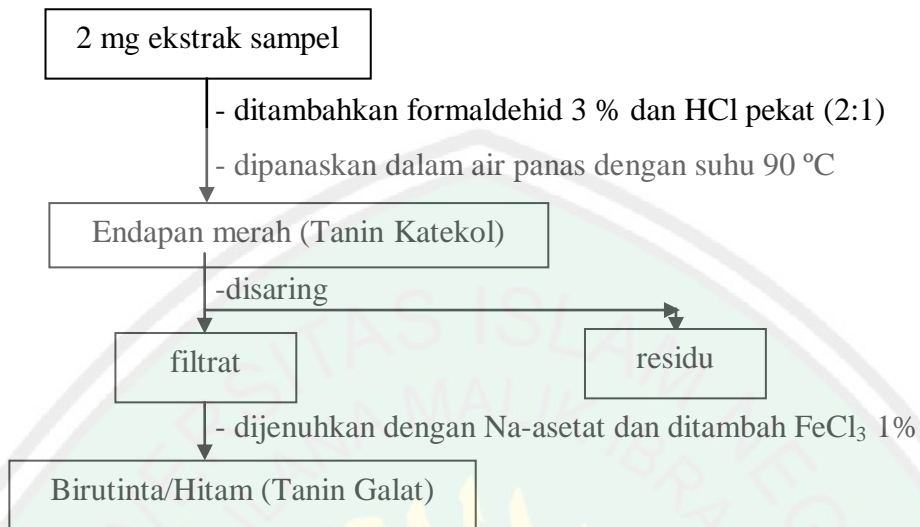
L.2.5.5.1 Uji dengan FeCl₃



L.2.5.5.2 Uji dengan Larutan Gelatin

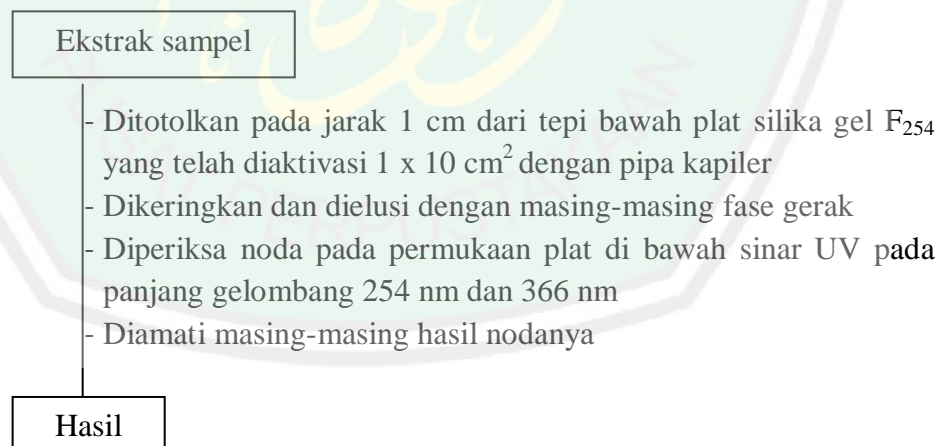


L.2.5.5.3 Uji Tanin Katekol dan Tanin Galat



L.2.6 Uji Fitokimia dengan KLT

Uji fitokimia dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji fitokimia dengan uji reagen.



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Pembuatan larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37 \%$$

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

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

$$\text{Massa HCl} = \text{BJ} \times \% \text{ Volume}$$

$$= 1190 \times 37\%$$

$$= 440,3 \text{ g}$$

$$\text{Mol HCl} = \frac{n}{\text{Mr}} = \frac{440,3}{36,42} = 12,09 \text{ mol}$$

$$\text{Konsentrasi (M)} = \frac{\text{mol}}{V \text{ (1L)}} = \frac{12,09}{1} = 12,09 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas HCl} = \text{ekuivalen} \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times 12,09$$

$$= 12,09 \text{ N}$$

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

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,27 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37 % sebanyak 8,3 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang berisi \pm 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.2 Pembuatan HCl 2 %

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

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

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

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37 % sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi \pm 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan Reagen Dragendorff

Larutan I. 0,6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H_2O .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL H_2O .

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan kedalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 6 g KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H_2O (Wagner, 2001).

L.3.4 Pembuatan Reagen Mayer

Larutan I. HgCl_2 1,358 g dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 g dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan HgCl_2 1,358 g yang dilarutkan dengan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan KI 5 g yang dilarutkan dengan aquades 10 mL. Larutan I dituangkan kedalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan, 2006).

L.3.5 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

Asam sulfat pekat = 5 mL

Anhidrida asetat = 5 mL

Etanol absolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

L.3.6 Pembuatan metanol 50%

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

$$99,8 \% \times V_1 = 50 \% \times 10 \text{ mL}$$

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

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8 % sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi \pm 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan FeCl₃

$$\% \text{ konsentrasi} = \frac{\text{g terlarut}}{\text{g terlarut} + \text{g pelarut}} \times 100 \%$$

$$\text{g terlarut} + \text{g pelarut} = \frac{\text{g terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100 \%$$

$$1 \text{ g} + \text{g pelarut} = \frac{1 \text{ g}}{1 \%} \times 100 \%$$

$$\text{g pelarut} = 100 \text{ g} - 1 \text{ g} = 99 \text{ g}$$

$$\text{volume pelarut} = \frac{\text{g pelarut}}{\text{BJ pelarut}} = \frac{99 \text{ g}}{1 \text{ g/ml}} = 99 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk FeCl₃.6H₂O sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan 99 mL aquades.

L.3.8 Pembuatan NH₃ 10%

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

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

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan NH₃ 50% sebanyak 2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.9 Pembuatan Larutan Gelatin

Cara pembuatannya adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambah larutan garam NaCl jenuh dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Sudarmadji, 2007).

L.3.10 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak Untuk Uji Sitolisik

a. Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak daun widuri

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

$$\text{mg} = \text{ppm} \cdot L \text{ (jika dibuat larutan stok } 10 \text{ mL} = 10^{-2} \text{ L)}$$

$$= 1000 \text{ ppm} \cdot 10^{-2} \text{ L} = 10 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 1000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan melarutkan 10 mg sampel ke dalam 10 mL masing-masing pelarutnya.

b. Pembuatan larutan ekstrak 0,195 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 0,195 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,00195 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,95 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 0,00195 \text{ mL} = 1,95 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 0,195 ppm dibuat dengan 1,95 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

c. Pembuatan larutan ekstrak 0,39 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 0,39 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0039 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 3,9 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 3,9 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 0,39 ppm dibuat dengan mengambil 3,9 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

d. Pembuatan larutan ekstrak 0,78 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 0,78 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0078 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 7,8 \times 10^{-6} \text{ L} = 7,8 \text{ } \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 0,78 ppm dibuat dengan mengambil 7,8 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

e. Pembuatan larutan ekstrak 1,56 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 1,56 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0156 \text{ L.ppm}/10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 15,6 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 15,6 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 1,56 ppm dibuat dengan 15,6 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

f. Pembuatan larutan ekstrak 3,125 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 31,25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,03125 \text{ L.ppm}/10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 31,25 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 31,25 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 3,125 ppm dibuat dengan mengambil 31,25 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

g. Pembuatan larutan ekstrak 6,25 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 6,25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,0625 \text{ L.ppm}/10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 62,5 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 62,5 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 6,25 ppm dibuat dengan mengambil 62,5 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

h. Pembuatan larutan ekstrak 12,5 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 12,5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,125 \text{ L.ppm}/10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 125 \cdot 10^{-6} \text{L} = 125 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 12,5 ppm dibuat dengan mengambil 125 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

i. Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 25 \cdot 10^{-6} \text{L} = 250 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 25 ppm dibuat dengan 250 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

j. Pembuatan larutan ekstrak 50 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 500 \cdot 10^{-6} \text{L} = 500 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 50 ppm dibuat dengan mengambil 500 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.

k. Pembuatan larutan ekstrak 100 ppm

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

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10^{-2} \text{ L} \cdot 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 10^3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1000 \times 10^{-6} \text{L} = 1000 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 100 ppm dibuat dengan mengambil 1000 μL larutan stok yang dilarutkan dalam 10 mL air laut.



Lampiran 4. Perhitungan Kadar Air

L.4.1 Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering Daun Widuri

Pengulangan ke-	Berat cawan kosong			Rata-Rata
	I	II	III	
Cawan 1	55,257	55,357	55,357	55,357
Cawan 2	58,154	58,152	58,152	58,152
Cawan 3	51,703	51,703	51,703	51,703

Pengulangan ke-	Berat sebelum di oven	Berat cawan + sampel (gr)						Rata-Rata
		I	II	III	IV	V	VI	
Cawan 1	60,330	60,075	60,069	60,065	60,063	60,062	60,061	60,062
Cawan 2	63,134	62,880	62,877	62,877	62,874	62,869	62,867	62,870
Cawan 3	56,761	56,516	56,507	56,502	56,496	56,492	56,491	56,493

Keterangan : Warna merah menunjukkan angka yang sudah konstan

L.4.2 Rumus Perhitungan Kadar Air

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

Keterangan :

a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

L.4.3 Perhitungan Kadar Air

$$1) \text{ Kadar air} = \frac{60,330 - 60,62}{60,330 - 55,357} \times 100\% = \frac{0,268}{4,973} \times 100\% = 5,389\%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} = \frac{100}{94,611} = 1,057\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 5,389\% - 1,057\% = 4,332\% \end{aligned}$$

$$2) \text{ Kadar Air} = \frac{63,134 - 62,870}{63,134 - 58,152} \times 100\% = \frac{0,264}{4,982} \times 100\% = 5,299\%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar koreksi}} = \frac{100}{94,701} = 1,056\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{Kadar Air} - \text{Faktor Koreksi} \\ &= 5,299 - 1,506 = 3,749\% \end{aligned}$$

$$3) \text{ Kadar Air} = \frac{56,760 - 56,493}{56,760 - 51,703} \times 100\% = \frac{0,267}{5,057} \times 100\% = 5,279\%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar koreksi}} = \frac{100}{94,721} = 1,056\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar Air Terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 5,279\% - 1,056\% = 4,223\% \end{aligned}$$

$$4) \text{ Rata-rata Kadar Air} = \frac{5,389\% + 5,299\% + 5,279}{3} = \frac{15,967}{3} = 5,322\%$$

$$5) \text{ Rata-Rata Faktor Koreksi} = \frac{1,057\% + 1,056\% + 1,056\%}{3} = \frac{3,169}{3} = 1,056\%$$

$$6) \text{ Rata-Rata Kadar Air Terkoreksi} = \frac{4,3225 + 3,794\% + 4,223\%}{3} = \frac{12,349}{3} = 4,116\%$$

Lampiran 5. Perhitungan Rendemen Ekstrak Hasil Maserasi

L .5.1 Hasil Rendemen Ekstrak n-Heksana

Berat sampel : 60,001

Berat wadah : 92,463

Berat wadah + sampel : 93,505

Berat ekstrak pekat : 1,042

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,042}{60,001} \times 100\% \\ &= 1,737\% \end{aligned}$$

L.5.2 Hasil Rendemen Ekstrak Kloroform

Berat sampel : 60,001

Berat wadah : 116,425

Berat wadah + sampel : 120,297

Berat ekstrak pekat : 3,873

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,873}{60,001} \times 100\% \\ &= 6,454\% \end{aligned}$$

L.5.3 Hasil Rendemen Ekstrak Etanol

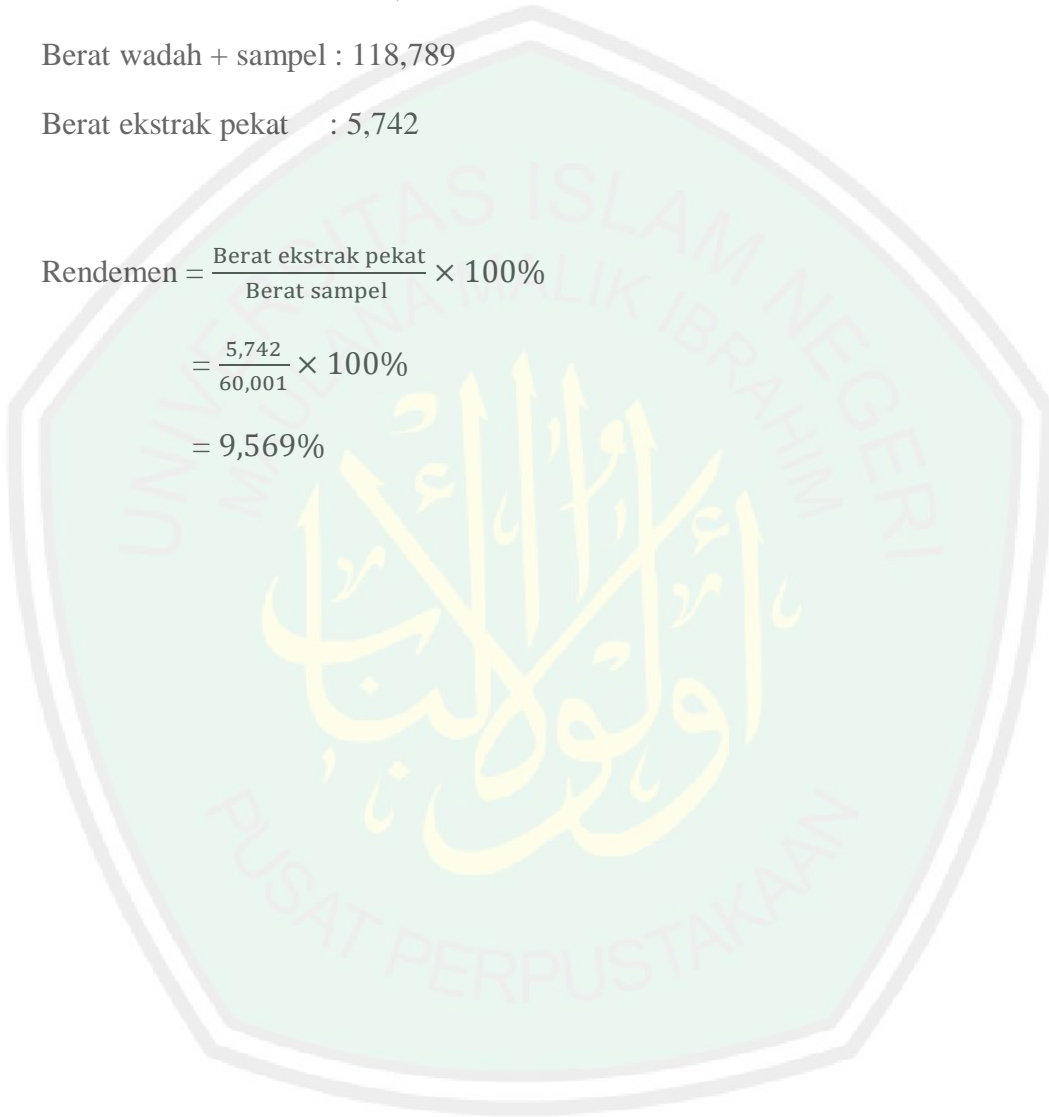
Berat sampel : 60,001

Berat wadah : 113,047

Berat wadah + sampel : 118,789

Berat ekstrak pekat : 5,742

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{5,742}{60,001} \times 100\% \\ &= 9,569\%\end{aligned}$$



Lampiran 6. Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC_{50} Ekstrak Daun Widuri menggunakan Program Minitab 16

L.6.1 Ekstrak N-heksan Daun Widuri

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Artemia salina yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	1	0	0
0**	0	1	0	0	0
0***	0	0	0	0	0
0.1953	2	3	3	3	30
0.3906	3	2	3	3	30
0.78	3	4	4	4	40
1.5625	3	4	4	4	40
3.125	4	6	6	6	60
6.25	5	7	7	7	70
12.5	7	6	7	7	70
25	7	8	8	8	80
50	7	9	9	9	90
100	8	8	9	8	80

Mortalitas = %Mortalitas x Jumlah hewan uji

Mortalitas	Jumlah Hewan Uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	30	0*
0	30	0**
0	30	0***
30	30	0.1953
30	30	0.3906
40	30	0.78
40	30	1.5625
60	30	3.125
70	30	6.25
70	30	12.5
80	30	25
90	30	50
80	30	100

Keterangan : * kontrol media (DMSO tanpa ekstrak)

** kontrol pelarut

*** kontrol air laut

Probit Analysis: mortalitas; jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	177
	Non-event	213
jumlah larva	Total	390

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.410669	0.0755852	-5.43	0.000
konsentrasi	0.0208802	0.0029186	7.15	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -236.464

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	103.006	9	0.000
Deviance	125.625	9	0.000

Tolerance Distribution

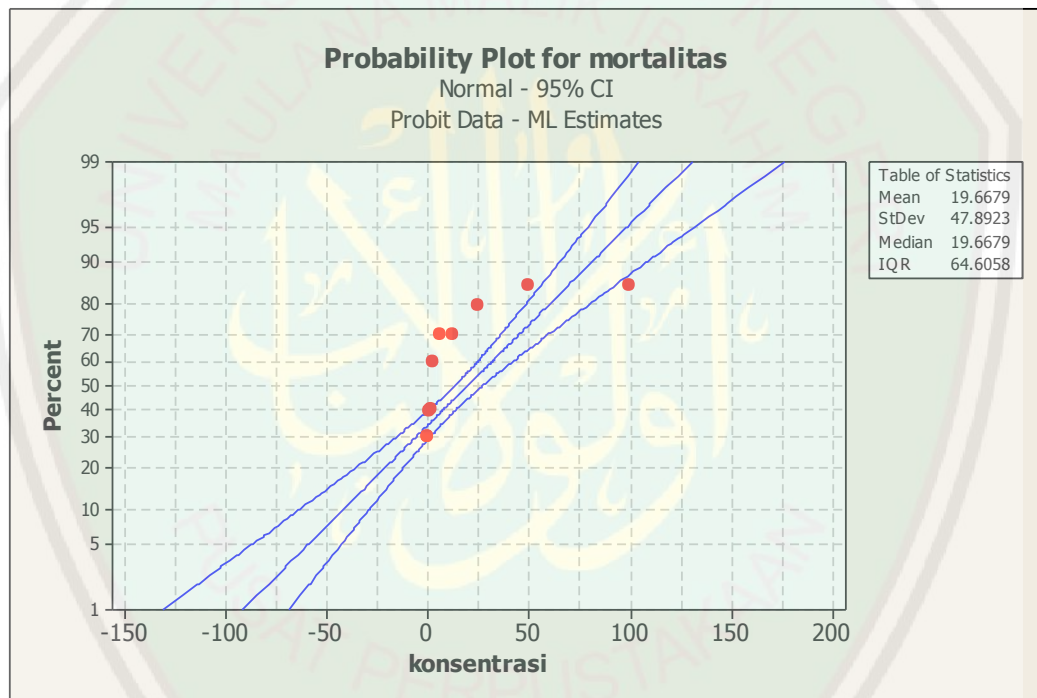
Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	19.6679	3.38728	13.0290	26.3069
StDev	47.8923	6.69422	36.4156	62.9860

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-91.7463	14.8465	-131.565	-68.7565
2	-78.6909	13.0708	-113.680	-58.4119
3	-70.4077	11.9519	-102.348	-51.8335
4	-64.1765	11.1154	-93.8337	-46.8744
5	-59.1080	10.4391	-86.9161	-42.8323
6	-54.7938	9.86711	-81.0352	-39.3849
7	-51.0112	9.36875	-75.8851	-36.3558
8	-47.6242	8.92549	-71.2797	-33.6377
9	-44.5440	8.52518	-67.0969	-31.1601
10	-41.7086	8.15941	-63.2520	-28.8740
20	-20.6393	5.57391	-34.9472	-11.6210
30	-5.44686	4.02843	-15.1891	1.47130
40	7.53452	3.27007	0.501971	13.8496
50	19.6679	3.38728	13.3624	27.2251

60	31.8013	4.24341	24.6152	42.2081
70	44.7827	5.60051	35.7262	59.1665
80	59.9751	7.44062	48.2155	79.5276
90	81.0444	10.1769	65.1663	108.135
91	83.8798	10.5537	67.4304	112.001
92	86.9601	10.9646	69.8869	116.205
93	90.3470	11.4181	72.5847	120.831
94	94.1296	11.9265	75.5941	126.001
95	98.4438	12.5083	79.0223	131.901
96	103.512	13.1942	83.0451	138.838
97	109.744	14.0406	87.9847	147.372
98	118.027	15.1700	94.5424	158.725
99	131.082	16.9579	104.863	176.63



Gambar L.6.1: Kurva uji kenormalan data ekstrak kasar N-heksana daun widuri

L.6.2 Ekstrak Kloroform Daun Widuri

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Artemia salina yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	1	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
0***	0	0	0	0	0
0.1953	2	3	3	3	30
0.3906	4	4	3	4	40
0.78	4	6	6	6	60
1.5625	5	8	8	8	80
3.125	8	6	8	8	80
6.25	7	7	8	7	70
12.5	7	9	9	9	90
25	8	9	9	9	90
50	10	8	10	10	100
100	9	10	10	10	100

Mortalitas = %Mortalitas x Jumlah hewan uji

Mortalitas	Jumlah Hewan Uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	30	0*
0	30	0**
0	30	0***
30	30	0.1953
40	30	0.3906
60	30	0.78
80	30	1.5625
80	30	3.125
70	30	6.25
90	30	12.5
90	30	25
100	30	50
100	30	100

Keterangan : * kontrol media (DMSO tanpa ekstrak)

** kontrol pelarut

*** kontrol air laut

Probit Analysis: mortalitas; jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	222
	Non-event	168
jumlah larva	Total	390

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.424853	0.0861536	-4.93	0.000
konsentrasi	0.107341	0.0149895	7.16	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -189.521

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	109.106	9	0.000
Deviance	125.918	9	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

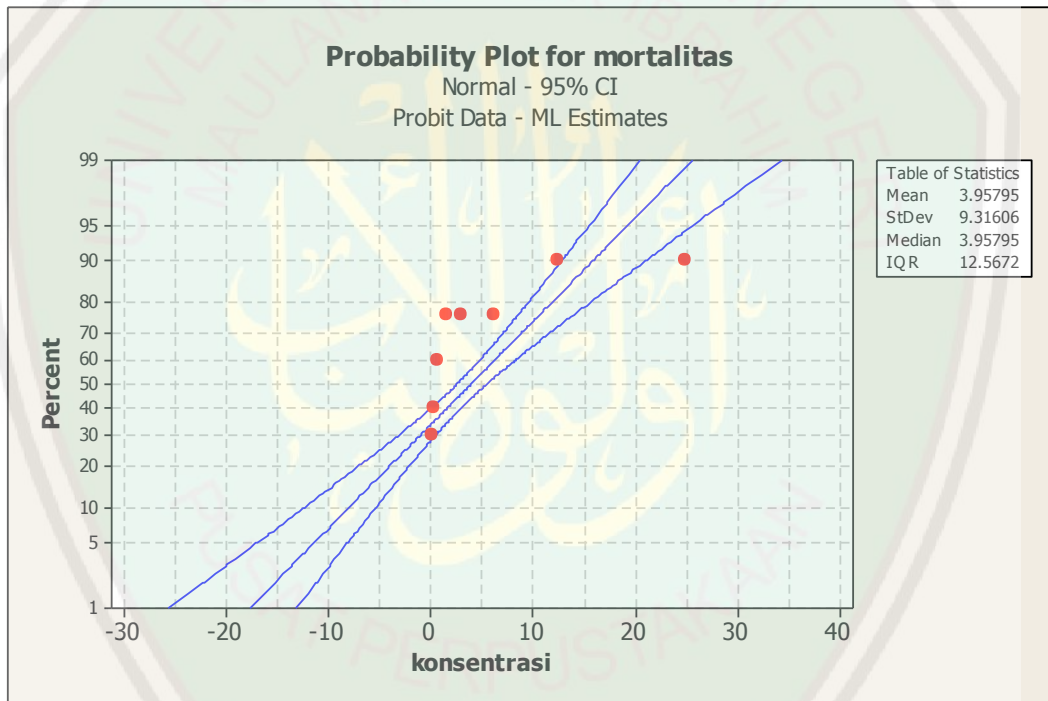
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	3.95795	0.713092	2.56032	5.35559
StDev	9.31606	1.30092	7.08546	12.2489

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-17.7144	2.95599	-25.6300	-13.1306
2	-15.1749	2.61268	-22.1558	-11.1145
3	-13.5636	2.39657	-19.9548	-9.83192
4	-12.3515	2.23515	-18.3014	-8.86484
5	-11.3656	2.10476	-16.9583	-8.07639
6	-10.5264	1.99455	-15.8167	-7.40376
7	-9.79061	1.89860	-14.8170	-6.81263
8	-9.13178	1.81333	-13.9232	-6.28209
9	-8.53260	1.73637	-13.1115	-5.79839
10	-7.98106	1.66610	-12.3655	-5.35200
20	-3.88264	1.17086	-6.87606	-1.98087
30	-0.927394	0.874259	-3.04163	0.573802
40	1.59776	0.718246	0.0285329	2.96288

50 3.95795 0.713092 2.59118 5.50287

60	6.31815	0.847571	4.84860	8.34807
70	8.84330	1.08788	7.05875	11.5972
80	11.7985	1.42955	9.52079	15.5242
90	15.8970	1.94942	12.8424	21.0632
91	16.4485	2.02154	13.2851	21.8129
92	17.0477	2.10029	13.7652	22.6282
93	17.7065	2.18730	14.2923	23.5254
94	18.4423	2.28494	14.8801	24.5284
95	19.2815	2.39682	15.5494	25.6734
96	20.2675	2.52888	16.3346	27.0198
97	21.4795	2.69200	17.2983	28.6766
98	23.0908	2.90992	18.5772	30.8811
99	25.6304	3.25535	20.5891	34.3595



Gambar L.6.1: Kurva uji kenormalan data ekstrak kasar N-heksana daun widuri

L.6.3 Ekstrak Etanol Daun Widuri

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Artemia salina yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	1	0	0
0**	1	0	0	0	0
0***	0	0	0	0	0
0.1953	3	3	3	3	30
0.3906	3	3	2	3	30
0.78	4	4	3	4	40
1.5625	4	4	4	4	40
3.125	5	5	6	5	50
6.25	6	6	6	6	60
12.5	6	7	6	6	60
25	6	6	7	6	60
50	9	8	8	8	80
100	9	9	9	9	90

Mortalitas = %Mortalitas x Jumlah hewan uji

Mortalitas	Jumlah Hewan Uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	30	0*
0	30	0**
0	30	0***
30	30	0.1953
30	30	0.3906
40	30	0.78
40	30	1.5625
50	30	3.125
60	30	6.25
60	30	12.5
60	30	25
80	30	50
90	30	100

Keterangan: * kontrol media (DMSO tanpa ekstrak)

** kontrol pelarut

*** kontrol air laut

Probit Analysis: mortalitas; jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	162
	Non-event	228
jumlah larva	Total	390

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.550500	0.0774795	-7.11	0.000
konsentrasi	0.0240829	0.0032712	7.36	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -226.183

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	63.8227	9	0.000
Deviance	86.0415	9	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

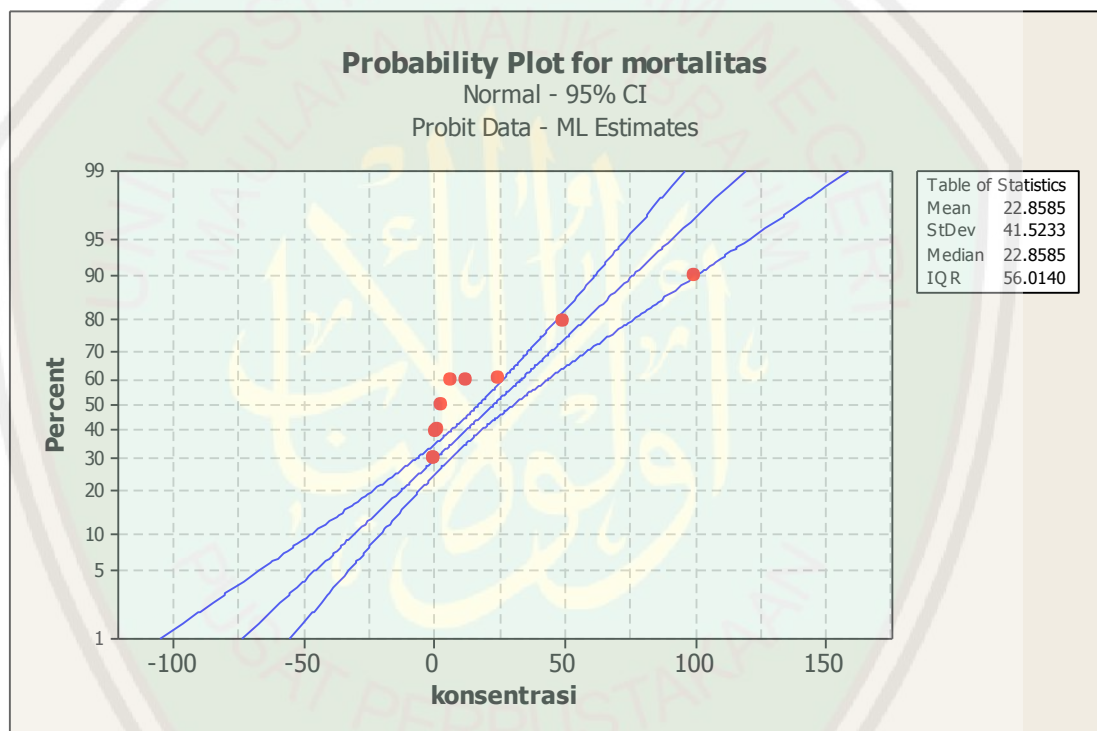
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	22.8585	3.25355	16.4817	29.2354
StDev	41.5233	5.64011	31.8180	54.1889

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-73.7390	11.8748	-105.213	-55.2157
2	-62.4198	10.3883	-89.8876	-46.1759
3	-55.2381	9.45373	-80.1808	-40.4237
4	-49.8356	8.75654	-72.8904	-36.0849
5	-45.4411	8.19414	-66.9696	-32.5463
6	-41.7007	7.71954	-61.9382	-29.5263
7	-38.4211	7.30711	-57.5340	-26.8709
8	-35.4846	6.94130	-53.5974	-24.4865
9	-32.8140	6.61193	-50.0239	-22.3113
10	-30.3556	6.31197	-46.7409	-20.3026
20	-12.0883	4.24501	-22.6727	-5.04926
30	1.08373	3.15058	-6.13623	6.76790
40	12.3387	2.84298	6.64793	18.2109

50 22.8585 3.25355 17.0761 30.4272

60	33.3783	4.14393	26.4790	43.6688
70	44.6334	5.36104	35.9914	58.3835
80	57.8054	6.94377	46.8036	75.9250
90	76.0727	9.26395	61.5481	100.502
91	78.5311	9.58235	63.5201	103.822
92	81.2017	9.92941	65.6602	107.430
93	84.1382	10.3123	68.0108	111.401
94	87.4178	10.7412	70.6334	115.838
95	91.1582	11.2320	73.6213	120.901
96	95.5527	11.8105	77.1281	126.854
97	100.955	12.5241	81.4345	134.177
98	108.137	13.4760	87.1526	143.918
99	119.456	14.9825	96.1528	159.283



Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak daun widuri

Ekstrak Pelarut	Nilai LC_{50} (ppm)
n-heksana	19,6679
Kloroform	3,9579
Etanol	22,8585

Lampiran 7. Hasil Pengujian Fitokimia dengan Reagen

Golongan senyawa	Ekstrak		
	n-heksana	Klororform	Etanol
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	-	-	-
Saponin	-	-	-
Triterpenoid	+	-	+
Steroid	-	+++	-
Tanin	-	-	+

Lampiran 8. Perhitungan Nilai Rf Hasil KLT masing-masing Ekstrak

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak senyawa dengan titik asal}}{\text{Jarak pelarut dari titik awal}}$$

Hasil KLT senyawa steroid ekstrak kloroform daun widuri

- a. Eluen n-heksana : etil asetat (7:3)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,7}{8,5} = 0,32$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{3,4}{8,5} = 0,4$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{3,7}{8,5} = 0,44$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{4,2}{8,5} = 0,49$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{5,3}{8,5} = 0,62$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{6,7}{8,5} = 0,79$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{7,2}{8,5} = 0,85$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{7,7}{8,5} = 0,91$$

- b. Eluen n-heksana : etil asetat (8:2)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{0,5}{8,5} = 0,06$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,8}{8,5} = 0,21$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{2,5}{8,5} = 0,29$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{4,7}{8,5} = 0,55$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{5,1}{8,5} = 0,6$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{5,6}{8,5} = 0,66$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{6}{8,5} = 0,71$$

c. Eluen n-heksana : eil asetat : kloroform (5:3:1)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{3,2}{8,5} = 0,37$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{4,2}{8,5} = 0,49$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{4,7}{8,5} = 0,55$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{45,1}{8,5} = 0,6$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{5,7}{8,5} = 0,67$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{6,5}{8,5} = 0,76$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{7,3}{8,5} = 0,85$$

d. Eluen n-heksana : etil asetat (6:4)

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{1,5}{8,4} = 0,19$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{3,2}{8,4} = 0,38$$

$$Rf \text{ noda } 3 = \frac{3,9}{8,4} = 0,46$$

$$Rf \text{ noda } 4 = \frac{4,5}{8,4} = 0,54$$

$$Rf \text{ noda } 5 = \frac{5,1}{8,4} = 0,61$$

$$Rf \text{ noda } 6 = \frac{6,2}{8,4} = 0,74$$

$$Rf \text{ noda } 7 = \frac{7}{8,4} = 0,83$$

$$Rf \text{ noda } 8 = \frac{7,4}{8,4} = 0,88$$

$$Rf \text{ noda } 8 = \frac{7,9}{8,4} = 0,94$$

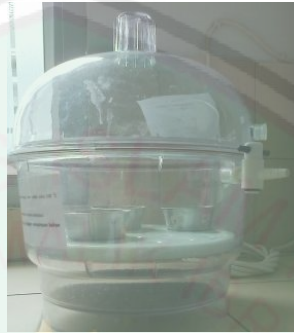
Lampiran 9. Dokumentasi

L.9.1 Preparasi Sampel

L.9.2 Analisis Kadar Air



Sampel kering daun widuri



Desikator
(Cawan+sampel)

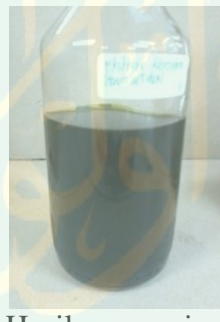
L.9.3 Ekstraksi Maserasi



Prses maserasi
sampel



Hasil maserasi
pelarut n-heksana



Hasil maserasi
kloroform



Hasil maserasi
etanol

L. 9. 4 Proses Pemekatan



Proses *Rotary evaporator*



Ekstrak pekat n-
heksana daun widuri



Ekstrak pekat
kloroform daun
widuri



Ekstrak pekat etanol
daun widuri

L.9.5 Uji Sitotoksiitas dengan Metode BSLT



Proses penetasan larva udang *Artemia salina*



Pengujian sitotoksisitas

L.9.6 Uji Fitokima dengan Ragen

1. Ekstrak n-heksana



alkaloid
dragendrof
(-)



Alkaloid
meyer (-)



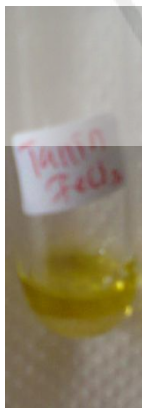
Saponin (-)



Flavonoid (-)



triterpenoid (+)



Tanin FeCl_3 (-)



Tanin gelatin (-)

2. Ekstrak kloroform



Alkaloid
dragendrof (-)



Alkaloid
meyer (-)



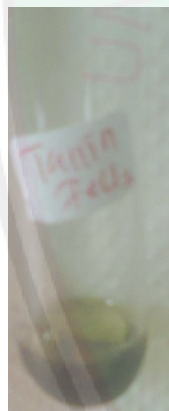
Saponin (-)



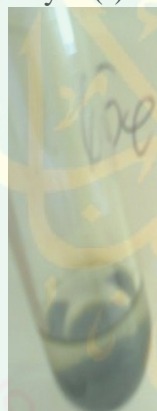
Flavonoid (-)



Steroid (+++)



Tanin $FeCl_3$ (-)



Tanin gelatin

3. Ekstrak etanol



Alkaloid
dragendrof (-)



Alkaloid
meyer (-)



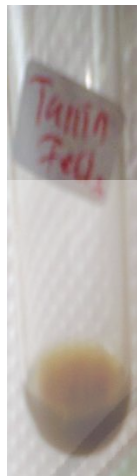
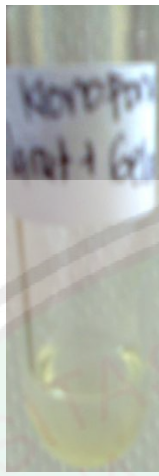
Flavonoid (-)



Saponin (-)



Triterpenoid
(+++)

Tanin FeCl_3 (+)

Tanin gelatin (-)

L.9.7 Pemisahan Golongan Senyawa Aktif Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis

<p>Hasil KLT dengan eluen (7:3)</p>	<p>Hasil KLT dengan eluen n-heksana : etil asetat)8:2)</p>	<p>Hasil KLT eluen n-heksana : etil asetat : kloroform (5:3:1)</p>	<p>Hasil KLT dengan eluen n-heksana : etil asetat (6:4)</p>	<p>Hasil KLT eluen n-heksana : etil asetat (6:4) tidak menghasilkan spot</p>