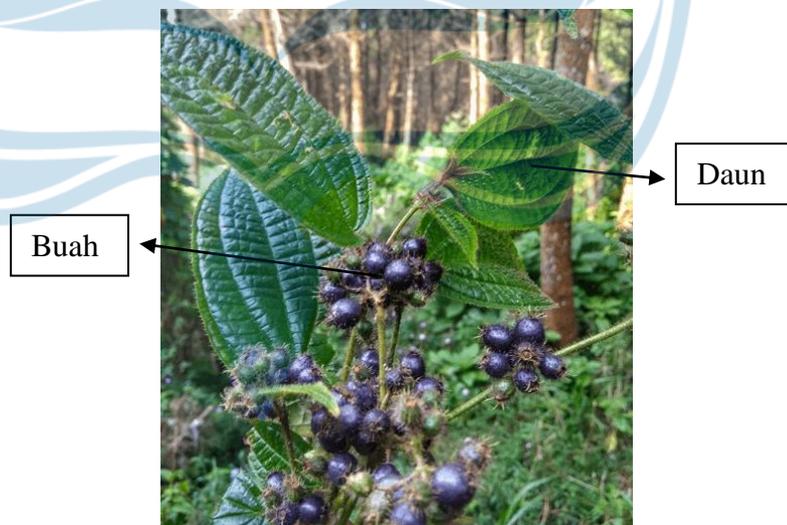


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tumbuhan Harendong Bulu (*Clidemia hirta* (L.) D. Don)

1. Deskripsi dan Klasifikasi

Tumbuhan harendong bulu (*Clidemia hirta*) merupakan tumbuhan yang invasif yang mampu tumbuh dan menyebar dengan cepat. Tumbuhan harendong bulu banyak ditemukan didaerah tropis khususnya pulau Jawa. Tumbuhan harendong bulu adalah tumbuhan perdu yang memiliki banyak cabang, mampu tumbuh sampai 300 cm, terdapat rambut-rambut halus pada seluruh bagian organnya (Backer dan Bakhuizen, 1968). Berikut gambar daun harendong bulu yang berasal dari Taman Nasional Gunung Merapi dan digunakan pada penelitian ini.



Gambar 1. Daun Harendong Bulu (*C. hirta*) (ITIS, 2021)

Ciri-ciri lainnya dari harendong bulu yaitu tumbuh di semak dengan setinggi 1 sampai 3 meter, memiliki batang yang ditutupi rambut-rambut yang berfungsi untuk transpirasi dan menangkap cahaya untuk proses

fotosintesis, memiliki daun berbentuk lonjong ukuran 7-10 cm dengan ujung runcing, pangkal tumpul, permukaan daun ditutupi oleh bulu-bulu kasar, memiliki bunga berwarna putih, memiliki buah berukuran kecil, berbentuk bulat dengan warna ungu kehitaman saat matang (Backer dan Bakhuizen, 1968). Harendong bulu juga dikenal dengan senduduk bulu. Tumbuhan ini di daerah Sumatera dikenal dengan senduduk bulu sedangkan di daerah Jawa dikenal dengan harendong bulu, senggani bulu, sengganen bulu, kemanden bulu, kiuruk bulu. Klasifikasi tanaman harendong bulu menurut ITIS (2021) sebagai berikut.

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta / Magnoliophyta
Anak divisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Myrtales
Suku	: Melastomataceae
Marga	: Clidemia
Spesies	: <i>Clidemia hirta</i> (L.) D. Don.
Sinonim	: <i>Clidemia elegans</i> (Aubl.) D. Don, <i>Melastoma elegans</i> Aubl., <i>Melastoma hirtum</i> L., <i>Miconia crenata</i> (Vahl.) Michelang

Tumbuhan harendong bulu memiliki sifat tumbuh yang cepat menyebar dan jumlah yang sangat melimpah bila hidup diluar habitat aslinya (Ismaini, 2015). Bagian tumbuhan harendong bulu yang banyak dimanfaatkan yaitu bagian daun dan buahnya. Daun harendong bulu banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan penyakit sawan sedangkan buah harendong bulu banyak dimanfaatkan sebagai obat bisul dan luka (Sianipar, 2021).

2. Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan kumpulan senyawa-senyawa metabolik yang terkandung dalam tumbuhan yang berperan sebagai mekanisme pertahanan fungsi organ tumbuhan pada terhadap lingkungan (Anggraito dkk., 2018). Metabolit sekunder dapat terbentuk melalui jalur biokimia yang kompleks. Tahap pertama yaitu biosintesis, metabolit sekunder terbentuk dari prekursor atau senyawa dasar yang berasal dari metabolit primer seperti asam amino, lemak, dan karbohidrat. Metabolit primer adalah senyawa-senyawa kimia yang dihasilkan oleh makhluk hidup dan berperan untuk pertumbuhan tanaman (Sahidin, 2012).

Senyawa metabolit sekunder menggunakan prekursor asam amino fenilalanin. Tahap dekarboksilasi (melepaskan gugus karboksil (COOH)), fenilalanin akan diubah menjadi asam sinamat melalui enzim phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Tahap kedua yaitu hidroksilasi (menambahkan gugus hidroksil (-OH)), asam sinamat mengalami hidroksilasi menjadi *p-coumaric acid* dengan bantuan enzim *cinnamate-4-hydroxylase* (C4H). Tahap terakhir yaitu polimerasi dan modifikasi, *p-coumaric acid* diubah menjadi fenolik seperti flavonoid (kuarsetin, kaempferol, asam tanin dan asam salisilat), stilbenes, lignin (Sahidin, 2012). Jalur biosintesis flavonoid dengan prekursor asam amino fenilalanin dapat diubah ke chalcone dengan bantuan enzim *chalcone synthase* (CHS) yang kemudian akan mengalami isomerisasi menjadi flavonoid melalui enzim *chalcone isomerase* (CHI) sedangkan jalur

biosintesis tanin berasal dari senyawa flavonoid dengan memproduksi flavanol kemudian enzim *polyphenol oxidase* membuat reaksi reaksi oksidasi yang membuat flavanol membentuk polimer yaitu tanin (Lewis dkk., 2024).

Tumbuhan harendong bulu memiliki senyawa metabolit sekunder yang terdiri flavonoid, tanin, fenolik, alkaloid dan saponin (Junedi dkk., 2023). Senyawa flavonoid merupakan senyawa alami yang paling banyak ditemukan pada jaringan tumbuhan dan flavonoid terdiri dari 15 atom karbon yang terbagi menjadi dua gugus yaitu gugus cincin benzena dan rantai alifatik. Flavonoid termasuk golongan senyawa polar yang mampu larut pada pelarut polar seperti etanol, butanol, dan metanol (Khairan dkk., 2023), namun adapula flavonoid golongan senyawa nonpolar seperti isoflavon, flavon, auron, kalkon, antosianin dan flavonol (Theodora dkk., 2019). Pelarut polar dengan campuran air menjadi pelarut yang cocok untuk mengikat flavonoid yang memiliki ikatan glikosida (Khairan dkk., 2023). Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan, antibakteri dan antiinflamasi (Hidayah dkk., 2023).

Senyawa fenolik memiliki gugus hidroksil yang berada pada struktur aromatik yaitu benzena. Senyawa fenolik pada tumbuhan umumnya ditemukan dalam bentuk ester atau glikosida (Vermerris dan Nicholson, 2008). Contoh senyawa fenolik adalah flavonoid, tanin, lignan, xanton, kuinon, isoflavon, asam fenolik, stilben, kurkumin, flavon, dan flavonol (Sun dan Shahrajabian, 2023). Fenolik berfungsi sebagai antioksidan

karena fenolik mempunyai gugus hidroksil (-OH) yang mampu terikat pada cincin aromatik sehingga gugus tersebut menyumbangkan elektron untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan sel (Hasim dkk., 2019).

Tanin merupakan komponen zat organik yang kompleks yang terdiri dari gugus hidroksil dan karboksil. Senyawa tanin pada tumbuhan dibedakan menjadi dua yaitu terkondensasi dan terhidrolisis. Tanin terkondensasi dibentuk dari reaksi kondensasi antar flavonoid sedangkan tanin terhidrolisis dibentuk dari reaksi esterifikasi asam fenolat dan gula (Khairan dkk., 2023). Tanin berfungsi sebagai antioksidan dan berperan dalam pengendapan protein dan pengkelat logam (Masniawati dkk., 2021). Berdasarkan penelitian Junedi dkk (2023), metabolit sekunder yang dihasilkan dari ekstrak etanol 70% daun harendong bulu terdiri dari flavonoid sebesar $43,69 \pm 1,02$ mg QE/g ekstrak, fenolik $251,02 \pm 12,16$ mg GAE/g ekstrak, tanin sebesar $73,42 \pm 1,10$ mg TAE/g ekstrak, alkaloid sebesar $3,25 \pm 0,73$ mg AE/g ekstrak dan saponin $145,45 \pm 1,88$ mg SE/g ekstrak.

B. Pembuatan Simplisia

Pembuatan simplisia sebagai bahan baku obat bahan alam berbasis ekstrak harus memperhatikan beberapa hal seperti identitas tumbuhan, tempat tumbuh, umur, waktu dan masa panen serta pasca panen. Identitas tanaman dapat dilakukan dengan cara menuliskan taksonomi, deskripsi tanaman, membuat spesimen atau gambar dan pendapat ahli dari lembaga. Tumbuhan

yang akan dijadikan bahan baku obat bahan alam harus memperhatikan tempat tumbuhnya seperti jenis tanah, kondisi lingkungan, ketinggian tempat dan unsur hara karena adanya perbedaan tempat tumbuh suatu tumbuhan akan menghasilkan ekstrak, kadar dan jumlah senyawa metabolit sekunder yang berbeda (BPOM, 2023). Menurut Tarakanika dkk. (2019), hasil flavonoid tertinggi terdapat daun kamalaka daerah Mandiangin (dataran tinggi) sedangkan alkaloid tertinggi terdapat pada daun kamalaka daerah landasan ulin (dataran rendah). Daun harendong bulu yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Taman Nasional Gunung Merapi yang berada dataran tinggi sehingga daun harendong bulu dapat menerima cahaya matahari lebih banyak.

Umur, waktu dan masa panen harus sesuai dengan karakteristik tumbuhan, apabila tidak sesuai kriteria yang diharapkan akan menyebabkan perbedaan kandungan kimia yang dapat mempengaruhi khasiat dan keamanan bahan baku obat bahan alam. Menurut Sari dan Susilowati (2023), waktu panen terbaik daun kumis kucing pada pukul 17.00-18.00 WIB dan menghasilkan flavonoid sebesar 4,423 mg QE/g. Daun yang akan menjadi bahan baku obat bahan alam dilakukan perlakuan pasca panen seperti sortasi basah, pencucian, pengeringan dan sortasi kering. Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing kemudian dilakukan pencucian untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang masih menempel. Daun selanjutnya dikeringkan dengan oven dengan suhu 45 °C kemudian dilakukan sortasi kering yang berfungsi untuk memisahkan kotoran, bahan

asing dan simplisia yang rusak sehingga mendapatkan simplisia kering yang bermutu baik (BPOM, 2023).

Karakteristik daun harendong bulu yang digunakan sebagai bahan penelitian yaitu daun muda yang berwarna hijau cerah. Daun muda dipilih karena mampu memproduksi metabolit sekunder yang tinggi. Hal ini juga dipengaruhi oleh tempat tumbuh, harendong bulu yang digunakan penelitian ini terdapat di Taman Nasional Gunung Merapi yang memiliki tanah vulkanik sehingga tanah tersebut adalah tanah yang subur yang mengandung unsur magnesium dan kalium. Hal ini sesuai dengan pernyataan BPOM (2023) bahwa, daun yang baik digunakan sebagai obat bahan alam adalah daun yang muda dan memiliki tempat tumbuh yang tinggi sehingga laju transpirasi tanaman baik dan terpapar sinar matahari lebih banyak serta dengan tanah sebagai tempat tumbuh menjadi sumber nutrisi bagi tumbuhan.

C. Standardisasi Simplisia

Standardisasi merupakan suatu kegiatan untuk menjamin mutu dan kualitas yang baik dari suatu bahan baku obat tradisional yang akan dibuat sediaan (Prabowo dkk., 2019). Simplisia merupakan bahan baku alami yang telah dikeringkan dan dalam bentuk serbuk. Jenis-jenis simplisia terdiri dari simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelican atau mineral. Simplisia nabati merupakan simplisia yang berasal dari bagian utuh tumbuhan atau eksudat tanaman (BPOM, 2023).

Standardisasi simplisia merupakan langkah untuk mengetahui mutu dan kualitas simplisia yang akan dilakukan pengujian. Standardisasi simplisia dilakukan untuk menjaga stabilitas, keamanan dan mempertahankan konsistensi kandungan senyawa aktif pada simplisia. Standardisasi simplisia terdiri dari dua parameter yaitu parameter spesifik dan parameter non-spesifik. Parameter spesifik terdiri dari identitas simplisia, kadar sari terlarut pada pelarut tertentu. Parameter non spesifik terdiri dari susut pengeringan, kadar abu (kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam), kadar air (Andasari dkk., 2021).

Kadar sari terlarut air dan etanol adalah uji untuk mengetahui jumlah senyawa yang terkandung dalam simplisia dan melihat kelarutan simplisia pada pelarut air dan etanol (Nurhaini dkk., 2020). Standar hasil pada kadar sari larut etanol dan air yaitu $> 30\%$ (Kementerian Kesehatan, 2017). Berdasarkan penelitian Prima dkk. (2023), bahwa hasil pengujian kadar sari larut air pada daun harendong bulu yaitu sebesar 54,33%, sedangkan hasil kadar sari larut etanol daun harendong bulu sebesar 58,58% dan hasil ini sesuai dengan standard Materia Medika Indonesia (1995) yaitu sari larut air $\geq 7\%$, dan sari larut etanol $\geq 3\%$. Analisis fitokimia adalah perlakuan untuk menguraikan senyawa kimia yang terkandung pada tanaman seperti, flavonoid, tanin, fenolik, alkaloid, steroid atau triterpenoid dan saponin (Handayani dkk., 2020).

Pengukuran kadar abu total adalah suatu perlakuan untuk mengetahui gambaran kandungan mineral internal dan eksternal dari proses awal sampai

terbentuknya ekstrak dengan cara bahan dipanaskan pada temperatur tertentu yang akan membuat senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga yang tertinggal hanya mineral (Dayanti dkk., 2022). Kadar abu total yang semakin tinggi maka semakin tinggi kandungan mineral didalamnya. Standar hasil pada kadar abu yaitu $<7,2\%$ (Departemen Kesehatan RI, 2017). Hasil pengujian kadar abu total pada daun harendong bulu yaitu sebesar $4,07\%$ dan hasil ini sesuai standard $\leq 15\%$ (Prima dkk., 2023).

Pengukuran kadar air adalah suatu perlakuan untuk mengetahui kandungan air dalam simplisia yang dapat dilakukan dengan alat *moizture analyzer*. Kadar air tergantung pada proses dan waktu pengeringan, semakin lama dan semakin kering maka semakin kecil kadar air yang terkandung dalam simplisia (Dayanti dkk., 2022). Standar hasil pada kadar air yaitu $< 10\%$ (Kementerian Kesehatan, 2017). Hasil pengukuran kadar air pada daun harendong bulu yaitu sebesar $7,22\%$ dan hasil ini sesuai standard $\leq 10\%$ (Prima dkk., 2023).

D. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu senyawa kimia dari dalam sampel dengan pelarutnya. Tujuan ekstraksi yaitu untuk mendapatkan senyawa aktif dari simplisia (Zhang dkk., 2018). Prinsip ekstraksi dengan kepolaran yaitu senyawa aktif sampel akan terlarut ke dalam pelarut yang memiliki polaran sama, pelarut polar akan larut dalam pelarut polar dan sebaliknya (Nasyanka dkk., 2020).

Ekstraksi terdapat beberapa metode yaitu tradisional dan modern. Ekstrak tradisional terbagi menjadi dua macam yaitu ekstraksi panas dan dingin. Ekstraksi panas terdiri dari sokletasi, refluks, digesti, dekokta dan infusa sedangkan ekstraksi dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi. Ekstraksi modern terdiri dari ekstrak ultrasonik dan cair superkritis (BPOM, 2023).

Metode ekstraksi perkolasi adalah proses untuk mengekstrak bahan aktif dalam bentuk cair. Prinsip ekstraksi perkolasi adalah simplisia dimasukkan ke alat percolator dan pelarut dialirkan (Tutik dkk., 2022). Ekstraksi perkolasi dibagi lagi menjadi lima yaitu perkolasi konvensional, perkolasi dengan tekanan, perkolasi bertingkat, perkolasi loop, dan *heating mantle*.

Ekstraksi soxhlet adalah ekstraksi padat cair, substansi yang akan diekstrak terdapat dalam campuran yang berbentuk padat kemudian berulang-ulang dengan pelarut yang sama hingga proses ekstraksi selesai. Keuntungan ekstraksi soxhlet yaitu tidak terlalu banyak pelarut yang dipakai, ekstraksi tidak melalui serbuk simplisia tetapi melalui pipa samping. Kelemahan ekstraksi soxhlet yaitu proses ekstraksi lama dan rumit, tidak dapat menggunakan bahan yang bertekstur keras (Triesty dan Mahfud, 2017).

Ekstraksi refluks adalah proses ekstrak dengan bantuan pemanasan. Prinsip ekstraksi refluks yaitu menggunakan pelarut volatil yang akan menguap pada suhu tinggi kemudian menuju kondensor untuk pendinginan, pelarut yang teruap akan turun sehingga pelarut tetap ada selama proses

reaksi berlangsung (BPOM, 2023). Kelemahan ekstraksi refluks yaitu hanya dapat digunakan untuk bahan yang tahan terhadap suhu tinggi (Susanty dan Bachmid, 2016).

Ekstraksi digesti adalah ekstraksi yang hampir sama dengan maserasi tetapi menggunakan suhu panas tetapi tidak mendidih mendidih (BPOM, 2023). Kelemahan ekstraksi digesti yaitu sampel kemungkinan akan rusak karena adanya proses memanaskan sampel secara langsung pada suhu tertentu (Putri dkk., 2022). Ekstraksi dekokta atau infusa adalah proses ekstrak dengan pelarut air atau polar pada suhu 90 °C selama 30 menit (Hadi dkk., 2023). Keuntungan ekstraksi ini yaitu pengerjaan cukup mudah, murah dan sederhana sedangkan kelemahannya yaitu dapat merusak kandungan kimia dalam sampel bahan alam (Rahmawati dkk., 2023).

Ekstraksi ultrasonik adalah proses ekstraksi dengan alat instrumen yang menggunakan gelombang ultrasonik. Keuntungan ekstraksi ini yaitu hemat waktu, pelarut dan bahan atau partikel kontak langsung dengan gelombang ultrasonik yang berfungsi sebagai pengadukan (Febrianto dan Chakim, 2019). Ekstraksi cair superkritis adalah proses ekstraksi yang memanfaatkan fluida superkritis sebagai pelarut. Contoh fluida kritis seperti amonia, karbon dioksida, nitrogen oksida. Keuntungan ekstraksi ini yaitu pelarut fluida dapat di daur ulang, waktu lebih singkat dan kemurnian lebih tinggi (Sondari dkk., 2018).

Metode ekstraksi yang dipilih pada penelitian ini yaitu maserasi karena ekstraksi ini paling sederhana dengan proses merendam sampel pada suhu

kamar yaitu 25-27°C dengan pelarut yang sesuai (Leba, 2017). Ekstraksi maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi konvensional dengan cara dingin atau dalam suhu ruang tanpa adanya peningkatan suhu atau pemanasan (Zhang dkk., 2018). Prinsip ekstraksi maserasi yaitu memasukkan simplisia tanaman yang telah menjadi serbuk halus dan pelarut yang sesuai pada wadah *inert* lalu ditutup rapat dan diletakkan pada suhu ruang serta adanya pengadukan yang berulang agar mempercepat waktu larutan penyari dalam mengekstraksi (Handoyo, 2020). Kelebihan ekstraksi maserasi yaitu tidak terjadi kerusakan senyawa bioaktif karena tidak ada pemanasan. Kekurangan ekstraksi maserasi yaitu waktu yang digunakan cukup lama dan membutuhkan pelarut dalam jumlah banyak (Chairunnisa dkk., 2019).

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi, hal-hal yang harus diperhatikan saat ekstraksi yaitu rasio bahan baku dengan pelarut, suhu, kecepatan pengadukan, waktu maserasi (BPOM, 2023). Metode ekstraksi maserasi atau perendaman selama 48 jam. Waktu 48 jam efektif karena waktu yang tepat untuk pertemuan antara pelarut dan padatan, jika >48 jam akan membuat larutan terlalu jenuh sehingga senyawa target tidak maksimal tidak tertarik sempurna (Chairunnisa dkk., 2019). Suhu 27 °C dan kecepatan pengocokan 140 rpm dapat membantu pemecahan sel tanaman yang diakibatkan oleh adanya pemasan dan tumbukan sehingga sehingga senyawa aktif akan larut dalam solven (Asworo dan Widwiasuti, 2023).

Pelarut adalah bahan yang penting untuk melakukan proses pemisahan bahan atau sampel dari kandungan lain yang tidak diinginkan. Pelarut yang

pada penelitian ini yaitu etanol karena etanol tidak bersifat toksik sehingga aman digunakan dan etanol juga banyak digunakan untuk mengekstrak senyawa pada tumbuhan (Hidayah dkk., 2016). Etanol merupakan pelarut yang masuk dalam kategori GRAS (*Generally Recognized as Safe*) oleh FDA (*Food and Drug Administration*) (Gad dan Sullivan, 2014). Kelebihan pelarut Etanol 70% juga memiliki keefektifan untuk menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal (Andriani dan Murtisiwi, 2020). Etanol 70% digunakan sebagai pelarut ekstraksi harendong bulu daun, batang, akar, buah dan bunga menghasilkan rendemen sebesar 18,5%, 12,4%, 11,2% dan 16,8% (Patricia, 2022).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses ekstraksi yaitu penyiapan bahan sebelum ekstraksi, jenis pelarut, waktu, suhu, pengadukan (agitasi) dan proses pemisahan pelarut dari hasil ekstraksi. Penyiapan bahan sebelum ekstraksi untuk memastikan bahan memiliki ukuran yang kecil sehingga luas permukaan menjadi lebih besar dan dapat mempermudah kontak dengan pelarut serta mempercepat difusi senyawa. Jenis pelarut berhubungan dengan polaritas pelarut yang harus sesuai dengan sifat senyawa (*like dissolves like*) dan titik didih pelarut akan mempengaruhi proses penguapan pada tahap akhir proses ekstraksi. Waktu ekstraksi yang cukup, suhu yang sesuai, dan pengadukan akan memaksimalkan transfer senyawa ke dalam pelarut. Proses pemisahan pelarut dari hasil ekstraksi mempengaruhi pada proses penguapan yang biasanya menggunakan *rotary evaporator* (energi gerak dan panas), suhu yang diatur sesuai suhu titik didih pelarut kemudian pelarut

akan menguap kebagian kondensor dan kondensor akan mendinginkan uap pelarut yang kemudian uap pelarut tersebut tertampung di labu penampung (Evama dkk., 2021).

E. Fraksinasi

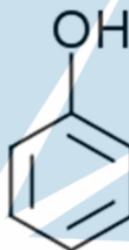
Fraksinasi merupakan proses pemisahan komponen senyawa kimia berdasarkan dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Proses pemisahan tersebut dapat dipengaruhi karena adanya sifat senyawa yang mampu larut dalam air dan mampu larut dalam pelarut organik. Proses fraksinasi untuk mendapatkan fraksi ekstrak yang memiliki senyawa yang lebih spesifik (Nurliyasman dkk., 2022).

Fraksinasi dengan jenis pelarut tingkat kepolaran yang berbeda bertujuan untuk memisahkan senyawa atau komponen berdasarkan sifat kepolarannya. Ekstrak yang digunakan yaitu hasil fraksinasi yang sering disebut fraksi ekstrak (Pratiwi dkk., 2016). Fraksi etil asetat dapat menarik senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid, fenolik, flavonoid, tanin dan alkaloid (Edison dkk., 2020). Fraksi air dapat menarik senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, saponin, fenolik dan alkaloid (Pratiwi dan Dewi, 2022).

F. Senyawa Fitokimia

Senyawa fitokimia merupakan ilmu yang mempelajari sifat dan interaksi senyawa kimia dalam tumbuhan sedangkan skrining fitokimia adalah metode analisis untuk mengetahui keberadaan senyawa kimia dalam

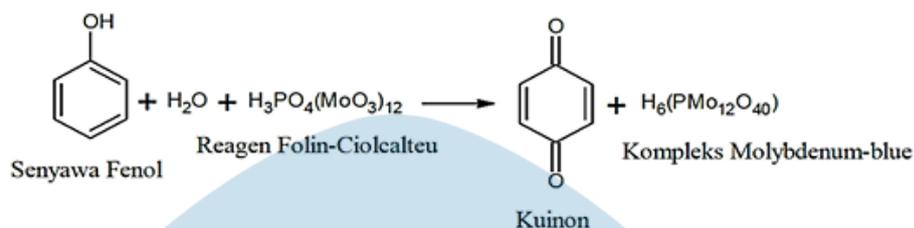
tumbuhan salah satunya golongan fenolik yang didalamnya terdapat flavonoid dan tanin. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang sangat banyak terdapat pada tumbuhan dan memiliki gugus hidroksil yang terikat dengan struktur cincin aromatik yaitu benzena (Gambar 2). Senyawa fenolik pada tumbuhan banyak ditemukan dalam bentuk ester atau glikosida (Vermerris dan Nicholson, 2008). Contoh senyawa fenolik adalah flavonoid, tanin, asam fenolik, lignan, xanton, kuinon, isoflavon, flavon, flavonol, kurkumin (Sun dan Shahrajabian, 2023).



Gambar 2. Struktur Fenol (Zagoskina dkk., 2023)

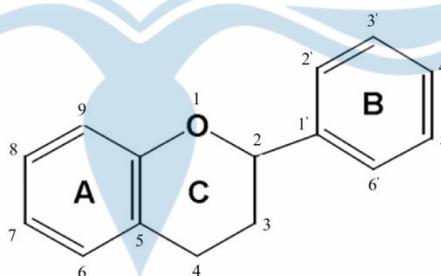
Asam galat adalah larutan standar yang digunakan pada analisis senyawa fenolik karena memiliki sifat yang stabil. Analisis fitokimia kuantitatif fenolik dilakukan dengan mereaksikan *Folin-Ciocalteu* dengan sampel sehingga akan membentuk suasana basa yang menyebabkan senyawa fenolik terikat dengan reagen *folin* dan terjadi disosiasi proton fenolik menjadi ion fenolik. Reaksi suasana basa yang terjadi membentuk campuran larutan yang nilai serapannya dapat diukur (Yulianti dkk., 2020). Mekanisme senyawa fenolik dengan *Folin-Ciocalteu* yaitu reagen *Folin-Ciocalteu* memiliki campuran asam fosfomolibdat ($H_3PMO_{12}O_{40}$) dan asam fosfotungstat ($H_3PW_{12}O_{40}$) akan menerima elektron dari senyawa fenolat kemudian ion molibdat (Mo^{6+}) dan ion tungstat (W^{6+}) akan mereduksi bentuk

Mo^{5+} dan W^{5+} (molybdenum tungsten) yang menghasilkan warna biru (Yulianti dkk., 2020).



Gambar 3. Reaksi Senyawa Fenol dengan Reagen *Folin-Ciocalteu* (Mukhriani dkk., 2019)

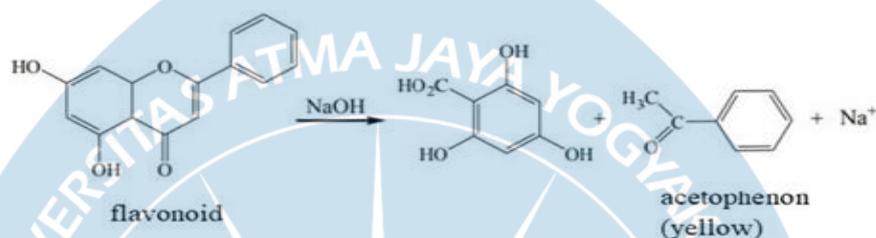
Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang banyak terdapat pada jaringan tumbuhan (Gambar 4). Flavonoid terdiri dari 15 atom karbon yang terbagi menjadi 2 gugus yaitu rantai alifatik dan gugus benzena. Flavonoid termasuk dalam senyawa polar yang mampu larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol dan butanol. Pelarut yang bersifat polar dengan campuran air adalah pelarut yang cocok untuk menarik flavonoid dengan ikatan glikosida (Khairan dkk., 2023).



Gambar 4. Struktur Senyawa Flavonoid (Alkhalidy dkk., 2018)

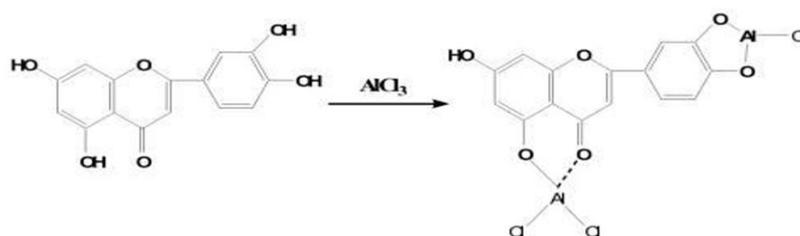
Pengujian fitokimia kualitatif flavonoid menggunakan metanol 30% dan NaOH. Metanol 30% berfungsi untuk mengekstrak dan melarutkan bermacam-macam senyawa flavonoid yang terdapat pada ekstrak tanaman. Penambahan NaOH berfungsi untuk menunjukkan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak yang digunakan yang ditandai dengan adanya reaksi warna

kuning (Fransina dkk., 2019). Reaksi perubahan warna kuning terjadi karena ionisasi dengan cara NaOH memutus ikatan pada cincin C dan menghasilkan dua fragmen, fragmen pertama senyawa asetofenon yang terbentuk dari cincin B dan C flavonoid, fragmen kedua terbentuk dari cincin A flavonoid (Gambar 5).



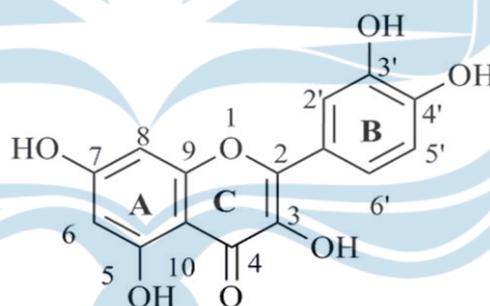
Gambar 5. Reaksi Flavonoid dengan NaOH (Fransina dkk., 2019).

Kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol yang digunakan sebagai larutan baku dalam pengukuran kadar total flavonoid suatu sampel. Konsentrasi larutan baku yang semakin tinggi akan menyebabkan semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh. Analisis fitokimia kuantitatif flavonoid dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan aluminium klorida (Gambar 6) dan asam asetat untuk mendapatkan panjang gelombang yang visibel sehingga mampu diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Styawan dan Rohmanti, 2020).



Gambar 6. Reaksi Flavonoid dengan Aluminium klorida (AlCl₃) (Makuasa dan Ningsih, 2020)

Reaksi antara flavonoid dengan aluminium klorida terjadi pada gugus hidroksil (-OH) pada cincin flavonoid yang berinteraksi dengan ion Al^{3+} dari $AlCl_3$ yang membentuk kompleks logam-ligan. Oksigen dari gugus hidroksil (-OH) pada flavonoid berperan sebagai donor elektron sehingga akan membentuk kompleks flavonoid - $AlCl_3$ yang mampu warna kuning hingga oranye (Makuasa dan Ningsih, 2020). Struktur kuersetin (Gambar 7) memiliki cincin aromatik yaitu cincin A, B, C dan terdapat gugus hidroksil. Cincin A adalah bagian struktur benzen yang terdapat dua gugus hidroksil (-OH) pada posisi 5 dan 7, cincin B adalah cincin aromatik yang memiliki gugus hidroksil posisi 3' dan 4', dan cincin C adalah cincin yang menghubungkan cincin A dan B melalui ikatan dua karbon pada posisi 3.



Gambar 7. Struktur Kuersetin (Magar dan Sohng, 2020)

Senyawa tanin merupakan senyawa polifenol yang terdiri dari gugus hidroksil dan karboksil. Senyawa tanin pada tumbuhan dapat dibedakan menjadi dua yaitu terkondensasi dan terhidrolisis. Tanin terkondensasi terbentuk dari reaksi kondensasi antar flavonoid sedangkan tanin terhidrolisis terbentuk dari reaksi esterifikasi asam fenolat dan gula (Khairan dkk., 2023). Analisis fitokimia kualitatif tanin menggunakan $FeCl_3$. Senyawa tanin terhidrolisis pada sampel akan bereaksi dengan $FeCl_3$ sehingga terjadi

perubahan warna biru kehitaman sedangkan senyawa tanin terkondensasi menghasilkan perubahan warna coklat kehitaman (Soamole dkk., 2018).

Asam tanat merupakan golongan tanin terhidrolisis yang digunakan sebagai larutan standar pembanding pada analisis kadar total tanin suatu sampel. Analisis fitokimia kuantitatif tanin menggunakan *Folin Ciocalteu* dan natrium karbonat. Senyawa tanin pada sampel direaksikan dengan *Folin Ciocalteu* dan natrium karbonat akan menghasilkan reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi membuat terbentuknya kompleks warna dan sampel terbaca oleh spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang visibel (Fatonah dkk., 2021).

Reagen yang digunakan pada uji tanin yaitu *Folin Ciocalteu* yang berfungsi untuk memunculkan reaksi reduksi oksidasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fatonah dkk. (2021), bahwa reaksi reduktor yang berperan yaitu senyawa tanin sedangkan yang berperan sebagai oksidator yaitu *Folin Ciocalteu*. Reaksi oksidasi yang menyebabkan adanya hasil warna biru sehingga terbaca oleh panjang gelombang maksimum. Pernyataan ini juga didukung oleh Hartati dan Noer (2020), bahwa reaksi oksidasi tersebut dapat terjadi karena fosmolibdat dalam *Folin Ciocalteu* berubah menjadi fosmolibdenim atau warna biru sehingga mampu menyerap sinar UV.

G. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode kromatografi sederhana untuk memisahkan berbagai senyawa. Prinsip pemisahan KLT adalah pemisahan berdasarkan fase diam, fase gerak, interaksi senyawa dan

retention factor (R_f). Fase diam adalah lapisan tipis sebagai material penyerap larutan seperti *silika gel* atau aluminium sedangkan fase gerak adalah pelarut atau campuran pelarut yang bergerak ke atas plat melalui proses kapilaritas. Kromatografi lapis tipis pada prinsipnya terdiri dari fase gerak (eluen) yang berbentuk cair sedangkan fase diam berbentuk padat dan menggunakan luas permukaan yang tinggi agar memudahkan fase gerak terdorong ke atas melalui fase diam (plat yang dibasahi larutan) (Sayed, 2021). Menurut Asfiah dan Supaya (2020) menunjukkan prinsip pemisahan senyawa pada kromatografi lapis tipis yaitu berdasarkan tingkat polaritas antar sampel ekstrak dengan eluen.

Pemisahan yang terjadi karena perbedaan interaksi antara campuran pelarut dengan fase diam dan fase gerak. Senyawa yang lebih polar berinteraksi lebih kuat dengan fase diam sehingga bergerak lebih lambat sedangkan senyawa non-polar berinteraksi lebih besar dengan fase gerak dan akan bergerak lebih cepat. Penggunaan KLT pada skrining fitokimia karena sederhana, murah dan dapat dianalisis secara cepat (Cairns, 2003).

Fase normal atau *normal phase chromatography* terdiri dari fase diam yang bersifat polar, fase gerak yang bersifat non-polar atau sedikit polar, senyawa yang tertahan pada silika adalah senyawa polar, dan senyawa yang terelusi cepat adalah senyawa non-polar. Kepolaran fase terbalik atau *reverse phase chromatography* terdiri dari fase diam yang bersifat non-polar, fase gerak yang bersifat polar, senyawa yang tertahan pada silika adalah senyawa non-polar, dan senyawa yang terelusi cepat adalah senyawa polar (Engel dkk.,

2019). Kromatografi lapis tipis dapat menjadi sarana untuk uji fitokimia kualitatif karena dapat mengidentifikasi senyawa kimia dengan melihat keberadaan senyawa tersebut berdasarkan bercak yang terbentuk. Mengidentifikasi senyawa yang terpisah pada kromatografi lapis tipis dapat menggunakan harga R_f (*Retention factor*). Nilai R_f menggambarkan jarak migrasi senyawa. Nilai R_f yang dapat mengidentifikasi senyawa yaitu berkisar antara 0,00–1,00 dan nilai R_f terbaik berkisar antara 0,2 – 0,8 (Waksmundzka-Hajnos dkk., 2022).

Identifikasi senyawa dilakukan dengan lampu UV 254 dan 366 nm (Forestryana dan Arnida, 2020). KLT diamati pada panjang gelombang 254 dan 366 untuk mendeteksi berbagai jenis senyawa organik yang menyerap sinar ultraviolet (UV) pada rentang panjang gelombang tersebut. Panjang gelombang 254 nm berguna untuk mendeteksi senyawa aromatik seperti fenolik, alkaloid dan flavonoid dan untuk melihat bercak gelap di atas pelat fluoresen. Panjang gelombang 366 nm berguna untuk senyawa yang berfluoresen yang tidak terlihat pada 254 nm, mendeteksi senyawa-senyawa tertentu yang memancarkan cahaya fluoresen seperti bercak terang dan senyawa yang dapat terdeteksi pada panjang gelombang 366 nm salah satunya adalah flavonoid (Solihah dkk., 2019).

Pengujian kromatografi lapis tipis menggunakan bejana yang berisi eluen yang harus dijenuhkan dan ditutup. Tujuan eluen dijenuhkan dan harus penutup harus ditutup yaitu agar pelarut yang digunakan tidak menguap. Jika pelarut tidak jenuh maka akan menyebabkan fase gerak akan cepat menguap

sehingga bercak tidak terbentuk sempurna sedangkan jika pelarut jenuh maka pada memisahkan senyawa-senyawa dengan baik, proses penguapan fase gerak lebih optimal dan menghasilkan bercak yang bulat sempurna. Plat fase diam diberi perlakuan penyemprotan dengan AlCl_3 yang berfungsi sebagai pereaksi agar bercak yang terdapat plat lebih terlihat jelas (Oktapiya dkk., 2022). Penotolan sampel ekstrak dilakukan dengan ukuran kecil yang bertujuan agar tidak terjadi pelebaran noda (Samosir dkk., 2018).

H. Toksisitas

Toksisitas merupakan tingkat respon suatu zat yang memberikan efek toksik terhadap suatu organisme. Uji toksisitas merupakan pengujian untuk mendeteksi efek toksik, mengamati keamanan serta aktivitas farmakologi dari senyawa kimia pada suatu bahan yang kontak langsung dengan organ seperti mata, kulit, saluran pencernaan yang menyebabkan kerusakan jaringan dan kematian pada sel-sel (Sulastra dkk., 2020). Toksisitas bermanfaat pada bidang pengobatan yaitu untuk menilai potensi dan efek berbahaya dari bahan baku yang digunakan (Sartinah dkk., 2020).

Pengujian BSLT pada ekstrak etanol dan ekstrak fraksi etil asetat dan fraksi air dari kulit batang kemiri menunjukkan hasil yang toksik. Ekstrak etanol dan ekstrak fraksi dari kulit batang kemiri menghasilkan aktivitas toksik karena nilai $\text{LC}_{50} < 1000$ ppm. Ekstrak etanol menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 35,74 dan menunjukkan aktivitas yang sangat toksik, ekstrak fraksi etil asetat menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 17,102 dan menunjukkan aktivitas

yang sangat toksik sedangkan ekstrak fraksi menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 378,532 dan menunjukkan aktivitas yang toksik (Windyaswari dkk., 2015).

Toksisitas dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti fisikokimia polutan, waktu dan cara paparan, faktor lingkungan dan faktor biologis. Uji toksisitas akut adalah pengujian untuk menentukan efek toksik dari senyawa yang terjadi dalam waktu singkat dengan paparan tunggal sedangkan toksisitas kronis adalah pengujian efek toksik dari bahan yang digunakan dalam jangka waktu lama mulai dari >3 bulan bahkan tahun dengan paparan berulang (Sartinah dkk., 2020). Konsentrasi adalah banyaknya jumlah zat terlarut dalam suatu larutan. Dosis adalah takaran sampel larutan pengujian yang diberikan ke hewan percobaan (Fadli dkk., 2019).

Lethal Concentration 50% (LC_{50}) merupakan konsentrasi sampel yang menyebabkan mortalitas sebesar 50% pada populasi hewan uji. LC_{75} merupakan konsentrasi sampel yang menyebabkan mortalitas sebesar 75% pada populasi hewan uji. *Lethal Concentration 90%* (LC_{90}) merupakan konsentrasi sampel yang menyebabkan mortalitas sebesar 90% pada populasi. *Lethal Concentration 100%* (LC_{100}) merupakan konsentrasi sampel yang menyebabkan mortalitas sebesar 100% pada populasi. Prosedur uji dilakukan dengan menentukan nilai LC_{50} dari komponen aktif tanaman terhadap *Artemia salina* (Hertika dan Putra, 2019). Klasifikasi tingkat toksisitas menurut Mingsonge dkk. (2015), dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi tingkat LC_{50} dalam uji toksisitas (Mingsonge dkk., 2015)

Kategori	Nilai LC_{50} (ppm)
Amat Sangat Toksik	<1
Sangat Toksik	1 – 100

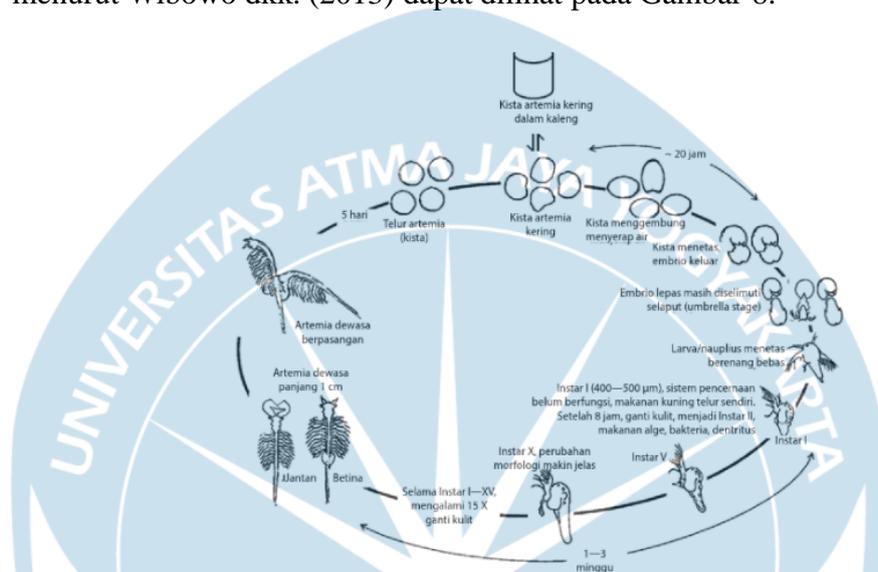
Toksik	100 – 200
Toksik Moderat	200 – 500
Toksik Rendah	500 – 1000
Relatif Tidak Toksik	>1000

Uji toksisitas yang dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang merupakan pengujian atau skrining untuk mengetahui tingkat ketoksikan dari suatu senyawa. Prinsip pengujian dilakukan dengan memberi ekstrak dalam konsentrasi bertingkat pada kelompok hewan uji dan indikasi adanya toksisitas dengan penghitungan jumlah hewan yang mati (Sumardi dkk., 2023). *Artemia salina* digunakan sebagai hewan uji karena memiliki persamaan dengan manusia yaitu adanya sel, jaringan, organ, sistem organ dan individu. *Artemia salina* digunakan sebagai pengujian toksisitas akut karena waktu pengujian selama 24 jam dan syarat pengujian toksisitas yaitu adanya indikasi kematian dari hewan uji karena pemberian konsentrasi bertingkat dari senyawa atau sampel sehingga dapat menyebabkan kematian 50% populasi. Klasifikasi dari larva udang menurut Surya (2018) sebagai berikut.

Kerajaan : Animalia
 Divisi : Arthropoda
 Subdivisi : Crustacea
 Kelas : Branchiopoda
 Bangsa : Anostraca
 Suku : Artemiidae
 Marga : *Artemia*
 Spesies : *Artemia salina*

Penetasan telur terjadi karena enzim trehalose aktif dan membuat telur yang akan berkembang menjadi larva. Enzim trehalose merupakan enzim yang berfungsi untuk melakukan pembelahan sel, mempercepat proses

metabolisme dan pembentukan dinding sel. Enzim trehalose stabil terhadap perubahan suhu, pH dan salinitas sehingga disebut *biological stabilizing agent* atau *stress protecting agent* (Sedijani, 2014). Siklus hidup *A. salina* menurut Wibowo dkk. (2013) dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Siklus hidup *Artemia salina*

Siklus hidup *A. salina* diawali dengan penetasan telur (kista) menjadi larva (*nauplius*). Larva akan berkembang menjadi Instar I (400-500 mikrometer) tetapi belum memiliki sistem pencernaan yang sempurna, instar I berkembang menjadi Instar V. Perkembangan selanjutnya menjadi Instar X yang jelas bentuknya, selama perkembangan dari Instar I-XV mengalami 15 kali pergantian kulit (Wibowo dkk., 2013).

Telur *A. salina* direndam untuk melihat kualitas terbaik. Jika telur direndam dan mengapung maka telur dibuang karena telur yang baik digunakan yaitu telur yang tenggelam. Telur mengapung artinya tidak mengandung embrio larva udang sedangkan telur yang tenggelam menandakan adanya embrio (Wibowo dkk., 2013).

Artemia salina menetas selama 48 jam setelah perendaman di dalam air garam non iodium, jika terdapat iodium mempengaruhi kematian hewan uji. Derajat keasaman diatur pada pH 7,3-8,4 sehingga mampu mengaktifkan enzim penetasan telur menjadi larva. Jika pH dibawah 7 dan diatas 8,4 maka telur tidak akan menetas. Berikut larva *A. salina* terdapat pada Gambar 9.



Gambar 9. Larva *Artemia salina* perbesaran 70 μm (Pecararo dkk., 2020).

I. Hipotesis

1. Ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi air daun harendong bulu mengandung metabolit sekunder flavonoid, fenolik dan tanin.
2. Nilai LC_{50} ekstrak etanol 70%, fraksi etil asetat dan fraksi air daun harendong bulu lebih dari 1000 ppm.