

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI**



**METABOLIT SEKUNDER DARI TUMBUHAN *Chisocheton* (Meliaceae)
DI SULAWESI UTARA SERTA AKTIVITAS SITOTOKSIKNYA
TERHADAP SEL MURIN LEUKEMIA P-388**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Dr. Drs. Dewa Gede Katja, M.Si NIDN : 0020126006 (Ketua Peneliti)
Dr. Henry Fonda Aritonang, S.Si, M.Si NIDN : 0007127103 (Anggota Peneliti)
Ir. Audy D. Wuntu, M.Si NIDN : 002112606 (Anggota Peneliti)**

**Dibiayai oleh :
Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2018
Nomor : 087/SP2H/LT/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS SAM RATULANGI
MANADO
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : METABOLIT SEKUNDER DARI TUMBUHAN
Chisocheton (Meliaceae) DI SULAWESI UTARA
SERTA AKTIVITAS SITOTOKSIKNYA TERHADAP
SEL MURIN LEUKEMIA P-388

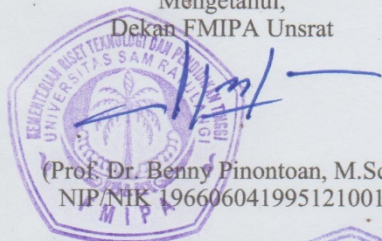
Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Drs DEWA GEDE KATJA, M.Si
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi
NIDN : 0020126006
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 081314923544
Alamat surel (e-mail) : dewakatja@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr HENRY FONDA ARITONANG S.Si, M.Si
NIDN : 0007127103
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

Anggota (2)
Nama Lengkap : Ir AUDY DENNY WUNTU M.Si
NIDN : 0021126906
Perguruan Tinggi : Universitas Sam Ratulangi

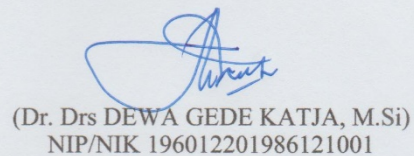
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 97,380,000
Biaya Keseluruhan : Rp 575,882,800

Mengetahui,
Dekan FMIPA Unsrat



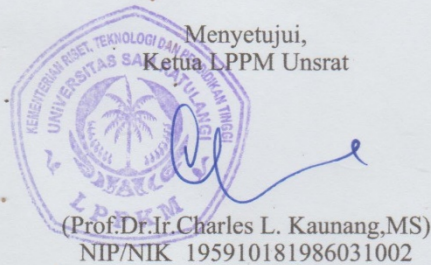
(Prof. Dr. Benny Pinontoan, M.Sc.)
NIP/NIK 196606041995121001

Kota Manado, 5 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr. Drs DEWA GEDE KATJA, M.Si)
NIP/NIK 196012201986121001

Menyetujui,
Ketua LPPM Unsrat



(Prof. Dr. Ir. Charles L. Kaunang, MS)
NIP/NIK 195910181986031002

RINGKASAN

Tumbuhan *Chisocheton* merupakan tumbuhan tingkat tinggi yang termasuk famili Meliaceae dan terdistribusi luas di daerah Asia Tenggara. Tumbuhan dari famili Meliaceae dikenal sebagai tumbuhan penghasil senyawa-senyawa aktif yang bersifat antikanker, antimalaria, antiviral, antioksidan, antibakteri, antimikroba, isektisida dan sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388.

Hasil penelitian pendahuluan untuk mencari bahan-bahan kimia yang berguna dari tumbuhan tropis Indonesia, diperoleh hasil bahwa ekstrak *n*-hexana *Chisocheton celebicus* menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap sel murin leukemia P-388. Dengan demikian tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan senyawa-senyawa kimia baru yang memiliki aktivitas sitotoksik, antikanker, antimalaria, insektisidal dan antifeedan, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat maupun sebagai pestisida alami. Peluang untuk memperoleh senyawa-senyawa kimia dengan aktivitas tertentu dari tumbuhan *Chisocheton* Indonesia sangat besar, mengingat tumbuhan *Chisocheton* ini masih sedikit kajian fitokimianya.

Penelitian ini dirancang tiga tahun. Tahun pertama ditargetkan untuk mendapatkan tumbuhan *Chisocheton* di Sulawesi Utara dari famili Meliaceae untuk menggali informasi bagaimana masyarakat memanfaatkan keanekaragaman tumbuhan ini untuk pengobatan. Target tahun kedua dilakukan dengan metode maserasi, uji fitokimia dan uji aktivitasnya. Tahun ketiga ditargetkan untuk menganalisis aktivitasnya, isolasi senyawa aktif, elusidasi struktur serta studi pembuatan formulasi untuk pemanfaatannya dibidang kesehatan.

Target penelitian tahun pertama berhasil dilakukan yakni mendapatkan tumbuhan spesies *Chisocheton* yang tumbuh di Sulawesi utara, dideterminasi, diekstrak, uji fitokimia serta uji aktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388.

Kata Kunci : Meliaceae, *chisocheton*, sitotoksik, leukemia-388, fitokima.

Prakata

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas hidayahNya, kami dimampukan untuk melaksanakan penelitian ini dan saat ini telah merampungkan laporannya. Penelitiann merupakan salah satu bagian dari Tridharma Perguruan Tinggi yang meliputi pendidikan, penelitian dan pengabdian kepada masyarakat. Pelaksanaan penelitian merupakan kepercayaan yang diberikan dan kerja sama yang baik telah disumbangkan oleh banyak pihak.

Laporan akhir tahun ke-1 dari rencana 3 tahun pelaksanaannya disusun dalam rangka pertanggung jawaban kegiatan yang sudah dilaksanakan, yaitu Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) dengan judul : **Metabolit Sekunder Dari Tumbuhan *Chisocheton* (Meliaceae) Di Sulawesi Utara Serta Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel Murin Leukemia P-388.**

Penelitian ini terlaksana berkat dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Nomor : 087/SP2H/LT/DRPM/2018 tanggal 21 April 2018. Oleh karena itu dengan terlaksananya kegiatan penelitian ini, saya mengucapkan limpah terimakasih kepada yang terhormat Kemenristekdikti, Rektor Universitas Sam Ratulangi, Ketua dan Sekretaris LPPM dan Dekan FMIPA atas segala perhatian dan kerjasamanya.

Demikian laporan akhir penelitian ini saya buat dan semoga dapat bermanfaat.

Manado, November 2018
Penyusun,

Dr. Dewa G. Katja, M.Si

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Pengesahan	i
ABSTRAK	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian	1
1.2. Maksud dan Tujuan Penelitian	2
1.3. Kegunaan Penelitian	3
1.4. Urgensi (Keutamaan) Penelitian	3
1.5. Rencana Target Capaian Tahunan	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tumbuhan Meliaceae	4
2.2 Kandungan Kimia Genus <i>Chisocheton</i>	4
2.3 <i>State of the art</i>	8
2.4. Studi Pendahuluan yang Telah Dilakukan	8
2.5. Road Map Penelitian	8
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1 Tujuan Penelitian	10
3.2 Manfaat Penelitian	10
3.3 Target Penelitian	10
BAB IV METODE PENELITIAN	11
4.1. Tempat Penelitian	11
4.2. Bahan dan Alat	11
4.3 Bagan Alir Penelitian	12
4.4 Indikator Capaian Penelitian	13
4.5. Penyiapan Bahan Tumbuhan	14
BAB V HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	16
BAB VI RENCANA TAHAP BERIKUTNYA	17
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	18
DAFTAR PUSTAKA	19
ARTIKEL ILMIAH (Draff)	22
SERTIPIKAT (Presenter, in International Seminar on Natural Products Chemistry. Bandung , 12-13 September 2018)	30

SERTIPIKAT (Poster Presenter, International Conference of The Indonesian Chemical Society. Jayapura 26-27 September 2018

31

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Sejak awal dari peradaban manusia mengakui bahwa bahan alami (*natural product*) telah diketahui khasiatnya sebagai obat, dan dapat digunakan untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit kronis maupun untuk meningkatkan kualitas hidup masyarakat. Salah satu penyakit kronis yang berakibat kematian adalah penyakit kanker, dikarenakan lebih dari tujuh juta jiwa penduduk dunia meninggal setiap tahunnya akibat menderita kanker (Jemal *et al.*, 2011). Data dari *Internasional Union Against Cancer* (UIAC) menunjukkan pada tahun 2008 terdapat 12,4 juta jiwa meninggal akibat kanker dan 4,8 juta jiwa hidup bersama kanker. Diperkirakan setiap tahun terjadi peningkatan penderita kanker yang signifikan, sehingga upaya pencarian obat-obat alami untuk menanggulangi kanker terus dilakukan.

Salah satu usaha untuk menanggulangi penyakit kanker adalah menggali obat tradisional yang bersumber dari berbagai jenis tumbuhan tropis dan subtropis yang berkhasiat sebagai obat. *National Cancer Institute* (NCI) Amerika Serikat telah menguji lebih dari 275.000 jenis ekstrak bahan alam dan terbukti dapat mengobati penyakit kanker (Jemal *et al.*, 2011).

Indonesia dengan iklim tropis merupakan satu dari tujuh Negara “megadiversity” yang kaya dengan keanekaragaman hayati dan merupakan “reservoir” bagi bahan-bahan kimia yang potensial sebagai obat, antioksidan maupun sebagai bahan baku industri. Berkaitan dengan pemanfaatan dan pendataan potensi sumber daya hayati pencarian bahan kimia dimaksud, perlu dioptimalkan dan dilaksanakan secara teratur dan terarah. Peranan metabolit sekunder yang beraneka ragam jenisnya mempunyai efek farmakologis yang dapat dimanfaatkan oleh manusia sebagai obat dan kegunaan lain (Achmad *et al.*, 2005).

Tumbuhan Meliaceae hanya tumbuh di daerah tropis dan sub tropis merupakan salah satu kekayaan tumbuhan Indonesia. Famili ini telah dikenal sebagai tumbuhan penghasil senyawa-senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker, antimalaria, antiviral, antioksidan, antibakteri, antimikroba, antiinflamasi dan senyawa insektisida (Heyne, 1987). Senyawa aktif yang berhasil diisolasi dari famili meliaceae adalah spesies *Aglaia smithii* dari kulit batang mengandung senyawa 3-epiokotilol yang beraktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 (Harneti *et al.*, 2012). Senyawa stigmastan steroid baru, telah diisolasi dari kulit batang *Aglaia eximia* yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 (Harneti *et al.*, 2014). Senyawa rokglaol dan glaiaglabretol yang diisolasi dari *Aglaia crassinervia* teruji bersifat antikanker (Su *et al.*, 2006).

Chisocheton adalah genus Meliaceae, memiliki 50 spesies yang tersebar di daerah Nepal, India, Bhutan, Myanmar, Indo-China, China Selatan, Thailand, Indonesia, Malaysia dan Papua Nugini (Vossen & Umal, 2002). Genus *Chisocheton* dapat menghasilkan senyawa aktif yang

bersifat antikanker, sitotoksik, antitumor, antiinflamasi, antimalaria, antimikroba, antilipid dan apoptosis (Wong *et al.*, 2011; Mohammad *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Awang *et al.*, 2012; Najmuldeen *et al.*, 2012). Senyawa aktif yang berhasil diisolasi dari genus *Chisocheton* adalah ceramisin A, merupakan golongan limonoid baru yang diisolasi dari kulit batang *Chisocheton ceramicus* beraktivitas sedang terhadap aktivitas sitotoksik P-388 (Mohammad *et al.*, 2008). Senyawa triterpenoid yang diisolasi dari daun *Chisocheton marophyllus* memiliki sifat antitumor terhadap sel tumor pada EBV-EA (Inada *et al.*, 1993).

Dalam kegiatan penelitian berkelanjutan kami untuk mencari senyawa kimia yang berguna dari tumbuhan Indonesia khususnya di Sulawesi Utara, roadmead (Gambar 1) telah kami tetapkan sebagai langkah ilmiah yang sistematis dan logis untuk pencarian senyawa-senyawa kimia yang potensial dari sumber daya alam hayati Indonesia khususnya tumbuhan tropika. Dalam kegiatan penelitian berkelanjutan tersebut kami telah mendapatkan hasil, bahwa ekstrak *n*-hexana dari kulit batang *Chisocheton celebicus* menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap sel murin leukemia P-388.

Melalui penelusuran literatur dan laporan penelitian, sampai saat ini belum ditemukan laporan tentang kandungan metabolit sekunder serta aktivitas sitotoksiknya dari tumbuhan *Chisocheton* Sulawesi Utara. Dengan demikian penelitian yang akan dilakukan memiliki peluang untuk mendapatkan senyawa bioaktif baru yang berguna dibidang kesehatan.

1.2. Maksud dan Tujuan Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah mengisolasi senyawa yang beraktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388 dari tumbuhan *Chisocheton* serta pengembangan sebagai obat kanker. Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Menginventarisasi keragaman genus *Chisocheton* yang ada di Sulawesi Utara (target tahun ke-1).
2. Mempelajari secara etnobotani dalam pemanfaatan tumbuhan genus *Chisocheton* sebagai obat (target tahun ke-1).
3. Menganalisis kandungan fitokimia, uji aktivitas sitotoksik, untuk dikembangkan menjadi bahan obat kanker (target tahun ke-2).
4. Menganalisis aktivitasnya, isolasi senyawa aktif dan elusidasi struktur kimianya (target tahun ke-3)
5. Mempelajari pembuatan formulasi untuk pemanfaatannya dibidang kesehatan (target tahun ke-3).

1.3. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini dapat berguna untuk memberikan informasi dan pengetahuan tambahan sebagai :

1. Upaya dalam peningkatan nilai dari tumbuhan genus *Chisocheton* dalam bidang kesehatan.
2. Mengungkap kemotaksonomi tumbuhan *Chisocheton*.
3. Memberikan informasi tentang metabolit sekunder yang beraktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388.

1.4. Urgensi (Keutamaan) Penelitian

Urgensi penelitian ini adalah penemuan senyawa-senyawa kimia baru dari tumbuhan genus *Chisocheton* yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388, yang merupakan skrining awal terhadap senyawa-senyawa yang diduga memiliki sifat antikanker. Disamping itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan kepada masyarakat luas khususnya dalam bidang kesehatan. Luaran penelitian ini akan menghasilkan suatu jurnal yang akan dipublikasikan dalam jurnal Nasional maupun Internasional.

1.5. Rencana Target Capaian Tahunan

Tabel 1. 1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian		
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS ¹⁾	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah	Nasional terakreditasi	wajib	-	draf	terbit	-
2	Publikasi ilmiah	Internasional terakreditasi	wajib	-	-	draf	terbit
3	Pemakalah dalam temu ilmiah	Seminar nasional	-	-	draf	draf	draf
4	Pemakalah dalam temu ilmiah	Seminar internasional	-	-	-	-	draf

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2. 1. Tumbuhan Meliaceae

Tumbuhan Meliaceae adalah tumbuhan kayu yang tumbuh di daerah tropis dan sub tropis, terdiri atas 51 genus, 550 spesies. Hasil penelitian tumbuhan Meliaceae ini, mengandung banyak senyawa aktif yang berpotensi sebagai obat, maupun sebagai pengendali hama tumbuhan seperti : antikanker, sitotoksik, antiinflamasi, insektisida, antimikroba (Su *et al.*, 2010; Harneti *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011; Awang *et al.*, 2012; Manaeerat *et al.*, 2008). Selanjutnya terdapat 50 spesies *Chisocheton* yang tersebar terutama di daerah Nepal, India, Bhutan Myanmar, Indo-China, China Selatan, Malaysia dan Papua Nugini (Vossen & Umali, 2002). Tumbuhan *Chisocheton* terus diteliti, karena kandungan senyawa metabolit sekundernya menunjukkan aktivitas yang menarik dan berkhasiat menyembuhkan penyakit.

Di Indonesia tumbuhan *Chisocheton* menyebar di Sumatra, Kepulauan Anabas, Jawa, Kalimantan, Maluku, Sulawesi dan Papua (Vossen & Umali, 2002). Beberapa spesies dari tumbuhan ini menghasilkan minyak, yang biasanya digunakan sebagai obat pencuci perut, berbau khas (tengik) dan susah untuk dikeringkan. Minyak ini banyak ditemukan pada *Chisocheton petandrus*. Ekstrak minyak ini juga secara komersial digunakan sebagai bahan obat dan kosmetik. Bagian kayu pada *Chisocheton ceramicus* digunakan sebagai bahan kontruksi rumah, sedangkan pada *Chisocheton montanus* banyak digunakan sebagai bahan bangunan rumah, pagar, tongkat kebun dan lain-lain. Bagian kulit batang *Chisocheton morobeanus* dimanfaatkan sebagai racun ikan, dengan cara dilumatkan dan disebarkan ke air. Cara ini sangat efektif untuk membuat ikan pusing beberapa saat (Lim, 2008).

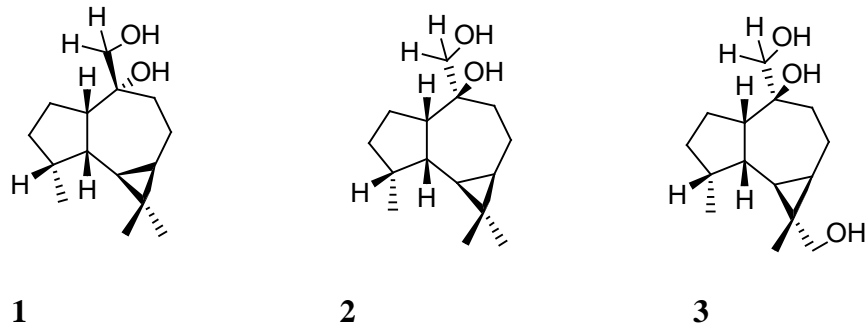
2. 2. Kandungan Kimia Genus *Chisocheton*

Senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari genus *Chisocheton* terdiri atas kelompok seskuiterpen, triterpenoid, limonoid (tetranortriterpenoid), steroid dan fenolik.

1. Seskuiterpen

Penelitian pada genus *Chisocheton* yang telah dilaporkan dari golongan seskuiterpen, yaitu alo-aromadendram-10 α ,14 diol (**1**), alo-aromadendram-10 β , 14 diol (**2**) dan alo-aromadendram-10 β ,13,14-triol (**3**) yang diisolasi dari kayu dan daun *C. penduliflorus*, menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan MIC berturut-turut 100, 50 dan 50 $\mu\text{g/mL}$. (Phongmaykin *et al.*, 2008).

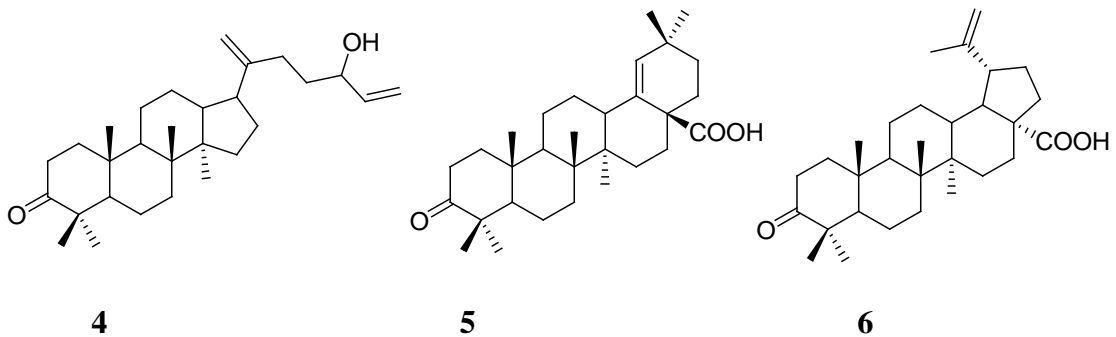
Struktur senyawa **1-3** ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Struktur senyawa seskuiterpen, alo-aromadendram-10 α ,14 diol (**1**), alo-aromadendram-10 β , 14 diol (**2**), dan alo-aromadendram-10 β ,13,14-triol (**3**) dari kayu dan daun *C. penduliflorus* (Phongmaykin *et al.*, 2008).

2. Triterpenoid damaran

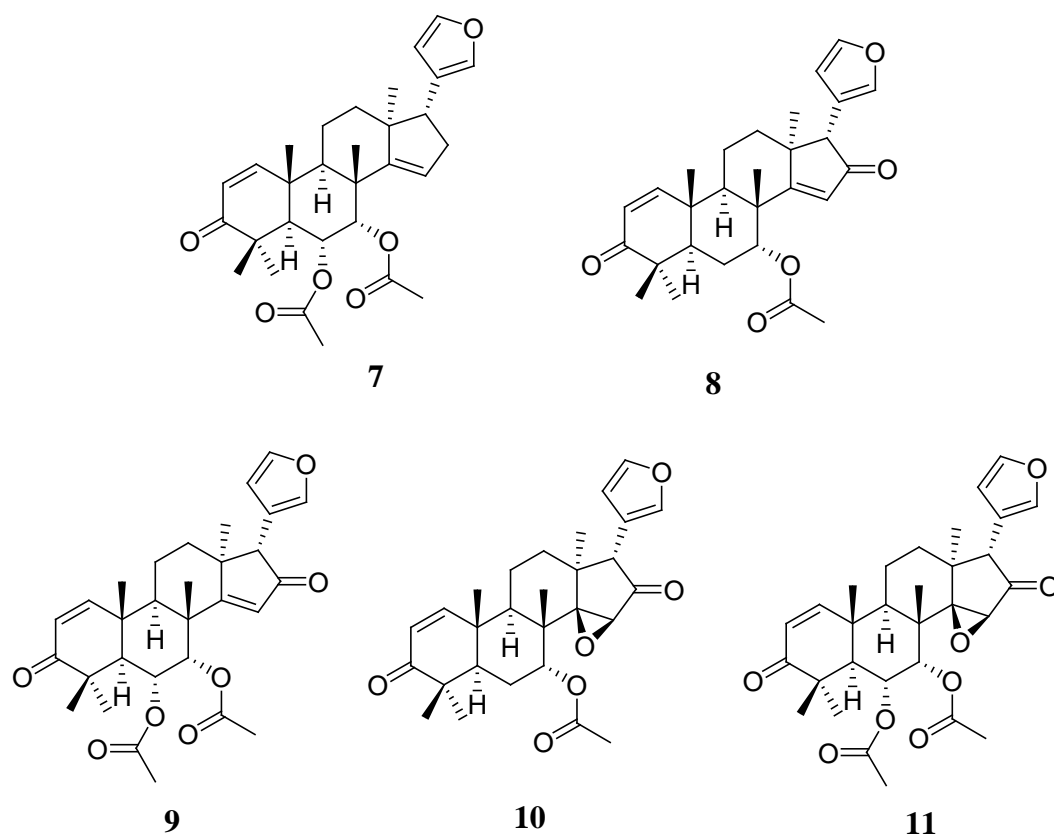
Inada *et al.* (1993) telah melaporkan satu senyawa golongan triterpenoid yang diisolasi dari daun *C. macrophyllus* yaitu 24-hidroksidamara-20,25-dien-3-on (**4**) dan dua senyawa triterpenoid lainnya yaitu asam moronat (**5**) dan asam betulonat (**6**). Ketiga senyawa ini diuji aktivitasnya terhadap sel tumor pada EBV-EA (*Epstein-Barr virus early antigen*) yang diinduksi oleh 12-*O*-tetradekanolforbol-13-asetat (TPA) secara *in vitro*. Asam moronat (**5**) menghambat kuat terhadap aktivasi EBV-EA pada perbandingan 500 dan 100 mol triterpenoid/1mol TPA, demikian juga untuk asam betuloneat (**6**) memiliki aktivitas hampir sama dengan asam moronat, namun senyawa (**4**) tidak memberikan aktivitas terhadap EBV-EA. Struktur senyawa **4-6** ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur senyawa triterpenoid pentasiklik dan damaran, 24-hidroksidamara-20,25-dien-3-on (**4**), asam moronat (**5**), dan asam betulonat (**6**) dari daun *C. macrophyllus* (Inada *et al.*, 1993).

3. Tetranortriterpenoid (limonoid)

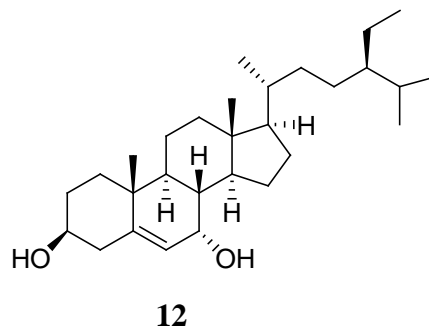
Maneerat *et al.* (2008) telah mengisolasi senyawa limonoid kelompok havanensin dari biji *C. siamensis* dan menemukan lima senyawa limonoid yaitu disobinin (**7**), azadiradion (**8**), mahonin (**9**), epoksiazadiradion (**10**), dan 6 α -asetoksiepoksi azadiradion (**11**) (Gambar 3.3). Kelima senyawa ini menunjukkan aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 2,06; 2,09; 2,91; 50,00 dan 25,00 $\mu\text{g/mL}$, aktivitas antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan nilai MIC berturut-turut 200,00; 6,25; 50,00; 25,00 dan 200,00 $\mu\text{g/mL}$ serta sitotoksik terhadap sel KB (karsinoma epidermal mulut manusia) dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 3,17; 9,38; >100; 12,87 dan >100 $\mu\text{g/mL}$, sitotoksik terhadap sel kanker NCI-H187 (sel kanker paru-paru manusia) dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 1,67; 6,44; 15,61; dan 7,54 $\mu\text{g/mL}$, sitotoksik terhadap kanker payudara (MCF-7) dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 2,15; 7,13; 18,42; 4,68 dan >100 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 2.3 Struktur senyawa limonoid kelompok havanensin, disobinin (**7**), azadiradion (**8**), mahonin (**9**), epoksiazadiradion (**10**), dan 6 α -asetoksiazadiradion (**11**) dari biji *C. siamensis* (Maneerat *et al.*, 2008).

4. Steroid

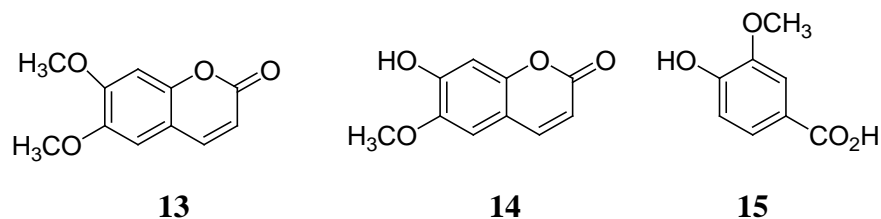
Golongan steroid adalah komponen lainnya yang banyak ditemukan pada genus *Chisocheton*. Steroid adalah bentuk modifikasi dari triterpenoid dan memiliki sistem cincin tetrasiklik lanosterol tetapi kehilangan tiga metil pada C-4 dan C-14. Kolesterol merupakan salah satu steroid yang banyak ditemukan pada jaringan hewan maupun tumbuhan. Modifikasi struktur khususnya pada rantai sampingnya akan mengubah fungsi dan sifatnya (Dewick, 2009). Najmuldeen *et al.* (2012) berhasil mengisolasi senyawa steroid 7α -hidroksil- β -sitosterol (**12**) (Gambar 2.4), dari kulit batang *C. tomentosus* yang menginduksi apoptosis melalui disregulasi sel rasio Bax/Bcl-2, dan penghambatan siklus sel.



Gambar 2.4 Struktur senyawa 7α -hidroksil- β -sitosterol (**12**) dari kulit batang *C. tomentosus* (Najmuldeen *et al.*, 2012).

5. Fenolik

Selanjutnya Phongmaykin *et al.* (2008) berhasil menemukan senyawa fenolik yaitu kumarin skoparon (**13**), skopoletin (**14**), dan asam vanilat (**15**) (Gambar 3.5) yang diisolasi dari kayu dan daun *C. penduliflorus*.



Gambar 2.5 Struktur senyawa fenolik (**13-15**) dari kayu dan daun *C. penduliflorus* (Phongmaykin *et al.*, 2008)

2.3. *State of the art*

Tumbuhan Meliaceae telah dilaporkan memiliki senyawa-senyawa aktif dan menarik yang bermanfaat dibidang kesehatan dan pertanian, seperti antikanker, sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388, antijamur, antivirus, antiinflamasi, insektisida dan antimikroba (Su *et al.*, 2006; Harneti *et al.*, 2014; Joychaat *et al.*, 2010; Esimone *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Awang *et al.*, 2012 dan Maneerat *et al.*, 2008). Tumbuhan ini tumbuh di hutan tropis dan subtropis seperti hutan-hutan di Indonesia. Salah satu genus Meliaceae adalah *Chisocheton*. Dari beberapa hasil penelitian bahwa kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder tumbuhan *Chisocheton* memiliki aktivitas yang sangat menarik seperti : sitotoksik P-388 (Mohamad *et al.*, 2008); antikanker terhadap sel HeLa-60, A549, MCF7 (Wong *et al.*, 2011); antikanker terhadap sel breast cancer (Phongmaykin *et al.*, 2008); antitumor terhadap sel HeLa dan SMMC-7721 (Yang *et al.*, 2009); antiinflamasi Yang *et al.*, 2011); apoptosis melalui diregulasi sel Bax/Bcl-2 dan penahanan siklus sel (Najmuldeen *et al.*, 2012) dan antilipid (Wong *et al.*, 2013).

Tumbuhan yang memiliki hubungan taksonomi yang dekat, seperti satu marga atau satu suku akan memiliki kandungan metabolit sekunder yang hampir sama (Dewick, 2009). Dengan demikian penelitian yang akan dilakukan, berpeluang untuk mendapatkan senyawa kimia baru yang bersifat sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388.

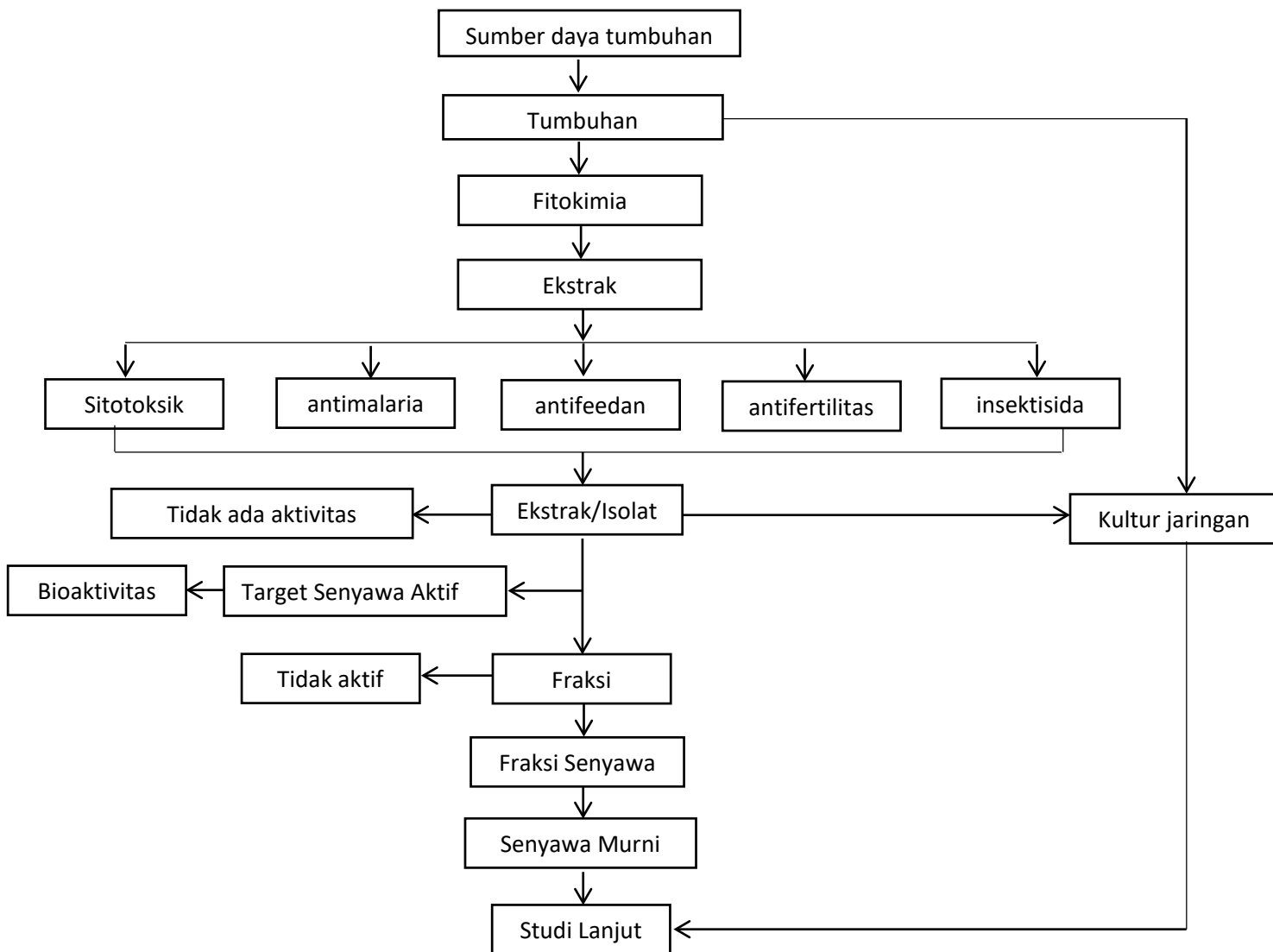
2.4. Studi Pendahuluan yang Telah Dilaksanakan.

Adapun studi pendahuluan yang telah dilaksanakan adalah:

1. Penyiapan sampel kulit batang tumbuhan *Chisocheton celebicus* sampai berbentuk serbuk.
2. Ekstraksi serbuk kulit batang tumbuhan *Chisocheton celebicus*, masing masing dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
3. Diuapkan pelarutnya sampai diperoleh ekstrak pekat dan *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
4. Masing-masing ekstrak diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388.
5. Berdasarkan uji aktivitas bahwa ekstrak *n*-hexana dan etil asetat dari kulit batang *Chisocheton celebicus* menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap sel murin leukemia P-388

2.5. Roadmap Penelitian

Rencana Strategis dan Peta Jalan Penelitian untuk Pemanfaatan Sumber Daya Tumbuhan Indonesia di Sulawesi Utara adalah sebagai berikut :



Gambar 2. 5. Roadmap Penelitian Kimia Bahan Alam di Jurusan Kimia FMIPA Unsrat Manado

BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Memperoleh informasi dan menginventarisasi keragaman genus *Chisocheton* yang tumbuh di Sulawesi Utara.
2. Memperoleh informasi dan mempelajari secara etnobotani tumbuhan *Chisocheton* sebagai obat tradisional.

3.2. Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini dapat berguna untuk memberikan informasi dan pengetahuan tambahan sebagai :

1. Upaya dalam meningkatkan nilai dari tumbuhan genus *Chisocheton* dalam bidang kesehatan.
2. Memberikan informasi tentang kandungan senyawa metabolit sekunder dalam genus *Chisocheton* serta aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388.

3.3. Target Penelitian

Adapun target yang akan dihasilkan dari penelitian ini adalah :

Tahun Pertama.

1. Meperoleh sampel genus *Chisocheton*
2. Determinasi tumbuhan genus *Chisocheton*
3. Penyiapan sampel untuk ekstraksi
4. Maserasi menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol.
5. Diperoleh isolat padatan masing-masing diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388.
6. Menyusun draf laporan, persiapan seminar nasional/Internasional dan menyusun draf publikasi.

Tahun kedua

1. Pemisahan fraksi aktif dengan metode kromatografi.
2. Pemurnian isolat aktif, pengukuran spektroskopi, interpretasi spektrum, uji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388
3. Penyusunan laporan, presentasi pada seminar nasional dan penyusunan draf publikasi nasional/nternasional.

Tahun ketiga

1. Mempelajari metode formulasi terhadap senyawa aktif, uji bioaktivitas, evaluasi struktur dan aaktivitas biologisnya serta pembuatan formulasi senyawa aktif sebaga bahan obat.
2. Penyusunan laporan, presentasi pada seminar nasional/Internasional dan penyusunan draf publikasi yang akan diterbitkan pada jurnal nasional/Internasional.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Fakultas MIPA, Universitas Sam Ratulangi Manado dan di Laboratorium Kimia Bahan Alam FMIPA Universitas Padjadjaran Bandung, selama 12 bulan tahun pertama, 12 bulan tahun kedua dan 12 bulan pada tahun ketiga.

4.2. Bahan dan Alat

4.2.1 Bahan

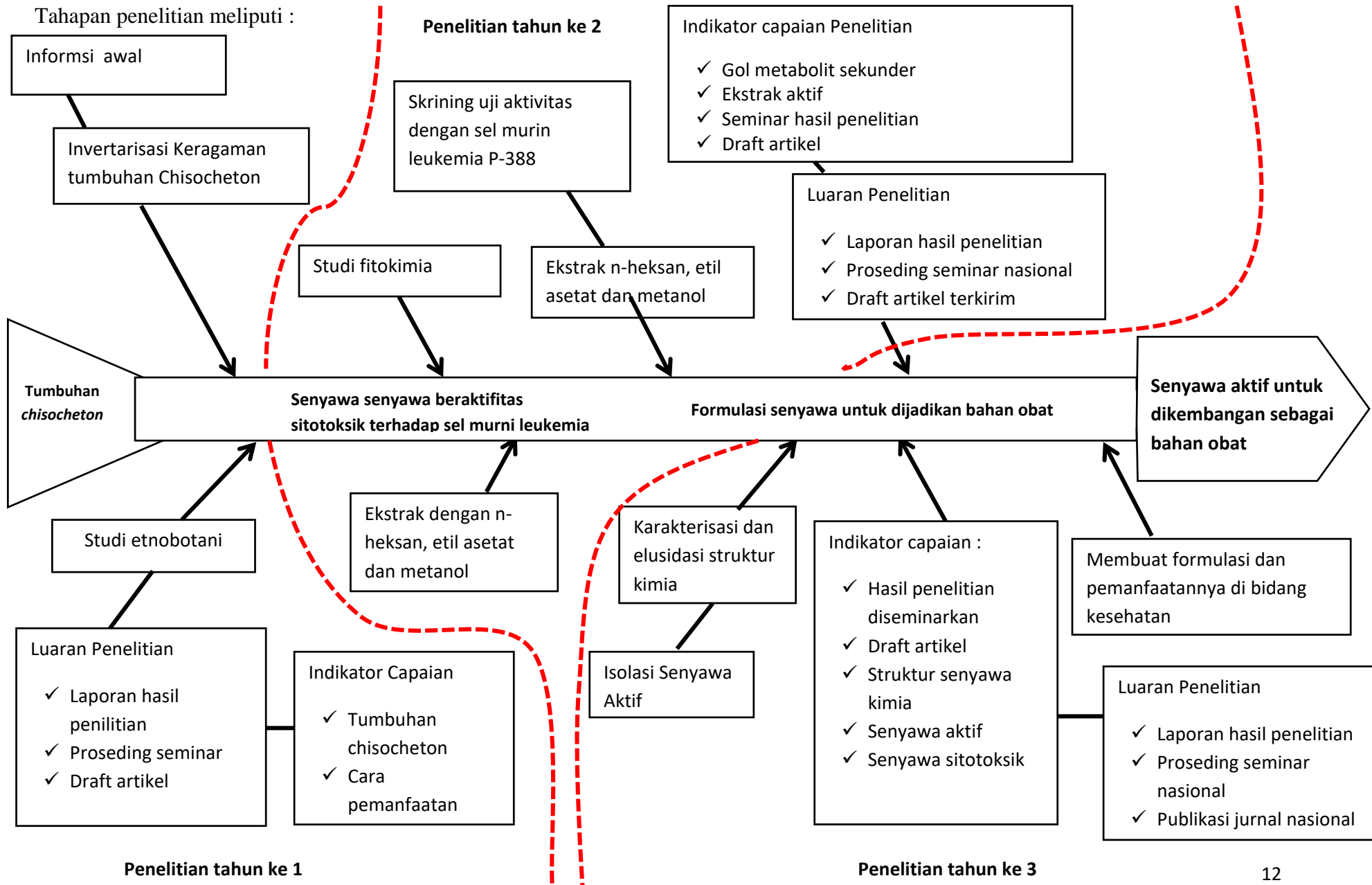
Bahan kimia yang digunakan terdiri atas: berbagai jenis pelarut organik teknis (destilasi ulang) dan pro-analisis seperti *n*-heksana, etil asetat, metanol, kloroform, diklorometana, aseton dan pelarut organik lainnya. Silika gel GF₂₅₄ untuk kromatografi lapis tipis, silika gel G₆₀ (70-230 mesh), dan ODS untuk kromatografi kolom terbuka dan kromatografi kolom cair vakum. Pereaksi penampak noda asam sulfat 10% dalam etanol.

4.2.2 Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: peralatan-peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam. Satu set alat destilasi dan maserasi. Rotavapor R-200 Buchii dengan vacuum Vac V-500 Buchii dan penangas air B-490 Buchii. Kolom kromatografi berbagai ukuran dan perangkat kromatografi preparatif. Penentu titik leleh Fisher John *melting point apparatus*. Spektrofotometer UV-vis, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan MS.

4.3. Bagan Alir Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap yaitu 12 bulan tahun pertama, 12 bulan tahun kedua dan 12 bulan pada tahun ketiga.



4.4. Indikator Capaian Penelitian

Tahun pertama

1. Pengambilan sampel
2. Penyiapan sampel untuk diekstraksi
3. Maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol sampai maserat tidak berwarna.
4. Maserat diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstrak pekat *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
5. Selanjutnya masing-masing ekstrak diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel murin leukemia P-388
6. Pembuatan laporan tahun pertama
7. Presentasi pada seminar nasional
8. Penyusunan naskah publikasi nasional

Tahun kedua

1. Fraksi aktif dipisahkan dengan berbagai teknik kromatografi
2. Pemurnian isolat aktif
3. Pengukuran spektroskopi
4. Interpretasi spektrum
5. Penentuan struktur
6. uji aktivitas sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388
7. Pembuatan laporan
8. Presentasi pada seminar nasional
9. Penyusunan publikasi nasional

Tahun ketiga

1. Memempelajari formulasi terhadap senyawa aktif
2. Uji bioaktivitas
3. Evaluasi struktur dan aktivitas biologisnya
4. Pembuatan formulasi senhawa aktif sebagai bahan obat
5. Pembuatan laporan

6. Presentasi pada seminar nasional/internasional
7. Penyusunan publikasi nasional/internasional

4.5. Penyiapan Bahan Tumbuhan

Tumbuhan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan *Chisocheton* yang diperoleh dari daerah Suawesi Utara. Spesies ini terlebih dahulu dideterminasi di Jatinangor Departemen Biologi UNPAD Bandung. Sebelum digunakan, sampel tumbuhan dipilih dan dibersihkan, dikering anginkan untuk mencegah tumbuhnya jamur, kemudian digiling sampai berbentuk serbuk dan selanjutnya sampel dimaserasi.

4.5.1. Ekstraksi Tumbuhan

Serbuk sampel diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol, masing-masing selama 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak diuapkan di bawah tekanan vakum pada temperatur kurang dari 40°C hingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Masing-masing ekstrak diuji aktivitas toksiknya terhadap sel murin leukemia P-388. Bila menunjukkan aktivitas toksik, maka ekstrak diperbanyak dan dipraksionasi berdasarkan tingkat kepolaran pelarut

4.5.2. Isolat-isolat Aktif

Senyawa-senyawa hasil ekstrak yang memiliki aktivitas sitotoksik, selanjutnya dipisahkan dengan metode kromatografi cair vakum (silika gel G₆₀), kromatografi tekan pada fasa diam silika gel dan ODS, dan kromatografi lapis tipis preparatif sehingga diperoleh senyawa aktif. Isolat aktif selanjutnya dimurnikan dengan teknik kromatografi atau rekristalisasi sehingga dihasilkan isolat murni.

4.5.3. Penentuan Struktur Kimia Aktif

Isolat murni yang dihasilkan ditetapkan sifat fisiknya seperti titik leleh dan putaran optik spesifik ($[\alpha]_D^{20}$). Struktur senyawa aktif ditentukan dengan teknik spektroskopi UV-vis, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan MS.

4.5.4. Uji Sitotoksik Isolat

Pengujian aktivitas sitotoksik dilakukan menurut metode yang dijelaskan Alley *et al* (1988). Sel murin leukemia P-388 yang diletakkan menjadi 96 lubang piring, dengan kepadatan sel awal sekitar $3 \times 10^4 \text{ cm}^3$. Setelah 24 jam diinkubasi untuk perlakuan sel dan pertumbuhan, berbagai konsentrasi sampel ditambahkan. Senyawa sampel dilarutkan dalam *dimethyl sulfoxide* (DMSO) pada konsentrasi yang diperlukan. Setelah enam konsentrasi diinginkan disusun menggunakan PBS (larutan buffer fosfat, pH = 7,30 – 7,65). Sumur kontrol hanya menerima DMSO. Uji ini berakhir setelah masa inkubasi 48 jam dengan menambahkan reagen MTT (3-(4,5-dimetithiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide), juga dinamakan sebagai biru thiazol, dan inkubasi dilanjutkan selama 4 jam, dimana larutan MTT berhenti yang mengandung sodium dodescyl sulphate (SDS) ditambahkan dan inkubasi 24 jam lainnya dilakukan. Densitas optik dibacakan dengan menggunakan pembaca pelat mikro pada 550 nm. Nilai IC_{50} diambil dari grafik berdasarkan presentase kontrol, yang hanya menerima PBS Dan DMSO, dibandingkan dengan konsentrasi yang diperlukan untuk penghambatan pertumbuhan 50%.

BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Hasil yang dicapai dalam penelitian ini adalah :

1. Memperoleh tumbuhan *Chisocheton* yang tumbuh Di Sulawesi Utara.
2. Determinasi tumbuhan *Chisocheton*
3. Mengekstrak kulit batang dan daun tumbuhan *Chsocheton sp.* (C.DC) Harms, dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
4. Meperoleh isolat dari ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
5. Dari sampel kulit batang *Chisocheton sp.* (C.DC) Harms, diperoleh 7,193 gram isolat dari ekstrak *n*-heksana, 8,798 gram isolat dari ekstrak etil asetat dan 18,684 gram dari ekstrak metanol.
6. Dari sampel daun *Chisocheton sp.* (C.DC) Harms, diperoleh 6,545 gram isolat *n*-heksana, 9,225 gram isolat etil asetat dan 17, 546 gram isolat metanol.
7. Uji fitokimia isolat dari *n*-heksana, etil asetat dan metanol.
8. Uji aktivitas isolat terhadap sel murin leukemia P-388
9. Presentasi seminar Internasional
10. Draf publikasi

BAB VI RENCANA TAHAP BERIKUTNYA

Tabel 6.1 Rencana selanjutnya dalam penelitian tahun ke-2

No	Jenis Kegiatan	Waktu Pelaksanaan Tahun 2019 bulan ke-2	Capaian
1	Pemisahan fraksi aktif dengan teknik kromatografi	Maret, April 2019	
2	Pemurnian isolat	Mei 2019	
3	Pengukuran spektroskopi	Juni 2019	
4	Karakterisasi isolat aktif dan penentuan struktur dengan spektroskopi UV, IR, ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR dan MS	Juli, Agustus 2019	
5	Analisis data, analisis spektroskopi dan analisis uji bioaktivitasnya	September, Oktober 2019	
6	Laporan kemajuan, laporan akhir, penulisan draf artikel yang akan diterbitkan pada jurnal Nasional dan presentasi pada seminar Nasional/Internasional	November, Desember 2019	

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Uji fitokimia ekstrak kulit batang *Chisocheton* sp. (C.DC) Harms, menunjukkan adanya senyawa flavonoid, triterpenoid dan tanin yang memiliki aktivitas antioksidan. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak *n*-heksana.
2. Hasil evaluasi sitotoksik terhadap sel murin leukemia P-388, menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana dan etil asetat memiliki nilai IC₅₀ 16,9 µg/mL, 19,9 µg/mL menunjukkan aktivitas yang aktif, sedangkan ekstrak metanol tidak aktif.

B. Saran

Dengan adanya golongan senyawa metabolit dan beraktivitas antioksidan dari kulit batang tumbuhan *Chisocheton* sp. (C.DC) Harms, perlu dilakukan penelitian selanjutnya terutama pemisahan untuk mendapatkan senyawa murni serta strukturnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., Hakim, E. H., Juliawaty, L., Makmur, L., and Maolana Syah, Y. 2005. Indonesian rainforest plants-chemodiversity and bioactivity. *Malaysian Journal of Science*. 24: 7-16.
- Alley, M.C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M. R. 1988. Feasibility of drug screening with panels of tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*. 48: 589-601.
- Awang, K., Soon, L. C., Khalit, M., Morita, H., Yusuke, H., Koichi, T., Thoison, O., and Hamid, A. H. 2007. Erythrocarpines A-E, new cytotoxic limonoids from *Chisocheton erythrocarpus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 15: 5997-6002.
- Awang, K., Chong, S. L., Martin, M.T., Mokhtar, R. M., Chan, G., Litaudon, M., Gueritte, F., and Mohamad, K. 2012. Malayanines A and B, two novel limonoids from *chisocheton erythrocarpus* Hiern. *Tetrahedron Letters*. 53: 5355-5359
- Bray, D.H., D.C. Warhurst, J.D., Connally, M.J. O'Neil and J.D. Philipson 1990. Plants as source of antimalarial drug. Pt. 7 activity of some species Meliaceae plants and their constituent limonoids, *Phytotheir*. R. 4: 29-35.
- Cao, S.J., Valerie, H.L., Wu-Sing, S.H., Sing, K.Y., Peneria, J.P. and Goh, S.H. 1998. Novel Cytotoxic Polyprenilated Xanthenes From *Garcini gundichudii* (Guttiferae). *Tetrahedron*. 54: 10815-10924
- Dewick, P.M. 2009. *Medicinal Natural Products: Biosynthetic Approach*. Third Edition. John Wiley and Sons.
- Esimonne, C.O., Eck, G., Neoru, C.S., Hoffmann, D., Uberla, K., and Proksch, P. 2010. Dammarenolic Acid, a Secodammarane Triterpenoid From *Aglaiia sp* Shows potent anti-retroviral Activity *in vitro*. *Phytomedicine*. 17: 540-547.
- Harneti, D., Tjokronegoro, R., Safari, A., Supratman, U., Loong, X., Mukhtar, M.R., Mohamad, K., Awang, K. and Hayashi, H. 2012. Cyotoxic Triterpenoids from the Bark of *Aglalia smithii*. *Phytochemistry Letters*. 5: 496-499.
- Harneti, D., Supriadin, A., Ulfah, M., Safari, A., Supratman, U., Awang, K., Hayashi, H. 2014. Cytotoxic constituents from the bark of *Aglaiia exemia* (Meliaceae) *Phytochemistry Letters*. 8: 28-31
- Heyne. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid II*. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Yayasan Sarana Warna Jaya, Jakarta 1029-1031.
- Inada, A., Sukemawa, M., Murata, H., Nakanishi, T., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, Darnaedi, D., J and Murata, J., 1993. Phytochemical studies on Maleaceous Plant. Part VIII. Structures and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of Triterpenoids from Leaves of *Chisocheton macrophyllus* King. *Chem. Pharm. Bull.* 41(3): 617-619.
- Janprasert, J.C., Satasook, P., Sukamalanand, D.E., Champagne, M.B., Isman, P., Wiriyachitra and Towers, G.H.N. 1993. Rocaglamide, a natural benzofuran insecticide from *Aglaiia odorata*, *Phytochemistry*. 32: 67-69.
- Joycharat, N., Plodpai, P., Panthong, K., Yingyongnarongkul, B., and Voravuthikunchai, S.P. 2010. Terpenoid Constituents and Antifungal Activity Of *Aglaiia forbesii* seed Phytopathogens. *Canadian Journal of Chemistry*. 88: 937-944.
- Jemal, A., Siegal, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., and Thun, M.J. Global Cancer Statistics. 2011. *CA Cancer J. Clin.* 2011. 59: 225-249.

- Lee, F.L., Cui, B., Mehta, R.R., Kinghorn, D. and Pezzuto, J.M. 1998. Cytostatic mechanism and antitumor potential of novel 1H-cyclopenta[b]benzofuran lignans isolated from *Aglaia elliptica*, *Chemico-Biological Interaction*. 115: 215-228.
- Lim, C. S. 2008. Chemical constituents of *Chisocheton erythrocarpus* hiern. Departement of Chemistry Faculty of Science University Malaya.
- Manitto, P., & Sammes, P. G. 1980. *Biosynthesis of Natural Products*. New York: John Willey & Sons.
- Maneerat, W., Laphoohiero, S., Koysomboon, S., and Chantrapromma, K. 2008. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoid from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*. 15: 1130-1134.
- Mayanti, T., Tjokronegoro, R., Suprtaman, U., Mukhtar, M.R., Khalijah, A and Hadi, A.H. 2011. Antifeedant Triterpenoids from the Seeds and Bark of *Lansium domesticum* cv Kokossan (Meliaceae), *Mollecules*. 16: 2785-2795.
- Mohamad, K., Hirasawa, Y., Litaudon, M., Awang, K., Hamid, A., Takeya, K., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Zaini, N. C., and Morita, H. 2009. Ceramicines B-D, new antiplasmodial limonoids from *Chisocheton ceramicus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17: 727-730.
- Mohamad, K., Hirasawa, Y., Lim, C.S., Awang, K., Hamid, A., Hadi, A., Takeya, K., & Morita, H. 2008. Ceramicines A and walsogyne A, novel limonoids from two species of Meliaceae. *Tetrahedron Letter*. 49: 4276-4278.
- Mathers, Colin, D., Cynthia, B. P., Alan, D.L., Christopher, J. M. 2001. *Cancer Incidence Mortality and Survival by site for 14 regions of the World*. Evidenci for Healty Policy Discussion Paper no. 13 (World Healty Organization)
- Najmuldeen, I. A., Hadi, A. H. A., Awang, K., Mohamad, K., Ketuly, K.A., Mukhtar, M.R., Chong, S.L., Chan, G., Nafiah, M. A., Weng, N. S., Shiota, O., Hosoya, T., Nugroho, A. E., and Morita, H. 2011. Chisomicines A-C, Limonoid from *Chisocheton ceramicus*. *Journal of Natural Product*. 74: 1313-1317.
- Najmuldeen, I. A., Ibrahim, A., Tasyriq, M., Lionel, L. A. In., Mohamad, K., Awang, K. and Hasima, N. 2012. *7 α -hidroksi- β -Sitosterol from Chisocheton tomentosus Induces Apoptosis via Dysregulation of Cellular Bax/Bcl-2 Ratio and Cell Cycle Arrest by Downregulating ERK1/2 Activation*. Volume 2012, Article ID 765316, 12 pages. Doi: 10.1155/2012/765316
- Nakatani, M., Abdelgalell, S.A.M., Saad, M. M. G., Huang, R. C., Doe, N., & Iwagawa, T. 2004. Phragmalin Limonoids from *Chukrasia tabularis*. *Phytochemistry*. 65: 2833-2841.
- Nugroho, B. W., Edrada, R. A., Wray, V., Witte, L., Bringmann, G., Gehling, M., & Proksch, P. 1999. An Insectisidal rocaglamide derivates and related compound from *Aglaia odorata* (Meliaceae). *Phytochemistry*. 51: 367-376.
- Omar, S., Zhang, J., Kinnon, M.S., Leaman, D., Arnason, J. T., and Philogen, B. J. R. 2003. Traditionally-used antimalarials from Meliaceae. *Current Top Medicinal Chemistry*. 3(2): 133-139.
- Parmar, B. S. 1995. Results with commercial neem formulations produced in India. In H. Schmitterer (ed), *The neem tree Azadirachta indica* A. Juss. And other Meliaceous plants. Sources of unique natural products for integrate pest management, medicine industry and other purposes. pp. 453-470. VCH. Tokyo.
- Patra, J.K., and Thatoi, H.N. 2011. Metabolic diversity and bioactivity screening of mangrove plants. *Acta Physiol Plant*. Vol. 33: 1051-1061.

- Phongmaykin, J., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Suttisri, R., and Saifah, E. 2008. A New Sesquiterpene and Other Terpenoid Constituents of *Chisocheton penduliflorus*. *Arch Pharm Res.* 31: 1.
- Schmutterer, H., and Singh, R.P. 1995. List of insect pest susceptible to neem products. In H. Schmutterer (ed), *The neem tree Azadirachta indica* A. Juss. And other Meliaceous plants. Sources of unique natural products for integrate pest management, medicine, industry and other purposes. pp. 326-365. VCH, Tokyo
- Simon dan Sunarto. 2011. *Neoplasma Sistim Hematopoietik: Leukemia*. Fakultas kedokteran Unika Atma Jaya Jakarta.
- Su, B.N., Chai, H., Mi, Q., Riswan, S., Kardono, L.B.S., Afriastini, J.J., Santarsiero, B.D., Masecar, A.D., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Swanson, S.M. and Kinghorn, A.D. 2006. Activity-guided isolation of cytotoxic constituents from the bark of *Aglaia crassinervia* collected in Indonesia. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 14: 960-972.
- Suffness, M. 1984. The discovery and development of antitumor drugs from natural product. *Plenary Lecturers of the 32th International Congress on Medicinal Plants Research.* Antwerp, Juli 23-28th, 101-133.
- Tjay, T.H. dan Rahardja, K. 2002. Obat-obat penting: *Khasiat, penggunaan dan efek-efek sampingnya*. Edisi V. Elex Media Komputindo.
- Vossen, V. D., H. A. M., and Umali, B. E. (Editors). 2002. *Plant resources of south-east Asia* no. 14 vegetable oils and fats, Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. 150.
- Weinberg, R.A. 1996. How cancer arises. *Science of America* 275: 32-40
- Wood, D. L., Silverstain, R. M., & Nakajima, M. 1970. *Control of insects behavior by natural product*. Academic Press. New York.
- Wong, C. P., Shimada, M., Nagakura, Y., Nugroho, A. E., Hirasawa, Y., Kaneda, T., Awang, K., Hamid, A., Hadi, A., Mohamad, K., Shiro, M., and Morita, H. 2011. Ceramicines E-I, New Limonoids from *Chisocheton Ceramicus*. *Chem. Farm Bull.* 59: 407-411.
- Wong, C. P., Kaneda, T., Hamid, A., Hadi, A., Morita, H. 2013. Ceramicine B, a limonoid with anti-lipid droplets accumulation activity from *Chisocheton ceramicus*. *J. Nat Med.* Doi: 10.1007/s11418-013-0755-2.
- Yang, M. H., Wang, J. G., Luo, J. G., Wang, X. B., and Kong, L. Y. 2011. Chisopanins A-K, 11 new protolimonoids from *Chisocheton paniculatus* and their anti-inflammatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 19: 1409-1417.
- Yang, M. H., Wang, J. S., Luo, J. G., Wang, X. B., and Kong, L. Y. 2009. Tetranortriterpenoids from *Chisocheton Paniculatus*. *J. Prod.* 70: 1532-1532.

LAMPIRAN (bukti luaran yang didapatkan)

- Artikel Ilmiah (draft)

FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK KULIT BATANG *Chisocheton sp. (C.DC) Harms (Meliaceae)*

Dewa G. Katja, Henry F. Aritonang, Audy D. Wuntu dan Fernalisa M.Y Ahmad

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sam Ratulangi Manado

Email : dewakatja@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan dari setiap ekstrak kulit batang *Chisocheton sp. C.DC Harms (Meliaceae)*. Hasil ekstraksi 200 g serbuk kulit batang *Chisocheton sp. C.DC Harms (Meliaceae)* dengan *n*-heksane, etil asetat dan metanol masing-masing dengan 2000 mL berturut-turut menghasilkan 7,193 g ekstrak pekat *n*-heksana, 8,798 g ekstrak pekat etil asetat dan 18,683 g ekstrak pekat metanol.

Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, triterpenoid dan tannin. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana memberikan nilai IC₅₀ sebesar 620,66µg/mL, ekstrak metanol sebesar 216,73µg/mL, dan ekstrak etil asetat sebesar 199,89 µg/mL yang berarti etil asetat memiliki kemampuan yang paling besar dalam menangkap radikal bebas.

Kata Kunci : *Chisocheton sp. C.DC Harms*, flavonoid, triterpenoid, tannin, DPPH dan Fitokimia

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara khatulistiwa yang memiliki iklim tropis dan subtropis, sehingga tumbuh berbagai spesies tumbuhan. Beberapa spesies tumbuhan telah di manfaatkan untuk mengobati berbagai jenis penyakit maupun sebagai sumber berbagai obat baru (Karuppusamy *et al.*, 2009) salah satunya adalah famili *Meliaceae*. Tumbuhan ini telah dikenal sebagai tumbuhan penghasil senyawa-senyawa yang aktif yang berpotensi sebagai antimalaria, insektisida, antiviral, antioksidan, antikanker, antibakteri, antimikroba, dan antiinflamasi (Heyne, 1987). *Chisocheton* adalah salah satu genus dari famili *Meliaceae*, memiliki 50 spesies

yang tersebar luas di daerah tropis dan subtropis seperti di Indo-China, Papua Nugini, Cina selatan, Thailand, Malaysia, Nepal, India, Bhutan dan Myanmar (Vossen dan Umali, 2002).

Salah satu penyebab adanya penyakit dalam tubuh manusia adalah radikal bebas (Droge, 2002). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang jumlahnya terus bertambah dan menyerang sel-sel tubuh (Khlifi dkk., 2005). Untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas, diperlukan suatu bahan antioksidan yang bersumber dari bahan alam, sehingga dapat menghambat terjadinya reaksi berantai (Windono dkk., 2001).

Antioksidan bertindak sebagai penyumbang radikal hydrogen atau bertindak sebagai akseptor radikal bebas (Jadhav dkk., 1996). Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan alami maupun antioksidan sintetik. Contoh antioksidan alami yaitu fenolik, flavonoid, tannin dan vitamin E sedangkan contoh antioksidan sintetik yaitu BHA (*butylated hidroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluena*) (Takashi dan Takayuki, 1997).

Di Pulau Sulawesi, tepatnya Sulawesi Utara Kota Tomohon terdapat salah satu genus *Chisocheton* dengan spesies *Chisocheton sp. (C.DC) Harms*. Berdasarkan uraian di atas, kami akan melakukan penelitian tentang kandungan metabolit sekunder meliputi uji warna sebagai uji fitokimia (Harborne, 1987) dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dari ekstrak kulit batang *Chisocheton sp. (C.DC) Harms*.

2. Materi dan Metode

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah gelas kimia, gelas ukur, botol vial besar, labu ukur, spatula, corong kaca, rotary evaporator, oven, timbangan digital, rak tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet, kertas saring, cawan petri, pisau, blender, vortex, ayakan 65 mesh, spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan yaitu serbuk dari kulit batang tumbuhan *Chisocheton sp. (C.DC) Harms*, metanol, heksan, etilasetat, klorofom, asam sulfat, FeCl_3 1%, asam asetat anhidrat, NaCl, ammonia, aquades, etanol, asam klorida, serbuk magnesium, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, reagen Folin-Ciocalteu 50%, natrium karbonat dan 1,1difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Preparasi Sampel

Sampel kulit batang *Chisocheton sp. (C.DC) Harms* di ambil di gunung Soputan Tomohon. Sampel kulit batang yang diperoleh terlebih dahulu dibersihkan selanjutnya dikering-anginkan selama 7 hari, kemudian dipotong kecil-kecil lalu ditumbuk kemudian diblender dan diayak dengan ayakan 65 mesh hingga diperoleh serbuk.

Ekstraksi Maserasi

Sebanyak 200 g serbuk kulit batang *Chisocheton sp. (C.DC) Harms* diekstraksi dengan cara maserasi selama 5x24 jam menggunakan pelarut *n*-heksana sebanyak 2000 mL. selanjutnya disaring hingga diperoleh filtrate. Filtrate yang diperoleh kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Diulangi kembali perlakuan yang sama untuk pelarut etil asetat dan metanol.

Skrinning Fitokimia

Ekstrak kental kulit batang dari beberapa pelarut di analisis dengan dilakukan uji kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenolik dengan langkah sebagai berikut:

Pembuatan Larutan Uji Fitokimia

Pembuatan larutan uji untuk skrinning fitokimia dilakukan dengan melarutkan 0.05 g ekstrak kental *n*-heksana dalam 50 mL metanol kemudian di vortex sampai larutan tercampur. Diulangi perlakuan yang sama untuk ekstrak kental etil asetat dan metanol.

Identifikasi kandungan alkaloid

Sebanyak 2 ml larutan uji dari pelarut heksan, dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu, disaring kemudian

ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberi lapisan atas dan bawah. Lapisan atas dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan. Pada tabung kedua ditambahkan 1 tetes pereaksi Dragendorf dan terbentuknya endapan menandakan adanya alkaloid. Tabung ketiga ditambahkan 1 tetes pereaksi Wagner dan terbentuknya endapan coklat menandakan adanya alkaloid. Diulangi perlakuan yang sama untuk larutan uji etilasetat dan methanol.

Uji kandungan steroid dan triterpenoid

Sebanyak 2 mL larutan uji dari masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian masing-masing ditambah dengan asam asetat anhidrat 1 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes. Jika terbentuk warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Jika terbentuk warna ungu atau jingga menandakan adanya triterpenoid.

Uji kandungan flavonoid

Sebanyak 2 ml larutan uji dari masing-masing ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah dengan 5 tetes etanol, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu ditambah dengan serbuk Mg 0,2 gr dan 5 tetes HCl pekat. Jika menghasilkan warna kuning, orange, dan merah menandakan adanya flavonoid.

Uji kandungan saponin

Sebanyak 2 ml larutan uji dari masing-masing ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 2 ml aquades, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu, dipanaskan selama 2-3 menit. Dinginkan, setelah dingin kocok dengan kuat. Adanya busa yang

stabil selama 30 detik menunjukkan sampel mengandung saponin.

Uji kandungan tanin

Sebanyak 2 ml larutan uji dari masing-masing ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian masing-masing tabung reaksi ditambahkan dengan FeCl_3 1% 2-3 tetes. Adanya tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan.

Penentuan Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik kulit batang *Chisocheton sp. C.DC* Harms ditentukan dengan metode Folin Ciocalteu. Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak ditambahkan 0,1 mL reagen Folin Ciocalteu 50%. Kemudian divortex, lalu ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat (Na_2CO_3) 2%. Selanjutnya, campuran diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan total fenolik dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat/g ekstrak.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang *Chisocheton sp. C.DC* Harms ditentukan dengan metode Muaja dkk, (2017). Larutan ekstrak dan DPPH dibuat terlebih dahulu. Ekstrak dilarutkan dalam metanol dan larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 0,4 mM. larutan sampel yang telah dibuat diencerkan dengan berbagai konsentrasi dengan total volume 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai larutan uji dan dibuat juga untuk blanko. Selanjutnya ke dalam tabung reaksi larutan uji ditambahkan 0,2 mL larutan DPPH dan diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Selama 30 menit, blanko dan larutan uji diukur

absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm, nilai absorbansi dari setiap variasi konsentrasi dicatat dan dihitung % *scavenging* dan nilai IC₅₀ pengujian dilakukan sebanyak dua kali.

Perhitungan nilai IC₅₀ dinyatakan dengan persamaan regresi linear dan perhitungan % *scavenging* dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ scavenging} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100\%$$

Keterangan

A_{kontrol} = Absorbansi DPPH, A_{sampel} = Absorbansi DPPH + sampel

3. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi

Kulit batang *Chisocheton sp. (C.DC)* Harms dihaluskan sampai berbentuk serbuk dengan menggunakan blender, yang bertujuan untuk memperkecil ukuran sampel. Semakin kecil ukuran sampel, semakin besar luas permukaan sehingga dapat mempengaruhi interaksi sampel dengan pelarut maka proses ekstraksi dengan metode maserasi berlangsung optimal dan menghasilkan ekstrak yang maksimal. Ditimbang 200 gram serbuk

kering kulit batang *Chisocheton sp. (C.DC)* Harms di maserasi berturut-turut dengan *n*-hexan, etil asetat dan metanol. Diperoleh ekstrak pekat *n*-heksane 7,193 g, ekstrak etil asetat 8,798 g dan ekstrak metanol 18,683 g.

Identifikasi Fitokimia

Hasil identifikasi fitokimia kulit batang *Chisocheton sp. C.DC* Harms dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi skrinning fitokimia

Senyawa	Ekstrak	Perubahan Warna	Keterangan
Alkaloid	Metanol	Orange kecokelatan menjadi orange	- Alkaloid
	Etil asetat	Orange menjadi kuning	- Alkaloid
	<i>n</i> -heksan	Kuning pudar menjadi kuning	- Alkaloid
Flavonoid	Metanol	Orange kecokelatan menjadi orange kemerahan	+ Flavonoid
	Etil asetat	Cokelat menjadi orange kemerahan	+Flavonoid
	<i>n</i> -heksana	Kuning pudar menjadi bening	- Flavonoid
Tanin	Metanol	Cokelat menjadi biru tua	+ Tanin
	Etil asetat	Cokelat menjadi biru tua	+ Tanin
	<i>n</i> -heksana	Kuning pudar menjadi kuning	- Tanin
Steroid dan Triterpenoid	Metanol	Orange kecokelatan menjadi jingga	+ Triterpenoid
	Etil asetat	Cokelat menjadi jingga	+ Triterpenoid
	<i>n</i> -heksana	Kuning pudar menjadi bening	- Steroid dan Triterpenoid
Saponin	Metanol	Orange kecokelatan menjadi orange	- Saponin
	Etil asetat	Cokelat menjadi orange	- Saponin
	<i>n</i> -heksana	Kuning pudar menjadi bening	- Saponin

Hasil skrining fitokimia pada Tabel 1, ekstrak metanol dan etil asetat menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, tanin dan triterpenoid.

Kandungan Total Fenolik

Uji kandungan total fenolik dengan metode Folin-Ciocalteu bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol kulit batang *Chisocheton sp.*

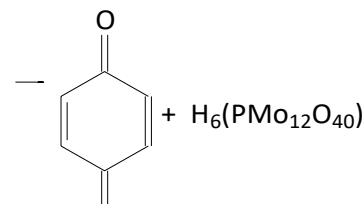
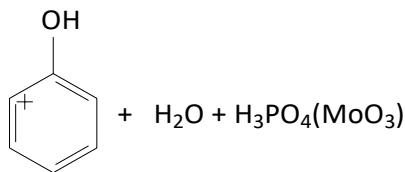
C.DC Harms. Metode ini didasarkan pada kemampuan ekstrak untuk mereduksi reagen Folin-Ciocalteu (kuning) yang mengandung senyawa fosfomolibdat dan asam fosfotungstat menghasilkan senyawa kompleks molybdenum-fungstat berwarna biru (Julkunen-Tiito, 1985). Semakin biru intensitas warna larutan menunjukkan kandungan total fenol dalam sampel semakin besar (Larson, 1988). Hasil kandungan total fenolik dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kandungan total fenolik ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-heksana kulit batang *Chisocheton sp.* *C.DC Harms*

Ekstrak	Absorbansi		Kandungan Total Fenolik		Rata-rata
	I	II	I	II	
Metanol	0.634	0.635	91.46031746	91.61904762	91.54
Etil asetat	0.654	0.656	94.63492063	94.95238095	94.79
<i>n</i> -heksane	0.206	0.208	23.52380952	23.84126984	23.68

Berdasarkan Tabel 2, menunjukkan bahwa kandungan total fenolik terbesar ada pada ekstrak etil asetat yakni 94.79%, ekstrak metanol 91.54%, dan ekstrak *n*-heksana 23.68%. Hal ini dikarenakan pelarut etil asetat dapat melarutkan senyawa fenolik

yang lebih banyak sehingga menunjukkan sebagian besar senyawa fenolik yang terdapat pada kulit batang *Chisocheton sp.* *C.DC Harms* merupakan senyawa yang bersifat semipolar. Rohman dkk (2006) melaporkan bahwa pelarut etil asetat sangat cocok untuk mengekstraksi senyawa fenolik

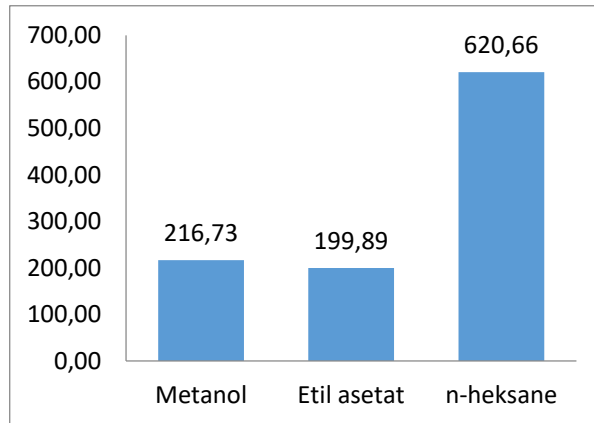


+ +

Senyawa Fenol Reagen Folin Ciocalteu Kuinon Kompleks Molybdenum blue
Gambar 2. Reaksi Senyawa Fenol dengan Reagen Folin-Ciocalteu (Hardiana dkk., 2012)

Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode Muaja dkk (2017). Hasil uji aktivitas antioksidan terdapat pada Gambar 1.

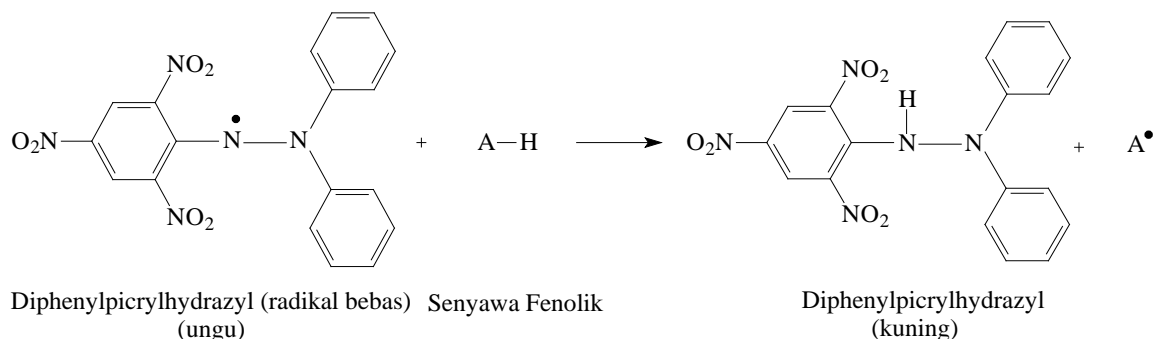


Gambar 1. Aktivitas Antioksidan Ekstrak metanol, etil asetat dan n-heksane dari kulit batang *Chisocheton sp. C.DC Harms*

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan hasil ekstrak etil asetat memiliki nilai IC₅₀ yang paling rendah yaitu 199,89 µg/mL, ekstrak metanol 216,73 µg/ml, dan ekstrak *n*-heksana 620,66 µg/ml. Semakin rendah IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya.

Penentuan nilai aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Metode ini merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Metode ini menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang 517

nm. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration*). IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat karena mempunyai nilai IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml (Blouis, 1958). Hasil reaksi antara penangkap radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan dapat diketahui melalui perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning akibat terjadi resonansi struktur penangkap radikal bebas DPPH.



Gambar 6. Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh fenolik (Suryanto,2012)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Uji fitokimia ekstrak kulit batang *Chisocheton* sp. (C.DC) Harms, menunjukkan adanya senyawa Flavonoid, triterpenoid dan tanin dan memiliki aktivitas antioksidan. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak *n*-heksana

Saran

Dengan adanya golongan senyawa metabolit dan beraktivitas antioksidan dari kulit batang tumbuhan *Chisocheton* sp. (C.DC) Harms, perlu dilakukan penelitian selanjutnya terutama isolasi senyawa untuk mendapatkan senyawa murni, sehingga diperoleh struktur senyawa fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Blouis, M. S., 1958, Antioxidant Determinations By The Use Of a Stable Free Radical, *Nature*, 1199-1200.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physical Review*. **82(1)** : 47-95
- Hardiana, R., Rudiyanasyah., dan Zaharah, T. A. 2012. Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Fenol dari Beberapa Jenis Tumbuhan Famili Malvaceae. *JKK*. **1(1)** : 8-13
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Badan Litbang Departemen Kehutanan. Jakarta
- Inada, A., Sukemawa, M., Murata, H., Nakanishi, T., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, Darnaedi, D., J and Murata, J., 1993. Phytochemical studies on Maleaceous Plant. Part

- VIII. Structures and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of Triterpenoids from Leaves of *Chisocheton macrophyllus* King. *Chem. Pharm. Bull.* **41(3)** : 617-619
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., dan Madhavi, D.L. 1996. Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. Dalam D. L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe (eds). *Food Antioxidants Technological, Toxicological, and Health, Drespectives*. Marcel Dekker, Inc, New York
- Karuppusamy, S., Kiranmai, C., Aruna, V., & Pullaiah. 2009. *In vitro* conservation of *Ceropegia intermedia*- An endemic plant of south India. *J. African Biotech* **8**: 4052-4057
- Khlifi, S., Hachimi, Y., Khalil, A., Essafi, N., dan Abbouyi, A. 2005. In Vitro Antioxidant Effect of *Globularia alypum* L. Hydromethanolic Extract. *Indian Journal of Pharmacology.* **37(4)** : 227-231
- Landeng, P. J., Suryanto, E., dan Momuat, L. I. 2017. Komposisi Proksimat dan Potensi Antioksidan dari Biji Jagung Manado Kuning (*Zea mays* L.) *Chemistry Progress.* **10(1)** : 36-44
- Larson, R.A. 1988. The Antioxidants of Highest Plants. *Phytochemistry.* **27(4)** : 969-977
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Materials Science & Technology.* **26(2)** : 211- 219
- Muaja, M. G. D., Runtuwene, M. R. J., dan Kamu, V. S. 2017. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dari Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC). *Jurnal Ilmiah Sains.* **17(1)** : 68-72
- Rohman, A., Riyanto, S., dan Utari, D. 2006. Aktivitas Antioksidan, Kandungan Fenolik Total dan Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Buah Mengkudu serta Fraksi-Fraksinya. *Majalah Farmasi Indonesia.* **17(3)** : 136-142
- Takashi, M., dan Takayuki, S. 1997. Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **45(5)** : 1819-1822
- Vossen, V. D., H. A. M., and Umali, B. E. (Editors). 2002. Plant resources of south-east Asia no. 14 vegetable oils and fats, Proses Foundation. Bogor. Indonesia
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita., dan Erowati, T. I. 2001. Uji Perendam Radikal Bebas terhadap 1,1- Diphenyl-2Picrylhydrazil (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus.* **1(1)** : 34-43

