**BAB I**

**TINJAUAN PUSTAKA**

Kunyit dikenal dengan nama latin Curcuma domestica val. Tanaman kunyit terdiri dari daun, akar (rimpang), bunga, batang dan kunyit itu sendiri. Kunyit merupakan tanaman semak, tingginya dapat mencapai 70 cm sampai 1 meter. Batang semu, tegak, bulat, membentuk rimpang, warnanya hijau kekuningan. Berdaun tunggal, lanset memanjang, helai daun tiga sampai delapan, ujung dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 20-40 cm, lebar 8-12,5 cm, pertulangan menyirip, hijau pucat. Bunga majemuk, berambut, bersisik, tangkai panjang 16-40 cm, mahkota panjang ± 3 cm, lebar ± 1,5 cm, kuning, kelopak silindris, bercangap tiga, tipis, ungu, pangkal daun pelindung putih, ungu dan akar serabut, coklat muda (Soedibyo, 1997).

 

 Gambar 1. Tanaman kunyit. Gambar 2. Daun kunyit

1. **Taksonomi**

Taksonomi adalah ilmu penggolongan makhluk hidup, yaitu suatu system klasifikasi ilmiah yang menggolongkan makhluk hidup dari nenek moyangnya sampai spesiesnya. Fungsi taksonomi adalah sebagai pengenalan atas suatu jenis makhluk hidup, sehingga masing-masing ilmuwan di berbagai Negara dapat langsung mengetahui makhluk hidup apa yang dimaksudkan.

Daun kunyit memiliki taksonomi yang sama seperti tanaman kunyit. Hal ini dikarenakan daun kunyit merupakan bagian dari tanaman kunyit. Taksonomi dari tanaman kunyit antara lain :

 Tabel 1. Taksonomi tanaman kunyit



1. **Manfaat daun kunyit**

Daun kunyit dapat dimanfaatkan sebagai pemberi aroma pada masakan. Aroma ini berasal dari minyak atsiri yang merupakan salah satu senyawa yang terkandung dalam daun kunyit. Selain untuk memberi aroma pada masakan, daun kunyit juga dapat digunakan sebagai antiseptik, mencegah batuk dan juga sebagai anti kanker.

Daun kunyit pun ternyata bermanfaat juga untuk hati.Ekstrak daun dan rimpang kunyit dapat meningkatkan aliran empedu dan memberikan perlindungan kantong empedu. Antioksidan di dalamnya akan meningkatkan kekebalan dan pertahanan terhadap serangan berbagai penyakit. Ekstrak daun dilaporkan memiliki sifat anti kanker dan bahkan jumlah tertentu dari daun dan rimpang telah terbukti mampu menghambat pembelahan sel leukemia pada anak-anak. Juga memberikan perlindungan dari kerusakan sel-sel tubuh yang disebabkan karena asupan junk food, makanan olahan dan asap rokok. Batuk dan pilek pun bisa dengan mengambil manfaat daun kunyit ini.

1. **Kandungan senyawa dalam daun kunyit**

Daun kunyit mengandung berbagai senyawa antara lain : protein (2,20%), minyak atsiri dengan komponen utamanya adalah 1,8-sineol, dan lemak (2,04%). Selain itu, daun kunyit juga mengandung senyawa flavonoid, fenolik dan tannin yang dapat ditentukan dengan skrinning senyawa fitokimia.

Komponen minyak atsiri dalam daun kunyit dapat bersifat sebagai antibakteri dan juga mempengaruhi kesehatan. Minyak atsiri daun kunyit terdiri dari komponen-komponen yang tergolong monoterpen, sesquiterpen, diterpen, politerpen, alcohol, aldehid, keton, ester, dan eter. Menurut caragay (1992) ada 14 komponen fitokimia yang diketahui memiliki aktivitas dapat mencegah kanker, diantaranya monoterpen, triterpen, sesquiterpen, dan flavonoid. Komponen minyak atsiri daun kunyit yang berhasil diidentifikasi oleh dung et. al. (1995) sekitar 50 komponen, diantaranya δ-limonen, α-pinen dan mycrene. Elson dan Yu (1994) menyatakan bahwa δ-limonen bersifat antikarsinogenis yang mencegah terbentuknya senyawa karsinogen dari precursor dan mencegah reaksi dengan target (blocking agent) dan menekan pertumbuhan tumor (suppressing agent). Disamping itu, komponen lain juga dilaporkan bersifat sebagai bakteriostatik (β-pinen, 1,8-sineol dan terpinen); mengobati radang pernapasan (1,8-sineol); tonikum lambung, karminatif dan antidiuretika (β-pinen) (Knockblock et al.,1989 Stahl, 1985).

**BAB II**

**TEKNIK MASERASI**

Maserasi istilah aslinya adalah macerare (bahasa Latin, artinya merendam) : adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi bahan nabati yaitu direndam menggunakan pelarut bukan air (pelarut nonpolar) atau setengah air, misalnya etanol encer, selama periode waktu tertentu sesuai dengan aturan dalam buku resmi kefarmasian (Farmakope Indonesia, 1995). Langkah kerjanya adalah merendam simplisia dalam suatu wadah menggunakan pelarut penyari tertentuk selama beberapa hari sambil sesekali diaduk, lalu disaring dan diambil beningannya. Selama ini dikenal ada beberapa cara untuk mengekstraksi zat aktif dari suatu tanaman ataupun hewan menggunakan pelarut yang cocok. Pelarut-pelarut tersebut ada yang bersifat “bisa campur air” (contohnya air sendiri, disebut pelarut polar) ada juga pelarut yang bersifat “tidak campur air” (contohnya aseton, etil asetat, disebut pelarut non polar atau pelarut organik).

Teorinya, ketika simplisia yang akan di maserasi direndam dalam pelarut yang dipilih, maka ketika direndam, cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang penuh dengan zat aktif dan karena ada pertemuan antara zat aktif dan penyari itu terjadi proses pelarutan (zat aktifnya larut dalam penyari) sehingga penyari yang masuk ke dalam sel tersebut akhirnya akan mengandung zat aktif, katakan 100%, sementara penyari yang berada di luar sel belum terisi zat aktif (nol%) akibat adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel ini akan muncul gaya difusi, larutan yang terpekat akan didesak menuju keluar berusaha mencapai keseimbangan konsentrasi antara zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses keseimbangan ini akan berhenti, setelah terjadi keseimbangan konsentrasi (istilahnya “jenuh”). Dalam kondisi ini, proses ekstraksi dinyatakan selesai, maka zat aktif di dalam dan di luar sel akan memiliki konsentrasi yang sama, yaitu masing-masing 50%.

* **Keuntungan dari metode ini** :
1. Unit alat yang dipakai sederhana, hanya dibutuhkan bejana perendam
2. Biaya operasionalnya relatif rendah
3. Memerlukan larutan pengekstrak yang relative sedikit
4. Tanpa pemanasan
* **Kelemahan dari metode ini** :
1. Proses penyariannya tidak sempurna, karena zat aktif hanya mampu terekstraksi sebesar 50% saja
2. Prosesnya lama, butuh waktu beberapa hari.

Pada teknik maserasi daun kunyit digunakan pelarut methanol 80%, etanol 80%, dan aseton 80%. Perendaman dimulai dari pelarut nonpolar (aseton), kemudian pelarut semipolar (etanol) dan terakhit pelarut polar (methanol). Langkah kerjanya antara lain:

Lakukan rotary evaporator untuk menguapkan pelarut

Direndam dalam pelarut aseton 80% selama 24 jam, kemudian disaring dengan kertas saring whatman no.41 (ambil filtrat)

Ditimbang sebanyak 15 gram daun kunyit yang sudah dipotong kecil-kecil

Hasil rotary dikembalikan ke dalam daun kunyit untuk direndam kembali dengan aseton 80%.

Disaring kembali (ambil filtat) dan dilakukan rotary kembali dan didapatkan hasil ekstraksi untuk pelarut aseton 80%

Diberikan perlakuan yang sama saat daun kunyit direndam dengan etanol 80% dan methanol 80%

Hasil ekstraksi dari 3 pelarut akan digunakan untuk uji aktivitas dan skrinning fitokimia.

**BAB III**

**TEKNIK ISOLASI DALAM DAUN KUNYIT**

 Daun kunyit biasanya digunakan untuk memberi aroma pada masakan seperti rendang, gulai dan sebagai pembalut ikan atau daging yang dibakar. Aroma dari masakn tersebut muncul karena adanya kandungan minyak atsiri dalam daun kunyit.

Minyak atsiri yang dikenal juga dengan minyak eteris atau minyak terbang (essential oil, volatile oil) dihasilkan oleh tanaman. Minyak tersebut mudah menguap pada suhu kamar tanpa mengalami dekomposisi, rasa getir (pungent taste), berbau wangi sesuai dengan bau tanaman penghasilnya, umumnya larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air (Ketaren, 1985).

Kegunaan minyak atsiri sangat luas dan spesifik, khususnya dalam berbagai bidang industri, antara lain dalam industri kosmetik (sabun, pasta gigi, sampo, losion); dalam industri makanan sebagai bahan penyedap atau penambah cita rasa; dalam industri parfum sebagai pewangi; dalam industri farmasi atau obat-obatan sebagai antinyeri, antiinfeksi, pembunuh bakteri; dalam industri bahan pengawet; bahkan digunakan pula sebagai insektisida, oleh karena itu tidak heran jika minyak atsiri banyak diburu berbagai negara (Lutony & Rahmayati,1994).

Beberapa metode isolasi minyak atsiri seperti penyulingan, pengepresan, ekstraksi dengan pelarut menguap, ekstraksi dengan lemak padat. Namun, sebagian besar minyak atsiri diperoleh melalui metode penyulingan yang dikenal juga dengan hidrodestilasi (Guenther, 1987;Lutony & Rahmayati, 1994). Meskipun proses pengambilan minyak atsiri melalui metode penyulingan merupakan model tertua, tetapi hingga kini masih banyak dilakukan oleh para perajin minyak atsiri di berbagai negara, khususnya negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia (Lutony & Rahmayati, 1994).

Isolasi minyak atsiri dalam daun kunyit akan menggunakan metode penyulingan. Berikut adalah *flowsheet* yang menunjukkan langkah kerja dari isolasi minyak atsiri dalam daun kunyit. Skema flowsheet tersebut antara lain:



Gambar 3. Flowsheet Isolasi Minyak Atsiri Rimpang/Daun Kunyit .



Gambar 4. minyak atsiri hasil destilasi uap

Keterangan:

A. Minyak atsiri dari simplisia rimpang kunyit

B. Minyak atsiri dari simplisia daun kunyit

Berikut adalah beberapa struktur senyawa yang ada dalam minyak atsiri daun kunyit, antara lain :



 1,8-sineol β-Seskuifellandren p-Cymen



 α-fellandren α-Terpinolen

**BAB IV**

**SKRINING FITOKIMIA**

Skrining fitokimia adalah metode analisis untuk menentukan jenis metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuh-tumbuhan karena sifatnya yang dapat bereaksi secara khas dengan pereaksi tertentu. Skrining fitokimia dilakukan melalui serangkaian pengujian dengan menggunakan pereaksi tertentu. Beberapa jenis pereaksi yang dapat digunakan untuk skrining fitokimia antara lain:

1. **Uji Senyawa Fenol dan Flavonoid**

Fenol dan flavonoid dapat dideteksi menggunakan larutan FeCl3 1% dalam etanol. Hasil uji dianggap positif apabila dihasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam. Uji shinoda (Mg dan HCl pekat) dapat juga digunakan untuk mendeteksi flavonoid. Flavonoid akan menunjukkan warna merah ceri yang sangat kuat jika disemprot dengan pereaksi ini (Harborne, 1987).

1. **Uji Kumarin dan Antrakuinon**

Kumarin dan antrakuinon dapat dideteksi menggunakan pereaksi semprot NaOH dan KOH 5% dalam alkohol. Setelah penyemprotan, kumarin akan berfluorosensi hijau-kuning yang terlihat bila plat KLT yang sudah kering disinari dengan sinar UV. Antrakuinon dapat dideteksi bila senyawa pada plat KLT yang semula kuning dan coklat kuning berubah menjadi merah, ungu, hijau, atau lembayung setelah disemprot (Harborne, 1987).

1. **Terpenoid**

Daun kunyit yang telah dikeringkan, dihaluskan dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi kloroform. Kemudian dipanaskan hingga ¼ volume awal dan disaring. Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam 3 buah tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi 1 ditetesi CeSO4 1%, tabung reaksi 2 ditetesi Salkowasky, tabung reaksi 3 ditetesi Libermen-Bouchard. Diamati perubahan warna yang terbentuk pada masing-masing tabung dan dicatat hasilnya, pada tabung 1 menghasilkan larutan berwarna coklat, tabung 2 menghasilkan larutan berwarna merah, tabung 3 menghasilkan larutan berwarna hijau kebiruan**.**

1. **Uji Alkaloid**

Daun kunyit yang telah dikeringkan, dihaluskan dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi metanol. Kemudian dipanaskan hingga ¼ volume awal dan disaring. Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam 4 buah tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi 1 ditetesi Meyer, tabung reaksi 2 ditetesi Wagner, tabung reaksi 3 ditetesi Bouchard, tabung reaksi 4 ditetesi Dragendorf. Diamati perubahan warna yang terjadi pada masing-masing tabung dan dicatat hasilnya, pada tabung 1 menghasilkan endapan berwarna putih, tabung 2 menghasilkan endapan berwarna coklat tua, tabung 3 menghasilkan endapan berwarna coklat muda dan tabung 4 menghasilkan endapan berwarna merah bata**.**

Seperti yang kita ketahui, daun kunyit mengandung senyawaan fenolik, flavonoid dan tanin. Sehingga skrinning fitokimia yang dilakukan untuk daun kunyit adalah skrinning fitokimia untuk mengidentifikasi ketiga senyawaan tersebut dalam ketiga ekstrak yang telah didapatkan dalam proses maserasi. Langkah kerja skrinning fitokimia untuk daun kunyit antara lain:

1. **Penentuan kandungan total fenol**

***Fenolik*** merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Fenolik memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil (OH-) dan gugus-gugus lain penyertanya. Senyawa ini diberi nama berdasarkan nama senyawa induknya, fenol. Kelompok terbesar dari senyawa fenolik adalah flavonoid, merupakan senyawa yang secara umum dapat ditemukan pada semua jenis tumbuhan. Kuinon adalah senyawa turunan fenolik yang berwarna dan mempunyai kromofor kasar. Identifikasi hasil positif senyawa ini yaitu adanya perubahan warna larutan menjadi merah, violet, atau merah-ungu (Harborne, 1987).

Total fenol dalam sampel ditentukan dengan metode Jeong et al. (2005). Sampel ekstrak sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (50%) dalam tabung reaksi dan kemudian campuran ini dikocok selama 3 menit. Setelah interval waktu 3 menit, 1 mL larutan Na2CO3 2% ditambahkan. Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi ekstrak dibaca dengan spektrofotometer pada λ 750 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan asam galat sebagai standar.

1. **Penentuan kandungan total flavonoid**

***Flavonoid*** adalah suatu kelompoksenyawa fenol yang terbanyak terdapat di alam.Senyawa-senyawa ini bertanggung jawab terhadap zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning dalam tumbuhan. Sebagian besar flavonoid yang terdapat pada tumbuhan terikat pada molekul gula sebagai glikosida dan dalam bentuk campuran, jarang sekali dijumpai dalam (berupa) senyawa tunggal. Di dalam senyawaan flavonoid terdapat senyawa yang memiliki berbagai macam bioaktivitas seperti antiinflamasi, antikanker, antifertilitas, antiviral, antidiabetes, antidepresan, diuretik, dan lain-lain.

Prosedur penentuan kandungan flavonoid menggunakan metode Meda et al. (2005). Lima mililiter ekstrak daun kunyit ditambahkan dengan 5 mL aluminium klorida 2% yang telah dilarutkan dalam metanol, kemudian divortek dan ditera pada λ 415 nm. Kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin dalam mg/kg ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan kuersetin sebagai standar.

1. **Penentuan tanin terkondensasi**

Senyawa tanin merupakan senyawa polifenol yang berada di tumbuhan, makanan dan minuman (Makkar and Becker, 1998) dapat larut dalam air dan pelarut organik (Haslam, 1996). Senyawa tanin digunakan untuk proses tanning atau penyamakan kulit binatang yang digunakan industri kulit, untuk pembuatan tinta, digunakan untuk obat-obatan sebagai astringen dan untuk pewarnaan (cat) (Ledder, 2000).

Tanin ditemukan hampir di setiap bagian dari tanaman; kulit kayu, daun, buah, dan akar (Hagerman, 1998). Tanin dibentuk dengan kondensasi turunan flavan yang ditransportasikan ke jaringan kayu dari tanaman, tanin juga dibentuk dengan polimerisasi unit quinon (Anonymous, 2005).

 Secara kimia tanin tumbuhan dibagi menjadi dua golongan yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer. Asam elagat merupakan hasil sekunder yang terbentuk pada hidrolisis beberapa tanin yang sesungguhnya merupakan ester asam heksaoksidifenat. Tanin terkondensasi merupakan senyawa tidak berwarna yang terdapat pada seluruh dunia tumbuhan tetapi terutama pada tumbuhan berkayu. Tanin terkondensasi telah banyak ditemukan dalam tumbuhan paku-pakuan (Robinson, 1995).



Gambar 5. Struktur Inti Tanin

Kandungan tanin terkondensasi sampel ditentukan menurut metode Julkunen-Tinto (1985). Sebanyak 0,1 mL ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi yang dibungkus aluminium foil, lalu ditambahkan 3 mL larutan vanilin 4% (b/v) dalam metanol dan dikocok. Segera sesudah ditambahkan 1,5 mL HCl pekat dan dikocok lagi. Absorbansi dibaca pada λ 500 nm setelah campuran diinkubasi selama 20 menit pada suhu kamar. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar katekin yang dipersiapkan dengan cara yang sama. Kandungan tanin terkondensasi dinyatakan sebagai mg/kg ekstrak.

**BAB V**

**UJI AKTIVITAS DAUN KUNYIT**

1. **Uji aktivitas antioksidan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)**

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menangkal efek negatif radikal bebas yang terbentuk sebagai metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh dengan memberikan satu elektronnya kepada senyawa radikal bebas.

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya, sehingga menyebabkan elektron yang tidak berpasangan berusaha mendapatkan pasangannya dengan cara menyerang dan mengikat elektron yang berada disekitarnya. Secara umum terdapat 3 tahapan pembentukan radikal bebas, yaitu:

1. Inisiasi (awal pembentukan).
2. Propagasi (pemanjangan rantai radikal).
3. Terminasi (radikal bebas bereaksi dengan radikal bebas lainnya atau dengan penangkapan radikal yang menyebabkan pemanjangan

rantainya rendah).



Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sel endotel dengan cara bereaksi dengan nitrat oksida menjadi peroksinitrit10. Pembuluh darah diseluruh tubuh dapat terkena efeknya sehingga bisa timbul keadaan seperti:

* Kerusakan pada pembuluh darah yang ada di retina mata menyebabkan penurunan daya penglihatan sampai bisa terjadi kebutaan.
* Kerusakan pada pembuluh darah ginjal di glomerulus.
* Menurunnya sistem pertahanan tubuh.
* Kerusakan pada pembuluh darah koroner dapat meningkatkan risiko terjadinya penyakit jantung koroner dan stroke.

 Radikal bebas dapat dihambat dengan cara mencegah dan menghambat terbentuknya radikal bebas baru, menangkap radikal bebas, pemutusan rantaian dengan memotong propagasi, dan memperbaiki kerusakan yang disebabkan radikal bebas. Secara umum antioksidan digolongkan menjadi 2 yaitu :

* Antioksidan enzimatis: enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (GSH.Prx).
* Antioksidan non-enzimatis

-Larut lemak: tokoferol, karatenoid, flavonoid, dan quinon.

-Larut air: asam askorbat (Vitamin C), asam urat, protein pengikat logam, dan aprotein pengikat hem.

 Selain itu, antioksidan juga digolongkan berdasarkan mekanisme kerjanya menjadi 3 kelompok, yaitu :

* Antioksidan primer

Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dapat dikatakan sebagai antioksidan primer adalah suatu senyawa yang mampu dengan cepat memberikan atom hidrogen kepada senyawa radikal bebas sehingga berubah menjadi molekul yang kurang reaktif dan mencegah pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai (polimerasi), kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil.17

* Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogen atau non-enzimatis. Mekanisme kerjanya dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Antioksidan non-enzimatis dapat berupa komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan.

* Antioksidan tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi sebagai perbaikan biomolekuler sel yang rusak akibat efek radikal bebas.

 Penentuan adanya aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun kunyit dilakukan dengan metode DPPH. Prinsipnya, pada metode DPPH melihat perubahan warna DPPH dalam larutan dari ungu pekat menjadi kuning pucat karena aktivitas sampel yang mengandung antioksidan yang mampu menangkap dan meredam aktivitas radikal bebas. Semakin banyak DPPH yang diredam, warna larutan semakin berubah menjadi pucat. Perubahan warna selain dapat dilihat secara kualitatif juga bisa menggunakan spektrofotometer dan nilai absorbansinya. Pada spektrofotometer akan dilihat perubahan serapan warna (nilai absorbansi). Absorbansi yang baik untuk larutan DPPH adalah kurang dari 1. Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan pada sampel dilihat dari nilai efficient concentration (EC50) atau Inhibition Contentration (IC50) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan sifat radikal bebasnya. Semakin kecil nilai IC50 semakin tinggi aktivitas antioksidan pada sampel.

Tabel 2. Hubungan antara nilai IC50 dan aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun kunyit



 Pengerjaan menggunakan DPPH harus cepat dan hati-hati karena molekul DPPH mudah terdegradasi oleh cahaya dan oksigen. Namun, metode DPPH lebih sederhana, akurat, cepat, dan bisa dilakukan dengan sedikit Sampel. Berikut adalah kerangka teori yang dapat menjelaskan bagaimana penentuan uji aktivitas antioksidan pada ekstak daun kunyit.



Gambar 6. Kerangka teori penentuan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun kunyit

 Sedangkan, langkah kerja dalam penetapan aktivitas antioksidan dalam ekstrak daun kunyit antara lain : Penentuan aktivitas penangkapan (scavenger) radikal bebas dari ekstrak daun kunyit diukur dengan metode Burda and Oleszek (2001) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,1 mM larutan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dalam etanol dipersiapkan kemudian 2 mL dari larutan ini ditambahkan 0,5 mL sampel ekstrak tanaman. Tingkat berkurangnya warna dari larutan menunjukkan efesiensi penangkapan radikal. Lima menit terakhir dari beberapa menit, absorbansi diukur pada λ 517 nm. Persentase aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus:

1. **Uji aktivitas antikanker**

Sel tubuh manusia mempunyai kemampuan untuk membelah. Proses ini menjaga agar masa sel dari organ dalam tubuh tetap optimal. Apabila sel tubuh mulai membelah dan bertambah banyak tanpa tujuan, maka keadaan ini dapat menyebabkan terbentuknya tumor (Frenkle, 1983).

Tumor yang disebabkan oleh proliferasi sel disebut neoplasma. Jika neoplasma memasuki jaringan disekitarnya dan menyebar keseluruh tubuh, maka disebut neoplasma malignant (kanker).

Dalam mematikan sel kanker dibutuhkan sel NK (Natural Killer). Sel NK merupakan subset sel limfosit yang terdapat pada darah maupun organ limfoid perifer manusia normal (Bellanti, 1993). Menurut Bratawidjaya (1991) jumlah sel NK pada manusia normal sekitar 10-15% dari limfosit perifer dan 1-2% dari limfosit limfa. Selain itu, komponen antikanker dapat bersifat langsung menghancurkan sel kanker, bersifat sebagai immunostimulat dan juga dapat bersifat sebagai antioksidan dengan melindungi sel-sel imun dari serangan senyawa radikal bebas.

Buah-buahan, sayuran, biji-bijian sereal menurut Elson dan Yu (1994) merupakan sember yang kaya akan komponen-komponen yang bersifat antikarsinogenik, yaitu yang berasl dari produk samping dari metabolisme *mevalonat*.

Seperti yang sudah dijelaskan bahwa tanaman dapat berperan dan mempengarhi aktivitas sel NK yang dapat mematikan sel kanker. Hal tersebut juga berlaku pada daun kunyit yang didalamnya memang terdapat senyawa-senyawa yang bersifat karsinogenik. Senyawa-senyawa tersebut antara lain : monoterpen, triterpen, sesquiterpen, dan flavonoid.

Langkah kerja yang dilakukan untuk menguji pengaruh ekstrak daun kunyit terhadap aktivitas sel NK antara lain : sebelum dilakukan pengujian pengaruh ekstrak terhadap aktivitas sel NK dalam melilis sel K-562 dilakukan persiapan terlebih dahulu yaitu persiapan media, pemeliharaan sel K-562, sterilisasi dan pengenceran ekstrak, isolasi sel limfosit serta pelabelan sel target.

1. Persiapan media

Media yang digunakan untuk kultur sel adalah RPMI-1640. RPMI-1640 dilarutkan dalam aquabides, sehingga diperoleh larutan RPMI-1640. Kemudian ditambahkan NaHCO3 dan 1% gentamycin. Campuran ini kemudian diaduk sampai tercampur rata dan disterilisasi dengan membrane sterilisasi 0,22 mikrometer (media semi lengkap). Media lengkap (untuk kultur sel) dibuat dengan menambahkan 10% FBS yang telah disterilisasi dan diinaktivasi pada suhu 560C selama 30 menit. Penambahan FBS bertujuan untuk melengkapi media dengan cairan tubuh yang kaya akan hormon dan faktor pertumbuhan.

1. Pemeliharaan sel K-562

Pemeliharaan sel dilakukan dengan mengganti media kultur setiap interval 2 hari, dan jika sel dalam kultur terlalu padat dilakukan split, yaitu sel dibagi kedalam wadah kultur yang bau dengan sel sebanyak 1x106 sel/ml. perubahan warna media dari warna merah menjadi warna kuningterjadi akibat penurunan pH dan hal ini dijadikan indikasi untuk mengganti media.

1. Perhitungan sel
2. Sterilisasi dan pengenceran ekstrak
3. Isolasi sel limfosit (Zakaria et al., 1997)
4. Pelabelan sel target
5. Pengujian pengaruh ekstrak terhadap aktivitas sitolitik sel NK

Kultur sel sebgai salah satu cara untuk menguji pengaruh ekstrak terhadap aktivitas sel NK dalam melisis sel K-562 dilakukan diruang steril dengan system pengaliran udara laminar dan dengan cara yang aseptis. Ruang dan peralatan yang akan digunakan disinari terlebih dahulu dengan sinar uv selama 5 menit.

Pada makalah ini akan diuji pengaruh ekstrak terhadap aktivitas sel NK pada 2 perbandingan SE dan ST yaitu pada 50:1 dan 100:1 dengan konsentrasi sel target (ST) 2x104 sel/ml, sehingga dibutuhkan sel efektor (SE) dengan konsentrasi 2x106 sl/ml dan 1x106 sel/ml. pengkulturan dilakukan dengan memasukkan kedalam semur pada lempeng mikro 96 sumur 80 mikroliter yang akan diuji, 20 mikroliter FBS, 50 mikroliter sel K-562, 50 mikroliter sel efektor, kemudian diinkubasi selama 4 jam. Setelah inkubasi, sel dibekukan dengan menggunakan es kering. Pada saat akan dipanen sel terlebih dahulu di thawing paa suhu ruang hingga cair. Pemanenan dilakukan dengan alat call harvester dan dilakukan pencucian sebanyak 10 kali. Setelah dipanen pada membrane filter 1.0 mikrometer, dilakukan pembacaan pancaran sinar β dengan menggunakan β-counter dan dinyatakan dalam cpm (count per minute), dimana semakin banyak sel yang lisis cpm-nya akan semakin kecil. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak sel efektor yang dikultur, semakin besar pula kemampuannya dalam melisis sel target, sehingga aktivitas antikanker dalam sampel tersebut semakin kuat.

1. **AKTIVITAS PENSTABIL OKSIGEN SINGLET**
* Penentuan aktivitas ekstrak daun kunyit terhadap fotooksidasi asam linoleat

Penentuan kemampuan penstabil oksigen singlet (SOQ) dari ekstrak daun kunyit terhadap asam linoleat menggunakan metode Lee et al. (1997) dengan sedikit dimodifikasi. Pengaruh ekstrak daun kunyit terhadap oksidasi oksigen singlet dalam asam linoleat 0,03 M menggunakan konsentrasi 500-1500 ppm yang dipersiapkan dalam etanol dan mengandung eritrosin 5 ppm sebagai sensitiser. Sampel dari campuran tersebut sebanyak 10 mL diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 30 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya fluoresen 4.000 lux selama 5 jam dengan pengamatan setiap 1 jam. Angka peroksida diukur dengan metoda AOCS (1990). Penelitian yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

* Penentuan aktivitas ekstrak daun kunyit terhadap fotooksidasi protein

Penentuan kemampuan SOQ dari ekstrak daun kunyit terhadap protein (bovine serum albumin, BSA) menggunakan metode Oh et al. (2006). Sebanyak 500 µL ekstrak EM, EE dan EA (500-1500 ppm), 10 mg bovine serum albumin (BSA) dan eritrosin 5 ppm dan dilarutkan dengan 2 mL buffer fosfat 0,15 M (pH 7,4). Sampel dari campuran tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam botol serum yang berukuran 10 mL yang dilengkapi dengan penutup karet dan aluminium foil. Botol tersebut kemudian diletakkan dan disimpan di dalam kotak cahaya (70 x 50 x 60 cm) dengan intensitas cahaya fluorescent 4.000 lux selama 4 jam. Setelah 4 jam pencahayaan, 0,5 mL sampel ditambah dengan 2 mL 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) 2,5 M, divorteks dan diinkubasi selama 45 menit dan divortex tiap 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 2 mL TCA 20% dan disentrifus selama 5 menit, supernatan dibuang dan endapan yang terjadi ditambahkan dengan TCA 10%, disentrifus selama 5 menit dan supernatan dibuang. Endapan yang terjadi ditambahkan 3 x 2 mL etanol-etil asetat (1:1) dan disentrifusi selama 5 menit dan supernatan dibuang. Selanjutnya endapan yang terjadi ditambahkan 3 mL urea 9 M yang telah dilarutkan dalam NaOH 0,4 M, divortex sampai homogen dan dibaca kandungan protein karbonil dengan spektrofotometer pada λ 390 nm. Penelitian yang sama dilakukan pada kondisi tanpa cahaya.

1. **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

Kunyit mengandung senyawa aktif yaitu kurkumin yang berperan sebagai antitumor, antibakteri dan antioksidan (Joe, 2004). Kurkumin berwarna kuning alami dan termasuk kelompok senyawa polifenol yang dapat menyebabkan denaturasi protein dan merusak membran sel (Pandiangan, 2000). Kunyit putih merupakan tanaman herbal yang potensial dan banyak diteliti untuk pengobatan kanker (Wijayanti, dkk., 2011). Temulawak memiliki khasiat sebagai antiinflamasi, antioksidan dan antitumor. Kurkumin yang terdapat dalam rimpang temulawak efektif sebagai antibakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 100% dalam uji Kadar Hambat Minimum (KHM) (Ananggia dan Murnah, 2007). Rimpang temuireng merupakan salah satu tanaman tradisional yang sering digunakan untuk menambah nafsu makan dan memacu pertumbuhan (Puspitawati, 2006). Temuireng memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis, Staphylococcus epidermidis. Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Hastuti dan Widodo, 2012).

Berdasarkan latar belakang diatas diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri dari tanaman herbal tersebut terhadap bakteri dalam tubuh ternak. *Escherichia coli* merupakan bakteri terbanyak yang terdapat di saluran pencernaan ternak terutama unggas dengan jumlah 104 – 105 CFU/ml (Spring, 1997). *E. coli* merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi dalam saluran pencernaan. Pada beberapa kasus, *e. coli* adalah bakteri yang paling banyak menimbulkan infeksi saluran cerna. Tingginya angka kejadian ini disebabkan karena keadaan higienis makanan, minuman dan air yang dikonsumsi kurang baik, serta dipengaruhi oleh higienis lingkungan sekitar (Octaviani, 2007).

**MATERI DAN METODE**

**Materi**

Materi yang digunakan dalam penelitian terdiri dari peralatan dan bahan. Peralatan yang digunakan ialah peralatan uji antibakteri seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, inkubator, timbangan ohaus, mikropipet 1 ml, autoklaf, *waterbath* dan *magnetic stirrer*. Bahan yang digunakan adalah akuades, ekstrak kunyit, kunyit putih, temulawak, temuireng, bakteri *Escherichia coli* dan media uji antibakteri Mueller Hinton Agar (MHA).

**Metode**

Metode penelitian adalah metode laboratorium dengan menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 ulangan sebagai berikut :

A0 : Akuades

A1 : Antibiotik (tetrachlor)

A2 : Ekstrak kunyit

A3 : Ekstrak kunyit putih

A4 : Ekstrak temulawak

A5 : Ekstrak temuireng

**Prosedur uji diameter zona hambat**

Persiapan bahan dimulai dengan menyiapkan ekstrak herbal (kunyit, kunyit putih, temulawak dan temuireng). Prosedur selanjutnya ialah sterilisasi alat dan media MHA. Alat dan media yang digunakan uji antibakteri disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121 ºC dalam waktu 30 menit. Selanjutnya uji diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dilakukan menggunakan metode difusi sumur agar. Langkah berikutnya adalah mengikuti prosedur kerja uji diameter zona hambat dan dilanjutkan dengan uji KHM.

**Prosedur uji KHM**

Langkah-langkah uji KHM adalah:

1. Menyiapkan larutan ekstrak sebanyak 1 g kemudian diencerkan dengan aquades 10 ml dan ditambahkan larutan tween 80 sebanyak 100 μL (b/v).

2. Menyiapkan tabung reaksi sebanyak 7 tabung terdiri dari 6 tabung untuk perlakuan dan 1 tabung untuk kontrol.

3. Tabung reaksi 1 diisi 1 ml bakteri uji dengan konsentrasi 106bakteri/ml tanpa pencampuran

**BAB VI**

**SPEKTRUM SENYAWA HASIL ISOLASI ZAT AKTIF DALAM DAUN KUNYIT**

**Prediksi Spektra Kurkumin (UV-Vis, IR dan NMR) menggunakan Chem 3D**

**Spektra UV-Vis**



Gambar 2.1.3 Spektra UV-Vis

Tabel 2.1.1 Data Absorbansi SpektraUV-Vis

Oscillator Strength Wavelength (nm)

------------------- ----------------

 0.0636 278.3800

 0.0662 281.8600

 0.0071 304.760

--------------------------------------------

**Spektra IR**



Gambar 2.1.4 Spektra IR

Tabel 2.1.2 Intensitas Serapan pada Spektra IR

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Intensitas | Bilangan Gelombang cm-1 | Gugus Fungsi |
| 106.1454 | 1042.5882 |  |
| 143.3919 | 1069.7778 | C-O |
| 123.8257 | 1262.9929 | C-C |
| 130.3107 | 1366.7478 | CH3 |
| 348.7944 | 1469.7837 | C=C  |
| 242.2784 | 1487.9347 | C=C  |
| 161.6507 | 1548.1602 | C=C (benzena) |
| 165.2558 | 1723.8499 | C=O (keton) |
| 833.4155 | 1760.4467 | Anhidrida |
| 909.2664 | 1772.4522 |  |
| 684.2352 | 1786.9031 |  |
| 139.8429 | 2934.9221 | -CH3 |
| 160.681 | 2934.9221 | -CH3 |
| 169.5755 | 2984.0407 | -CH3 |
| 170.6651 | 2985.6193 | -CH3 |
| 146.6243 | 3748.2916 | -OH |
| 134.8857 | 3761.3024 | -OH |

**Spektra NMR**



Gambar 2.1.5 Spektra NMR

Tabel 2.1.3 Data Prediksi H-1 NMR:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Node | Shift | Base + Inc. | Comment (ppm rel. To TMS) |
| OH | 5.35 | 5.00 | Aromatic C-OH |
| 0.35 | General corrections |
| OH | 5.35 | 5.00 | Aromatic C-OH |
| 0.35 | General corrections |
| CH | 7.16 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.49 | 1 –O-C |
| -0.17 | 1 –O |
| 0.04 | 1 –C = C |
| 0.52 | General corrections |
| CH | 7.16 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.49 | 1 –O-C |
| -0.17 | 1 –O |
| 0.04 | 1 –C = C |
| 0.52 | General corrections |
| CH | 6.99 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.11 | 1 -O – C |
| -0.53 | 1 –O |
| -0.05 | 1 –C = C |
| 0.42 | General corrections |
| CH | 6.99 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.11 | 1 -O – C |
| -0.53 | 1 –O |
| -0.05 | 1 –C = C |
| 0.42 | General corrections |
| CH | 6.79 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.44 | 1 –O-C |
| -0.17 | 1 –O |
| 0.04 | 1 C=C |
| 0.10 | General corrections |
| CH | 6.79 | 7.26 | 1-benzene |
| -0.44 | 1 –O-C |
| -0.17 | 1 –O |
| 0.04 | 1 C=C |
| 0.10 | General corrections |
| CH3 | 3.83 | 0.86 | Metil |
| 2.87 | 1 alfa –O-1 : C\*C\*C\*C\*C\*C\*1 |
| 0.10 | General corrections |
| CH3 | 3.83 | 0.86 | Metil |
| 2.87 | 1 alfa –O-1 : C\*C\*C\*C\*C\*C\*1 |
| 0.10 | General corrections |
| CH2 | 4.59 | 1.37 | Metilen |
| 3.22 | 2 alfa –C (=O)C=C |
| H | 7.60 | 5.25 | 1 – etilen |
| 1.38 | 1 -1:C\*C\*C\*C\*C\*C\*1 gem |
| 0.91 | 1 –C (=O) –R cis |
| 0.06 | General corrections |
| H | 7.60 | 5.25 | 1 – etilen |
| 1.38 | 1 -1:C\*C\*C\*C\*C\*C\*1 gem |
| 0.91 | 1 –C (=O) –R cis |
| 0.06 | General corrections |
| H | 6.91 | 5.25 | 1 – etilen |
| 0.36 | 1 -1:C\*C\*C\*C\*C\*C\*1 cis |
| 1.06 | 1 –C (=O) –R gem |
| 0.24 | General corrections |

DAFTAR PUSTAKA

Ananggia S. A. dan Murnah. 2007. Profil kromatogram dan aktivitas antibakterial ekstrak etanol rimpang temulawak terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* in vitro.

Armala, M. M., 2009, *Daya Antioksidan Fraksi Air Ekstrak Herba Kenikir (Cosmos caudatus H. B. K.) dan Profil KLT, Skripsi, 39,* Fakultas Farmasi Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

Depkes RI. (1979). *Farmakope Indonesia. Edisi III*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 813.

Depkes RI. (1995). *Farmakope Indonesia. Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 1030-1031.

Edriana, Nurhabiba. 2014. *Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Daun Kunyit (Curcuma Domestica Val) dengan Menggunakan Metode Dpph ( 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl).* Jakarta : UIN Syarif Hidayatullah.

Guenther, E. (1987). *The* *Essential Oils. Terjemahan. Ketaren, R.S. (1987)*. Minyak Atsiri. Jilid I. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. hal 287-289

Ketaren, S. (1985). *Pengantar Teknologi Minyak Atsiri*. Jakarta: Penerbit Balai Pustaka. Hal. 28-29.

Lutony, T.L. & Rahmayati, Y. (2000). *Produksi Dan Perdagangan Minyak Atsiri. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya*. Hal. 1-3.

Mrdianti, Dian. 1998. *Mempelajari Pengaruh Ekstrak Daun dan Rimpang Kunyit (Curcuma Domestica Val.) terhadap Aktivitas Sitolitik Sel Natural Killer (NK) dalam Melisis Sel K-562 secara IN VITRO*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

Sa’adah, lailis.2010. *Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa Bilimbi L.)* .Malang : Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim.

Suryanto, edi. 2010. *Aktivitas Penangkal Radikal Bebas dan Penstabil Oksigen Singlet dari Ekstrak Daun Kunyit (Curcuma Domestica Val.).* Manado : Universitas Sam Ratulangi.