

Penetapan Parameter Mutu Ekstrak yang Memiliki Aktivitas sebagai Antioksidan dari Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L.Miers.)

(Determination of Quality Parameters and Antioxidant Activity of Cincau Hijau Leaves (*Cyclea barbata* L.Miers.))

ERLINDHA GANGGA*, RANI PURWATI, YUNAHARA FARIDA, KARTININGSIH

¹Faculty Of Pharmacy Pancasila University, Jl Srengseng Sawah, Jakarta 12640

Diterima 18 Maret 2017, Disetujui 8 Juli 2017

Abstrak: *Cyclea barbata* dikenal masyarakat sebagai obat tradisional dan dapat diolah menjadi minuman penyegar. Manfaat lainnya yaitu sebagai antioksidan yang dapat meredam radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH dan menetapkan mutu ekstrak, serta kadar flavonoid total daun cincau hijau. Hasil penapisan fitokimia simplisia, ekstrak, dan air perasan menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, dan kumarin. Hasil penetapan mutu ekstrak etanol 96% menunjukkan ekstrak dengan konsistensi kental, berwarna hijau kehitaman dan berbau khas spesifik. Kadar sari larut air 74,72%, kadar sari larut etanol 62,13%, susut pengeringan 10,86%, kadar air 9,26%, kadar abu total 9,49%, kadar abu tidak larut asam 0,16%, sisa pelarut etanol 0,46%, cemaran logam Pb 0,03 mg/kg dan Cd 0,02 mg/kg, cemaran mikroba dengan angka lempeng total $2,30 \times 10^3$ koloni/g dan angka kapang khamir $8,88 \times 10^2$ koloni/g. Hasil penetapan kadar flavonoid total menunjukkan kadar flavonoid sebesar 8,30%. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% daun cincau hijau memiliki mutu ekstrak yang baik dan aktivitas antioksidan dengan metoda peredaman radikal bebas menggunakan DPPH adalah pada ekstrak kental menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 83,28 bpj, dan air perasan dengan IC_{50} 102,01 bpj.

Kata kunci: *Cyclea barbata* L.Miers., antioxidant, DPPH.

Abstract: Cincau Hijau leaves (*Cyclea barbata* L.Miers) has been used empirically as a medicinal plant because it contains many potential compounds such as flavonoids. Cincau Hijau leaves has been known as antioxidant activity. Determination of pharmacognosy parameters and phytochemical screening of dry leaves and extracts have been carried out as well as determination of total flavonoids content. Fresh leaves were extracts with water and Dry leaves were macerated with 96% ethanol and were then concentrated by rotavapor to obtain viscous extracts. Free radical scavenging activity of the extracts was evaluated using DPPH method. Afterwards, determination of specific and non -specific parameters were performed. Results of phytochemical screening of powder and 50% and 96% ethanol extract showed that all the tested samples contained alkaloid, flavonoids, saponins, tannins, steroids/ triterpenoids, coumarin. The examination of specific parameter showed that the extract has a thick consistency, tawny color, bitter taste, characteristic odor. In addition, water-soluble compound and 96% ethanol extract are 46.64 and 62.13% respectively whereas ethanol-soluble compounds are 39.22 and 74.72%, respectively. While the results of nonspecific parameters of 50% and 96 % ethanol extract displayed total ash content of 9.69 and 9.49%, respectively, acid insoluble ash content of 0.30 and 0.16%, respectively, content of water soluble ash of 9.17 and 4.30%, respectively, loss on drying of 9.35 and 8.9%, respectively, water content of 8.45 and 7.25%, respectively. Based on heavy metal contamination, Pb concentration in 50 and 96% ethanol extract are 0.0227 and 0.0333 mg/kg, respectively whereas Cd concentration are 0.1206 and 0.0022 mg/kg, respectively and total number of CFU of $4,22 \times 10^3$ and $2,30 \times 10^3$ colonies/g, respectively while molds and yeasts number of colony of $0,48 \times 10^2$ and $8,88 \times 10^2$ colonies/g, respectively. Moreover, the total flavonoid was 0,19 %. Result of DPPH inhibition test showed that IC_{50} 96 % ethanol extract are 83,280 ppm and water extracts are 102,01 ppm

Keywords: *Cyclea barbata* L.Miers, antioxidant, DPPH.

PENDAHULUAN

MAKANAN cepat saji dengan pemanasan tinggi dan pembakaran merupakan makanan yang sering memicu terbentuknya senyawa radikal bebas. Selain itu, peningkatan polutan hasil pembakaran tidak sempurna kendaraan bermotor dan industri seperti CO (karbonmonoksida), oksida-oksida nitrogen dan hidrokarbon merupakan senyawa-senyawa yang rentan teroksidasi menjadi senyawa radikal bebas^(1,2).

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbit luarnya. Radikal bebas dapat bereaksi dengan molekul yang merupakan komponen sel tubuh dengan cara mengikat elektron molekul. Oleh karena itu tubuh kita memerlukan suatu substansi penting yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas⁽³⁾.

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbang satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Diharapkan dengan pemberian antioksidan dapat mencegah terjadinya kerusakan tubuh dan timbulnya penyakit degeneratif. Akan tetapi tubuh manusia tidak memiliki antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh memerlukan antioksidan dari luar tubuh⁽⁴⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers.) dari Kebun Percobaan Tanaman Rempah dan Obat Manoko, Lembang, Bandung. DPPH, methanol, carbomer 940, Sepigel 305, TEA, HPC-m, HPMC, Propylene glycol, methyl paraben, propyl paraben, sodium benzoate, edetate disodium, sodium metabisulfite, ethanol.

METODE. Determinasi Tanaman dan Pengumpulan Bahan Penelitian. Determinasi dilakukan dengan tujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan. Determinasi tanaman dilakukan di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH – ITB), Bandung.

Pemeriksaan Bahan Organik Asing (BOA). Sejumlah 100 gram rajangan simplisia disebarkan di atas kertas putih polos. Kemudian dibagi menjadi empat kelompok, masing-masing kelompok dipilih dan dipisahkan bahan organik asingnya. Bahan organik asing yang sudah dipisahkan ditimbang dan dihitung kadarnya per 100 gram simplisia yang digunakan.

Pengukuran Derajat Kehalusan Simplisia. Sejumlah 100 gram serbuk simplisia dilewatkan melalui pengayak nomor 4. Serbuk yang lolos

pengayak nomor 4 dilewatkan kembali melalui pengayak nomor 18, lalu ditimbang. Derajat kehalusan yang dinyatakan dengan 2 nomor, dimaksudkan bahwa semua serbuk dapat melewati pengayak nomor 4 dan tidak lebih dari 40% yang dapat melewati pengayak nomor 18.

Pembuatan Ekstrak Etanol 96%. Sebanyak 2,5 kg serbuk simplisia kering daun cincau hijau dimaserasi kinetik beberapa kali dengan pelarut etanol 96%. Kemudian filtrat yang terkumpul dipekatkan dengan vakum rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental. Sebagian ekstrak kental dikeringkan dengan metode *Freeze Drying*. Sebanyak 25 g ekstrak kental etanol 96% dibekukan di dalam *freezer* sampai beku kemudian di masukkan dalam alat *freezedry* pada suhu -10 °C dengan tekanan 1 atm di amkan selama 24 jam.

Pembuatan Air Perasan Daun Cincau Hijau. Sebanyak 300 g daun cincau hijau segar ditambahkan 1,5 L aquadest kemudian diperas dengan tangan. Hasil perasan tersebut akan membentuk gel yang kental dan didiamkan selama 1 hari pada lemari pendingin. Setelah 1 hari, dilakukan proses penghancuran gel untuk mendapatkan cairan gel yang mengalami sineresis. Kemudian gel cincau yang masih mengandung air disaring dengan menggunakan pompa vakum bertekanan 15 mmHg supaya air yang terperangkap dalam gel dapat keluar. Cairan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring dan dikeringkan dengan cara *Freeze Drying*.

Skrining Fitokimia Dilakukan Menurut Metode Farnsworth. Skrining fitokimia dilakukan terhadap serbuk, ekstrak air dan etanol 96% dari daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers.). meliputi :

1. Identifikasi golongan alkaloid.
2. Identifikasi golongan flavonoid.
3. Identifikasi golongan saponin.
4. Identifikasi golongan tanin.
5. Identifikasi golongan kuinon.
6. Identifikasi golongan steroid dan triterpenoid.
7. Identifikasi golongan minyak atsiri.
8. Identifikasi golongan kumarin.

Uji Aktvitas Antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) terhadap ekstrak air dan etanol 96% daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers.) berdasarkan prinsip penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH, dimana akan terjadi perubahan warna ungu menjadi kuning. kuersetin digunakan sebagai kontrol positif.

1. Pembuatan larutan DPPH.

Ditimbang seksama 3,9432 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan metanol pro analisis hingga 25 mL, lalu ditempatkan dalam botol gelap.

2. Pembuatan larutan blanko.
Dipipet 1,0 mL larutan DPPH ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5 mL, lalu ditambahkan metanol pro analisis hingga tanda, dan dihomogenkan.
3. Pembuatan larutan uji.
Ditimbang 5 mg sampel ekstrak, dan dilarutkan dengan metanol pro analisis ad 5 mL, untuk membuat konsentrasi induk sebesar 1000 bpj. Sebanyak 100; 200; 300; 400; dan 500 μ L larutan induk dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 mL untuk mendapatkan konsentrasi sampel 20, 40, 60, 80 dan 100 bpj.
4. Pembuatan larutan kuersetin sebagai kontrol positif.
Ditimbang lebih kurang 5 mg kuersetin, lalu dilarutkan dengan metanol ad 5 mL (1000 bpj). Dipipet 1,0 ml larutan tersebut dan dilarutkan dengan methanol ad 10 mL (100 bpj). Dipipet 12,5; 25; 50; 62,5; dan 75 μ L larutan induk ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 mL untuk mendapatkan konsentrasi 0,25; 0,5; 1; 1,25 dan 1,5 bpj.
5. Uji aktivitas antioksidan.
Dari masing-masing larutan seri uji dan kontrol positif dipipet 1,0 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH dan ditambahkan dengan metanol pro analisis sampai tanda 5,0 mL. larutan dihomogenkan, dan mulut tabung ditutup dengan aluminium foil.
6. Pengukuran serapan sampel.
Larutan uji dan kontrol positif dengan beberapa konsentrasi, diinkubasi dalam penangas air 37 $^{\circ}$ C selama 30 menit, kemudian serapan diukur dengan panjang gelombang maksimum 516-517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
7. Perhitungan IC_{50} .
Cara perhitungan:
Persentase inhibisi dihitung dengan rumus :
% Inhibisi = ((serapan blanko-serapan sampel)/(serapan blanko)) x 100%

Analisis Data Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibitor Concentration 50%* atau IC_{50} . Nilai IC_{50} adalah konsentrasi antioksidan (μ g/mL) yang mampu memberikan persen penangkapan radikal bebas sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan kedalam persamaan $y = a + bx$, dimana $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC_{50} .

Data yang dihasilkan pada uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH dihitung nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*) menggunakan persamaan garis regresi dengan menghubungkan konsentrasi sebagai sumbu x dengan

% hambatan sebagai sumbu Y. Perhitungan persamaan regresi antara konsentrasi (μ g/mL) dengan persen (%) Inhibisi.

Pemeriksaan Mutu Ekstrak (Parameter Spesifik).

1. Organoleptik.
Pemeriksaan organoleptik terhadap ekstrak dilakukan menggunakan pancaindra dengan mengamati bentuk, konsistensi, bau, rasa dan warna dari ekstrak.
2. Penetapan kadar senyawa terlarut dalam etanol.
Sejumlah $\pm 5,00$ g ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL etanol 96% menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan didiamkan 18 jam berikutnya. Kemudian dilakukan penyaringan secara cepat, untuk menghindari penguapan etanol, kemudian uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. panaskan residu pada suhu 105 $^{\circ}$ C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol, dihitung terhadap ekstrak awal.
3. Penetapan kadar senyawa terlarut dalam air.
Sejumlah $\pm 5,00$ g ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL air - kloroform P, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan didiamkan 18 jam berikutnya. Kemudian disaring, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105 $^{\circ}$ C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal.

Pemeriksaan Mutu Ekstrak (Parameter Non Spesifik).

1. Penetapan susut pengeringan.
Timbang ekstrak secara seksama sebanyak $\pm 1 - 2$ g dan dimasukkan dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 $^{\circ}$ C selama 30 menit dan telah ditara, lalu diratakan. Kemudian dimasukkan kedalam eksikator dalam keadaan tutup terbuka, dikeringkan pada suhu 105 $^{\circ}$ C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, botol dibiarkan dalam keadaan tertutup mendingin dalam eksikator hingga suhu kamar. Dikeringkan kembali hingga bobot tetap.
2. Penetapan kadar air.
Sejumlah ± 50 mg ekstrak ditetapkan kadar airnya dengan menggunakan metode titrimeter karl fischer. Prinsip penetapannya yaitu sampel dititrasi dengan larutan iodine dalam methanol. Reagen lain yang digunakan adalah sulfur dioksida dan piridin. Rasio mutlak antara air dengan iod adalah 1:1 (titik akhir titrasi), sekali konsenrasi iod dalam pereaksi karl

fischer ditetapkan, konsentrasi iod dalam peaksi ficher ditetapkan, konsentrasi air dalam contoh dapat ditetapkan secara elektrometrik.

3. Penetapan kadar abu total.

Sebanyak $\pm 2 - 3$ g ekstrak yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan dalam krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, kemudian ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, dan timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, dan timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

4. Penetapan kadar abu yang tidak larut asam.

Abu yang sebelumnya telah diperoleh pada penetapan kadar abu total, dididihkan dengan 25 mL asam sulfat encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, kemudian timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

5. Penetapan sisa pelarut.

Ditetapkan menggunakan metode kromatografi Gas-Cair. Alat kromatografi gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kaca 1,8 m x 4 mm berisi fase diam dengan ukuran partikel 100 mesh hingga 120 mesh yang dialirkan TR-wax. Digunakan nitrogen P sebagai gas pembawa. Sebelum digunakan kondisikan kolom semalaman pada suhu 235 °C alirkan gas pembawa dengan laju aliran lambat. Atur aliran gas pembawa dan suhu (± 120 °C) sehingga baku internal asetonitril tereluasi dalam waktu 5 sampai 10 menit.

6. Penetapan cemaran mikroba.

Percobaan dilakukan dengan metode media agar padat (Angka Lempeng Total dan Angka Kapang Khamir) dengan cara disiapkan 5 tabung reaksi yang masing-masing berisi 9 mL pengencer larutan dapar fosfat. Dari hasil homogenisasi pada penyiapan contoh dipipet 1 mL pengenceran 10^{-1} ke dalam tabung pertama hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} dan dihomogenkan, lakukan prosedur yang sama hingga pengenceran 10^{-6} . Dari setiap pengenceran dipipet 1 mL ke dalam cawan petri dan dibuat triplo. Ke dalam cawan petri dituang 15-20 mL Nutrient Agar cair (45 ± 1 °C) untuk angka lempeng total dan 15-20 mL Potato Dextrose Agar cair (45 ± 1 °C) untuk angka kapang kamir, lalu dihomogenkan. Dibiarkan memadat pada suhu ruangan, kemudian diinkubasi pada suhu 35 °C - 37 °C untuk media

Nutrient Agar selama 24 - 48 jam dan 25 °C untuk media Potato Dextrose Agar selama 1-7 hari.

Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak.

Dilakukan dengan metode penambahan pereaksi geser $AlCl_3$. Timbang saksama sejumlah 200 mg simplisia atau ekstrak yang setara dengan 200 mg serbuk simplisia, masukkan ke dalam labu alas bulat, tambahkan berturut-turut 1 mL larutan HMT, 2 mL aseton P dan 2 mL larutan asam klorida P, refluks selama 30 menit. Saring menggunakan kapas, masukkan filtrat ke dalam labu tentukur 100 mL. Refluks kembali residu dengan 20 mL aseton P selama 30 menit, saring dan campur filtrat ke dalam labu tentukur 100 mL. Tambahkan aseton P sampai tanda. Pipet 20 mL ke dalam corong pisah, tambahkan 20 mL air dan ekstraksi 3 kali, tiap kali menggunakan 15 mL etil asetat P. Masukkan fase etil asetat dalam labu tentukur 50 mL tambahkan etil asetat P sampai tanda. Pipet 10 mL larutan uji dan encerkan dengan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol P sampai tanda.

Pipet 10 mL Larutan uji masukkan ke dalam labu tentukur 25 mL, tambahkan 1 mL larutan aluminium klorida dan larutan asam asetat glasial 5% v/v dalam metanol P sampai tanda. Pengukuran dilakukan 30 menit setelah penambahan larutan aluminium klorida menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang yang sesuai seperti tertera pada monografi. Hitung kadar flavonoid total sebagai flavonoid pembanding seperti tertera pada monografi dengan rumus:

$$\% \text{ kadar} = ((C_p (\text{Au}-\text{Abu})) / (A_p - A_{bp})) \times 1,25 \times 100 / (\text{bobot sampel})$$

Keterangan :

C_p = konsentrasi baku pembanding kuersetin (% b/v).

Au = serapan larutan uji dengan aluminium klorida.

Abu = serapan larutan uji tanpa aluminium klorida.

A_p = serapan larutan pembanding dengan aluminium klorida.

A_{bp} = serapan larutan pembanding tanpa aluminium klorida.

1,25 = Faktor konstanta.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman. Hasil penelitian tanaman di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH – ITB), Bandung menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers.) dari suku Menispermaceae.

Penetapan Bahan Organik Asing. Hasil penetapan bahan organik asing dalam simplisia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penetapan bahan organik asing simplisia daun cincau hijau.

Bahan	Persyaratan MMI	Hasil
Daun cincau hijau	≤ 2%	0,11%

Pembuatan Ekstrak. Hasil DER-native dan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah ekstrak etanol 96% dan air perasan daun cincau hijau.

Ekstrak	Simplisia (g)	Jumlah ekstrak (g)	DER-native	Rendemen (%)
Hasil air perasan	300	29,4177	10,1979	9,8059
Etanol 96%	1500	165,7962	9,0473	11,0531

Penapisan Fitokimia. Hasil penapisan fitokimia dari serbuk simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penapisan fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak.

No.	Golongan Senyawa	Serbuk Simplisia	Air perasan	Ekstrak etanol 96%
1.	Alkaloid	+	+	+
2.	Flavonoid	++	+	++
3.	Saponin	++	++	++
4.	Tanin	+	+	+
5.	Kuinon	-	-	-
6.	Steroid / Triterpenoid	+/+	+/+	+/+
7.	Minyak Atsiri	-	-	-
8.	Kumarin	+	+	+

Keterangan :

- ++: memberikan reaksi positif kuat.
- + : memberikan reaksi positif lemah.
- : memberikan reaksi negatif.

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Spesifik (Organoleptik). Hasil pemeriksaan organoleptik ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4. Pemeriksaan organoleptik ini termasuk salah satu parameter spesifik yang ditentukan dengan menggunakan panca indera dan bertujuan untuk memberikan pengenalan awal serta mengidentifikasi ekstrak yang menandakan ciri khas dari ekstrak tersebut berupa bentuk, warna, bau, dan rasa. Dari hasil pemeriksaan organoleptik menunjukkan ekstrak etanol daun cincau hijau berbentuk kental berwarna hijau kehitaman, berbau khas, dan memiliki rasa pahit.

Tabel 4. Hasil pemeriksaan organoleptik ekstrak.

No.	Organoleptik	Hasil pemeriksaan
1.	Bentuk	Ekstrak kental
2.	Warna	Hijau kehitaman
3.	Bau	Khas
4.	Rasa	Pahit

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Spesifik (Penetapan Kadar Senyawa Terlarut dalam Pelarut Tertentu). Senyawa terlarut di dalam ekstrak disari dengan menggunakan pelarut air-kloroform dan etanol 96% dan diperoleh hasil penetapan seperti tertera pada Tabel 5. Kadar senyawa terlarut menunjukkan banyaknya senyawa metabolit sekunder yang terlarut di dalam pelarut air maupun etanol yang bertujuan untuk memberikan gambaran awal jumlah kandungan senyawa yang dapat diekstraksi. Hasil penetapan kadar senyawa terlarut pada ekstrak dalam air lebih besar dibandingkan dengan kadar senyawa terlarut dalam etanol, hal ini menunjukkan bahwa jumlah metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun cincau hijau lebih banyak tersari dalam air dibandingkan dengan jumlah metabolit sekunder yang tersari di dalam etanol.

Tabel 5. Hasil penetapan kadar senyawa terlarut dalam pelarut etanol dan air.

No	Parameter	Hasil
1.	Kadar sari larut air	74,7225 %
2.	Kadar sari larut etanol	62,1283 %

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Susut pengeringan dan kadar air). Hasil penetapan susut pengeringan dan kadar air dapat dilihat pada Tabel 6. Dari tabel penetapan secara gravimetrik, diperoleh susut pengeringan ekstrak sebesar 10,8642% yang menunjukkan kadar air dan senyawa yang menguap dalam ekstrak setelah proses pemanasan pada suhu 105 °C. Pemeriksaan kadar air dilakukan dengan menggunakan Karl Fischer untuk menentukan jumlah air yang terkandung di dalam ekstrak yang berpengaruh terhadap kestabilan ekstrak. Hasil pemeriksaan kadar air dalam ekstrak adalah 9,2633%. Penentuan kadar air juga terkait dengan kemurnian ekstrak, semakin sedikit kadar air pada ekstrak maka semakin kecil kemungkinan ekstrak terkontaminasi dengan pertumbuhan mikroba.

Tabel 6. Hasil pemeriksaan susut pengeringan dan kadar air.

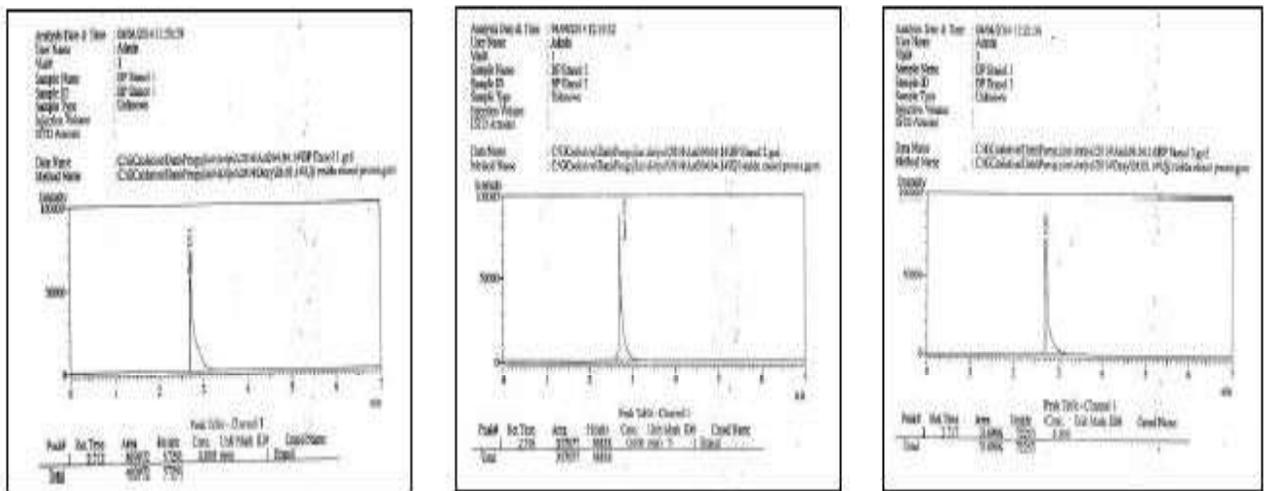
No.	Parameter	Hasil
1.	Susut pengeringan	10,8642 %
2.	Kadar air	9,2633 %

Tabel 7. Hasil pemeriksaan kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam.

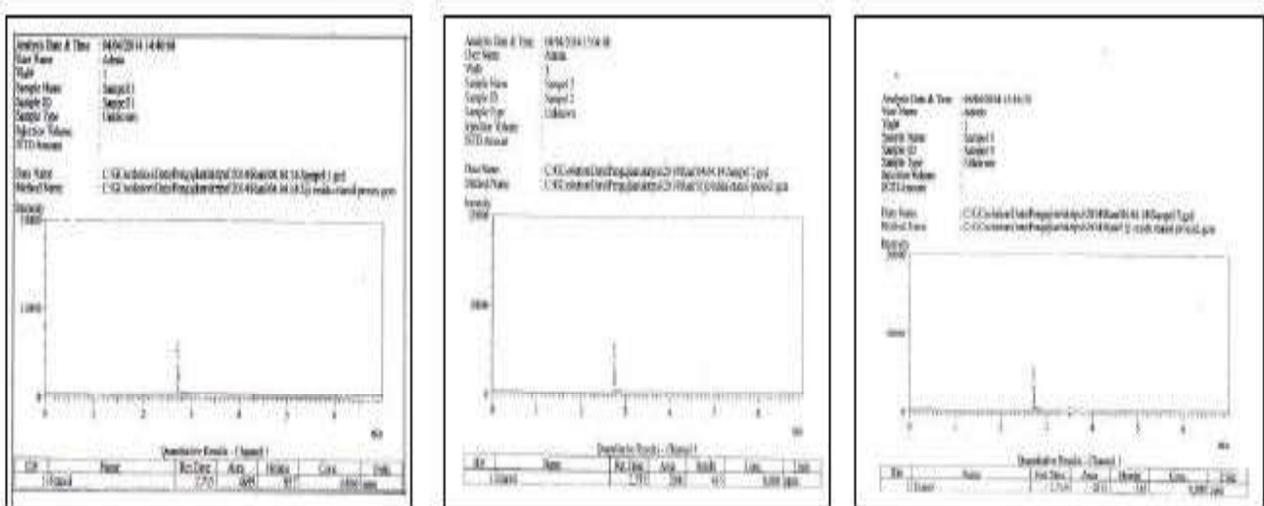
No.	Parameter	Hasil
1.	Kadar abu total	9,4936%
2.	Kadar abu tidak larut asam	0,1648%

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Kadar Abu). Hasil penetapan kadar abu total dan kadar abu tidak larut asam ekstrak etanol daun cincau hijau dapat dilihat pada Tabel 7. Pemeriksaan kadar abu total dan abu tidak larut asam terhadap ekstrak etanol daun cincau hijau dilakukan untuk mengetahui unsur mineral yang dikenal sebagai zat anorganik. Mineral total dapat berupa mineral fisiologis maupun non fisiologis. Mineral yang tersisa ditetapkan kadarnya secara kuantitatif secara gravimetri.

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Pemeriksaan Sisa pelarut). Dari hasil penetapan kadar etanol sisa secara kromatografi gas dalam ekstrak diperoleh kadar etanol 0,4573% hasil pemeriksaan tersebut memenuhi persyaratan batas maksimum sisa pelarut dalam etanol, yaitu 1,0%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak yang diperoleh dapat digunakan sebagai bahan baku sediaan karena mengandung kadar etanol yang rendah. Spektrum hasil pengujian secara kromatografi gas cair dari uji dan baku etanol dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Kromatogram luas area puncak sampel ekstrak etanol 96% daun cincau hijau.



Gambar 2. Kromatogram luas area puncak sampel ekstrak etanol 96% daun cincau hijau.

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Pemeriksaan Cemar logam berat). Hasil penetapan cemaran logam berat dalam ekstrak dapat dilihat pada Tabel 8. Penentuan kandungan logam timbal (Pb) dan kadmium (Cd) pada ekstrak berguna untuk dapat menjamin bahwa ekstrak tidak mengandung Pb dan Cd melebihi batas yang ditetapkan karena dapat bersifat toksik terhadap tubuh. Kandungan logam Pb dalam jumlah tinggi dapat menyebabkan gangguan pada organ seperti gangguan neurologi (susunan syaraf), gangguan terhadap fungsi ginjal serta system reproduksi, sedangkan jumlah kandungan logam Cd yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan terganggunya fungsi ginjal dan mengakibatkan kematian.

Kadar logam Pb dan Cd dalam ekstrak etanol daun cincau hijau berdasarkan hasil pemeriksaan Spektrofotometer Serapan Atom (AAS) menunjukkan kadar Pb 0,0292 mg/kg dan kadar Cd 0,0193 mg/kg. Batas maksimum kandungan Pb dan Cd dalam ekstrak menurut Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia yaitu untuk Pb tidak lebih dari 10 mg/kg dan Cd tidak lebih dari 0,3 mg/kg, dengan demikian ekstrak etanol daun cincau hijau yang dihasilkan memenuhi persyaratan mutu ekstrak.

Tabel 8. Hasil pemeriksaan kadar logam Pb dan Cd dari ekstrak.

No.	Jenis Logam	Persyaratan (mg/kg)	Hasil penetapan (mg/kg)
1.	Pb	10	0,0292
2.	Cd	0,3	0,0193

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Pemeriksaan Cemaran mikroba). Hasil penetapan cemaran mikroba dalam ekstrak etanol daun cincau hijau dapat dilihat pada Tabel 9. Hasil penetapan cemaran mikroba pada ekstrak etanol daun cincau hijau memiliki nilai angka lempeng total $2,2966 \times 10^3$ koloni/g dan angka kapang khamir $8,875 \times 10^2$ koloni/g, nilai ini berada dibawah batas maksimum cemaran mikroba berdasarkan Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia yaitu untuk angka lempeng total $\leq 1 \times 10^4$ koloni/g dan angka kapang khamir $\leq 1 \times 10^3$ koloni/g. sehingga ekstrak yang dihasilkan memenuhi persyaratan.

Tabel 9. Hasil pemeriksaan cemaran mikroba.

No	Jenis cemaran	Persyaratan (koloni/g)	Hasil penetapan (koloni/g sampel)
1.	Angka Lempeng Total	$\leq 1 \times 10^4$	$2,2966 \times 10^3$
2.	Angka Kapang Khamir	$\leq 1 \times 10^3$	$8,875 \times 10^2$

Pemeriksaan Mutu Ekstrak Etanol 96%. Parameter Non Spesifik (Penetapan Kadar Flavanoid Total Ekstrak Etanol 96%). Pada penetapan kadar flavonoid total, digunakan kuersetin sebagai baku pembanding. Kuersetin akan bereaksi dengan $AlCl_3$ sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang maksimum, maka perlu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan melihat spektrum serapan. Diperoleh hasil panjang gelombang maksimum pada 429,50 nm. Hasil penetapan kadar flavonoid total dapat dilihat pada Tabel 10. Dari hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol yang dilakukan dengan menggunakan $AlCl_3$, diperoleh kadar flavonoid total sebesar 8,30%. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan untuk mengetahui banyaknya flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak etanol 96% daun cincau hijau.

Tabel 10. Hasil penetapan kadar flavonoid total.

Bahan	Hasil penetapan (%)
Ekstrak etanol 96%	8,30

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metoda Peredaman Radikal Bebas DPPH. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak kental dan ekstrak kering etanol 96% daun cincau hijau dengan melakukan peredaman radikal bebas DPPH (1,1 - difenil - pikrilhidrazil) kemudian dihambat aktivitasnya dengan senyawa dari ekstrak yang diuji. Aktivitas antioksidan ditentukan dari nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi antioksidan yang dapat menghambat 50% radikal bebas.

Kontrol positif yang digunakan dalam uji aktivitas antioksidan ini adalah kuersetin. Hasil uji aktivitas antioksidan dan grafik dengan metode peredaman radikal bebas DPPH terhadap baku kuersetin dapat dilihat pada Tabel 11.

Berdasarkan data diatas didapat IC_{50} air perasan daun cincau hijau sebesar 102,01 bpj sedangkan pada ekstrak kental etanol 96% sebesar 83,28 bpj dan IC_{50} ekstrak kering etanol 96% sebesar 79,56. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh air perasan daun cincau hijau adalah sedang dan pada ekstrak kental dan kering etanol 96% daun cincau hijau adalah kuat.

Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol 96% lebih tinggi daripada air perasan daun cincau hijau, hal ini karena pelarut etanol yang merupakan pelarut universal dapat melarutkan lebih banyak senyawa, baik yang bersifat polar, non polar, maupun semipolar, dibandingkan dengan pelarut air, yang hanya melarutkan senyawa yang bersifat polar saja.

Ekstrak kering etanol 96% daun cincau hijau lebih kuat dari ekstrak kental etanol 96%. Hal ini karena pada ekstrak kering mengandung kadar air yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak kental. Namun demikian, kekuatan aktivitasnya tidak sebesar baku pembandingnya, kuersetin dimana nilai IC_{50} yang diperoleh sebesar 1,26 bpj. Aktivitas antioksidan pada ekstrak air dan etanol 96% daun cincau hijau disebabkan karena adanya senyawa metabolit sekunder, seperti flavonoid. Yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi adalah ekstrak kering etanol 96%. Tetapi konsistensi ekstrak kering tidak stabil pada penyimpanan. Oleh karena itu yang dilakukan penetapan parameter mutu ekstrak adalah ekstrak kental etanol 96%.

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antioksidan.

Sampel	Nilai IC_{50} (bpj)
Kontrol positif (kuersetin)	1,26
Air perasan daun cincau hijau	102,01
Ekstrak kental etanol 96%	83,28

SIMPULAN

Hasil penapisan fitokimia baik pada simplisia maupun ekstrak etanol 96% dan air perasan daun cincau hijau menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, dan kumarin.

Hasil pemeriksaan mutu parameter spesifik menunjukkan ekstrak dengan konsistensi kental, berwarna hijau kehitaman dan berbau khas spesifik, kadar senyawa terlarut dalam air 74,72% dan kadar senyawa terlarut dalam etanol 62,13%. Hasil parameter non spesifik menunjukkan susut pengeringan 10,86%, kadar air 9,26%, kadar abu total 9,49%, kadar abu total tidak larut asam 0,16%, sisa pelarut etanol dalam ekstrak 0,46%, kadar Pb 0,03 mg/kg, Kadar Cd 0,02 mg/kg, angka lempeng total $2,30 \times 10^3$ koloni/g sampel dan angka kapang/khamir $8,88 \times 10^2$ koloni/g sampel.

Hasil penetapan kadar flavonoid total dengan menggunakan $AlCl_3$ menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun cincau hijau memiliki kadar flavonoid total sebesar 8,30%.

Nilai IC_{50} air perasan, ekstrak kental dan kering etanol 96% daun cincau hijau berturut-turut adalah sebesar 102.01, 83.28, dan 79.56 bpj.

DAFTAR PUSTAKA

1. Poumorad, F, Hosseinimehr & Shahabimajd.

- Antioxidant activity phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal Of Biotechnology*. 2006;5 (11): h.1142 – 1145.
- Rahim A. Uji aktivitas antioksidan dengan metode 1,1- Difenil-2- pikrilhidrazil (DPPH) dan uji terpenoid terhadap ekstrak *Acanthaster* (skripsi). Jakarta: Universitas Indonesia; 2012. h.1-2.
 - Reynetson, K.A. *Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible myrtaceae fruit*. New York: University of New York; 2007.
 - Syamsuhidayat SS, Hutapea JR. *Inventaris tanaman obat Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia; 1991. h.196-197.
 - Ariyani, F., Saputri & Nurhidayati. Efektivitas daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers.) sebagai antioksidan alami pada produk jambal patin (*Pangasius hypophthalmus*). *Jurnal pascapanen dan bioteknologi kelautan dan perikanan*.2009;4(2).
 - Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2010). Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor : 003/Menkes/Per/I/2010 tentang Sainifikasi Jamu dalam Penelitian Berbasis Pelayanan Kesehatan. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1-15.
 - Tanaman cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers). Diambil dari: <https://florafaunaweb.nparks.gov.sg/special-pages/plant-detail>. Diakses tanggal 29 Oktober 2013.
 - Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 2000. h.1-38.
 - Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Herbal Indonesia Edisi 1. Jakarta: 2008. h. xxv-xxvi, 161.
 - Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1995. h.7, 1002, 1061.
 - Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plant. *Journal of Pharmaceutical Sci*. 1966; p.5-76.
 - Hariyadi P. Freeze Drying Technology For Better Quality & Flavor of Dried Products. *Food Review Indonesia (serial online)* 2013 Februari; (8). Diambil dari <http://phariyadi.staff.ipb.ac.id/files/2013/02/Freeze-Drying-Technology-foodreview-vol-viii-no-2-feb-2013-p52-57.pdf>. Diakses 4 November 2013.
 - Harborne, J.B. *Metode fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: penerbit ITB; 1987.
 - Markham KR. Cara mengidentifikasi flavonoid. *Terjemahan Padmawinata K*. Bandung : ITB ; 1988. h 1-35.