**ABSTRAK**

Keanekaragaman hayati Indonesia sangatlah kaya, itu terbukti dari banyaknya tumbuhan endemik asli Indonesia, yang saat ini mulai langka dan identifikasi senyawa metabolit sekunder serta aktivitas farmakologi yang terkandung di dalam tanaman tersebut belum banyak dilakukan. Penelitian bertujuan identifikasi senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman langka asli Indonesia salah satunya kulit batang tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dengan metode metabolomik serta aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388. Eksatraksi dilakulan menggunakan pelarut methanol yang dipartisi dengan n-heksan dan etil asetat. Aktivitas antioksidan ditentukan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan sittoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 menggunakan MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid*) essay. Kajian metabolomik menggunakan spektroskopi NMR yang dianalisa dengan analisis data multivatiat OPLS (*orthogonal projection to letant structure*). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC50 masing-masing sebesar 1.161,43 ppm, 228,10 ppm, 188,74 ppm. Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 menunjukkan nilai IC50 dari ekstrak metanol adalah 8,52 µg/mL, Nilai IC50 ekstrak etil asetat sebesar 9,9 µg/mL, dan nilai IC50  ekstrak n-heksan sebesar 23,56 µg/mL.

**Kata Kunci:** analisa OPLS,gaharu (*Aquilaria malaccensis*), metode DPPH, MTT

 assay, sel Murin Leukemia P-388

**ABSTRACT**

Indonesia's biodiversity is very rich, it is evident from the many endemic plants native to Indonesia, which are now scarce and the identification of secondary metabolites and the pharmacological activities contained in these plants have not been widely carried out. The study aims to identify secondary metabolite compounds contained in native Indonesian rare plants, one of which is the stem of aloes (*Aquilaria malaccensis*) with metabolomic methods and antioxidant and cytotoxic activity on Murine Leukemia P-388 cells. Exattraction using a methanol solvent is partitioned with n-hexane and ethyl acetate. Antioxidant activity was determined using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl) and cittoxic method against Murine Leukemia P-388 cells using MTT (3- (4,5-dimethylthiazole-2-il) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) essay. Metabolomic studies using NMR spectroscopy were analyzed by multivatiate OPLS (orthogonal projection to letant structure) data analysis. The results showed that n-hexane, ethyl acetate and methanol extract of aloes bark (*A. malaccensis*) had antioxidant activity with IC50 of 1.161,43 ppm, 228,10 ppm, 188,74 ppm. The results of sitotoxyc activity on Murine Leukemia P-388 cells showed that methanol, ethyl acetate and n-hexane extract of aloes bark (*A. malaccensis*) had antioxidant activity with IC50 of 8,52 ppm, 9,90 ppm, and 23,56 ppm.

**Key Words:** OPLS analysis, agarwood (*Aquilaria malaccensis*), DPPH method, MTT assay, cell Murin Leukemia P-388

***RINGKASAN EKSEKUTIF***

**I. PENDAHULUAN**

**1.1 Latar Belakang**

Indonesia memiliki posisi sangat penting dan strategis dari sisi kekayaan dan keanekaragaman jenis tumbuhan beserta ekosistemnya (Walujo, 2011). Dilihat dari segi kimia, sumber daya alam hayati terutama tumbuhan merupakan sumber senyawa kimia yang tidak dibatasi jenis maupun jumlahnya. Dengan demikian keanekaragaman hayati merupakan keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia baik untuk kebutuhan manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika dan sebagai bahan sintesis senyawa organik yang lebih bermanfaat (Sukandar *et al*., 2007).

Keanekaragaman hayati Indonesia sangatlah kaya, itu terbukti dari banyaknya tumbuhan endemik asli Indonesia, diantaranya kokoleceran (*Vatica bantamensis*), tengkawang (Shorea App), balam suntai (*Palaquium walsurifolium*), jelukung (*Dyera sp*), cendana (*Santalum* *album*), tembesu (*Fagraea frarans*), kecapi (*Sandoricum koetjapi*), gaharu (*Aquilaria malaccensis*), meranti (*Shorea spp*), mimba (*Azadiracha indica*),pohon ulin (*Eusiderxylon zwageri*), bayur (*Pterospermum javanicum*), daun bantal (*Palaquium walsurifolium*) (Kementerian Kehutanan RI, 2010). Namun, tanaman-tanaman tersebut saat ini mulai langka dan identifikasi senyawa metabolit sekunder serta aktivitas farmakologi yang terkandung di dalam tanaman tersebut belum banyak dilakukan.

Alternatif untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit yang ada dalam suatu tumbuhan adalah dengan menggunakan pendekatan metabolomik. Metabolomik merupakan analisis komprehensif komponen dari suatu organisme pada waktu atau kondisi tertentu (Hall, 2006).

Berdasarkan hal di atas, perlu dilakukan identifikasi senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman langka asli Indonesia salah satunya tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dengan metode metabolomik serta aktivitas antioksidan sebagai uji pendahuluan dan sitotoksiknya terhadap sel Murine Leukemia P-388.

**1.2 Perumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia P-388 dari ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol kulit kayu gaharu (*Aquilria malaccensis*) salah satu tanaman langka Indonesia ?
2. Bagaimana profil senyawa metabolit sekunder dari ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol yang memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia P-388 dari kulit kayu gaharu (*Aquilria malaccensis*) salah satu tanaman langka asli Indonesia berdasarkan kajian metabolomik menggunakan spektroskopi NMR ?
3. Bagaimana hubungan senyawa metabolit dengan aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel leukemia P- 388 dari ekstrak n-heksan, etil asetat, dan methanol kulit kayu gaharu (*Aquilria malaccensis*) salah satu tanaman langka asli Indonesia berdasarkan kajian metabolomik menggunakan spektroskopi NMR ?

**II. LANDASAN TEORI DAN KAJIAN LITERATUR**

Indonesia memiliki posisi sangat penting dan strategis dari sisi kekayaan dan keanekaragaman jenis tumbuhan beserta ekosistemnya (Walujo, 2011). Keanekaragaman hayati Indonesia sangatlah kaya, itu terbukti dari banyaknya tumbuhan endemik asli Indonesia, diantara kokoleceran (*Vatica bantamensis*), tengkawang (*Shorea spp*), balam suntai (*Palaquium walsurifolium*), jelukung (*Dyera sp*), cendana (*Santalum album*), tembesu (*Fagraea frarans*), kecapi (*Sandoricum koetjapi*), gaharu (*Aquilaria malaccensis*), meranti (*Shorea spp*), mimba (*Azadiracha indica*), pohon ulin (*Eusiderxylon zwageri*), bayur (*Pterospermum javanicum*), daun bantal (*Palaquium* *walsurifolium*), dan sebagainya. Dari beberapa tanaman tersebut saat ini keberadaaanya sudahmulai langka, salah satu contohnya adalaha tanaman kokoleceran (*Vatica bantamensis*), dan tengkawang (*Shorea sp*) dan gaharu (*Aquilaria malaccensis*) (Kementerian Kehutanan RI. 2010).

**2.1 Taksonomi , Morfologi dan Penyebaran Gaharu**

Gaharu merupakah tanamanan yang memiliki nilai ekonomi yan tinggi dan dilindungi keberadaannya di hutan Indonesia. Berikut adalah taksonomi tanaman gaharu (Sumarna, 2002): Kerajaan: Plantae, Kelas: Magnoliopsida, Ordo: Malvales, Famili: Thymelaeaceae, Genus: *Aquilaria,* Spesies: *Aquilaria malaccensis*.

Ditinjau dari morfologinya, tanaman ini termasuk ke dalam jenis tanaman hutan bukan kayu yang biasanya dimanfaatkan sebagai bahan farfum dan kosmetika, atau bahan obat-obatan herbal. Tanaman ini bias tumbuh subur di ketinggian 0-1.200 meter di atas permukaan laut. Pohon gaharu memiliki tinggi yang mencapai 40 meter dan diameter batang 80 cm. Kulit batang gaharu bagian luar berarna abu-abu keputihan, dan jika sudah tua terasa rapuh dan mudah mengelupas. Bagian dalam kulit gaharu berwarna putih krem. Ranting muda gaharu berwarna coklat terang dan memiliki bulu yang halus (Wu *et al.*, 2014).



**Gambar 1.** Tanaman *Aquilaria malaccensis* (Wikipedia: 2018)

 Jenis pohon penghasil gaharu yang banyak ditanam oleh masyarakat mulai tahun 1989 adalah *A. malaccensis*, *A. microcarpha*, *A. filaria*, *A. crassna*, dan *Gyrinops sp*. Berdasarkan hasil survey yang dilakukan oleh Santoso *et al.* (2014) di 29 Kabupaten di Jawa Timur diperoleh data 67. 221 pohon penghasil gaharu dari jenis *Gyrinops versteegii*. Data populasi total yang berhasil didapatkan datanya oleh Tim Badan Litbang Kehutanan menunjukkan bahwa jumlah pohon penghasil gaharu yang telah ditanam oleh masyarakat maupun instansi pemerintah di seluruh Indonesia berjumlah: 3.249.959.

**2.2 Kandungan Kimia Gaharu**

Beberapa kandungan yang terdapat pada daun gaharu melalui skrining fitokimia antara lain alkaloid, terpenoid, saponin dan tannin (Khalil *et al*., 2013).

Berdasarkan hasil analisa GCMS yang dilakukan Jayuska *et al*. (2015) fraksi n-heksana daun gaharu mengandung senyawa *Trans-Squalene* (68%*),* *Stigmast-4-en-3-one* (14,52%), *Stigmast-5-en-3-ol* (5,27%), *Hexanedioic* *acid, bis(2-ethylhexyl) ester* (5,01%), *dan Hexadecanoic acid, methyl ester* (1,17%). Lebih lanjut Yusuf *et al*. (2016) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun gaharu mengandung senyawa triterpenoid friedelanol

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun gaharu positif mengandung senyawa fenol dan flavonoid. Kadar total fenol ekstrak etanol daun gaharu sebesar 14,81% GAE sedangkan kadar total flavonoid sebesar 8,34% QE (Septiani *et al*., 2018).

**2.3 Metabolomik**

Metabolomikadalah salah satu bagian penelitian omik yang fokus pada peneltianidentifikasi molekul metabolit pada suatu tanaan (Krastov, 2010). Metabolomik dapat diaplikasikan untuk mempelajari korelasi antara bioaktivitas dn profil kimia dan pada akhirnya dapat digunakan untuk mengidentifikasi komponen bioaktif pada tanaman (Yuliana *et al*., 2011).

Banyaknnya data yang dihasilkan dari profil kimia menyebabkan analisi statistik pada studi metabolomik harus menggunakan data multivariat. Salah satu analisis data multivariat yang dapat digunakan untuk melihat korelasinya adalah sengan *orthogonal projection to letant structure* (OPLS) (Maser *et al*., 2017).

**2.4 Antioksidan**

Antioksidan dapat didefinisikan sebagai suatu zat yang dapat melindungi manusia dari radikal bebas (Shekhawat, 2010). Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegahnya terbentuknya radikal (Winarsi, 2007).

Pada umumnya uji aktivitas antioksidan dapat menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode DPPH adalah suatu metode kolorimetri untuk mengetahui aktivitas antiradikal yang efektif dan cepat (Reynertson, 2007).

Prinsip metode *radical scavenger* dengan uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) secara spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang, λ = 517 nm, berdasarkan pengukuran absorbansi DPPH sebagai kontrol dan saat DPPH ditambah sampel adalah peredaman radikal bebas difenilpikril hidrazil (berwarna ungu) pada panjang gelombang 516-520 nm oleh antioksidan (sebagai donor proton), sehingga membentuk difenilpikril hidrazin (berwarna kuning) pada panjang gelombang 330 nm , dengan mekanisme reaksi sebagai berikut :

  

**Gambar 2.** Reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan (Gujral *et al*., 2014)

Perhitungan yang digunakan dalam penentuan aktivitas penangkap radikal adalah nilai IC50 (*Inhibition Concentration* 50%), nilai tersebut menggambarkan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menangkap radikal sebesar 50%. Penentuan IC50, diperlukan persamaan kurva standar dari % inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi fraksi antioksidan sebagai sumbu x. Semakin kecil nilai IC50 menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidasinya (Molyneux, 2004).

**2.5 Kanker dan Leukemia**

Kanker terjadi karena adanya kelainan pada kromosom selyang dapat menyebabkan siklus sel berlangsung terus menerus (sel terus berproliferasi namun tidak berdiferensiasi). Senyawa antikanker merupakan suatu senyawa yang memiliki kemampuan untuk mencegah, membunuh atau menghambat sel kanker. Senyawa antikanker dapat diperoleh dari ektrak tumbuh-tumbuhan yang mengandung senyawa metabolit sekunder, seperti flavonoid, saponin, tanin dan steroid (Abdillah, 2006).

Leukemia merupakan kanker ganas pada jaringan hematopoietik yang ditandai dengan penggantian elemen sumsum tulang normal oleh sel darah abnormal atau sel leukemik.Hal ini disebabkan oleh proliferasi tidak terkontrol dari klon sel darah immatur yang berasal dari sel induk hematopoietik (Wirawan, 2003).

Murine leukemia P-388 digunakan untuk menguji aktivitas antikanker serta untuk mempelajari mekanisme resistensi obat. Model murine leukemia P-388 memiliki beberapa keunggulan yakni dapat direproduksi dan relatif murah dibandingkan dengan model *xenograft* tumor manusia dan sangat sangat berguna dalam pengembangan obat antikanker,pengembangan sejumlah prinsip terapi, serta dalam memahami perilaku tumor biologis (Donald *et al.*, 2008; Law *et al.,* 1949; Dawe *et al.*). Sitotoksiksitas adalah kemampuan suatu bahan atau senyawa toksik dalam menghambat atau menghentikan pertumbuhan sel kanker (Zuhud, 2011).

MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid*) *assay* digunakan dalam uji sitotoksik dan merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan yang berwarna ungu oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Absorbansi larutan berwarna ini dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 500 dan 600 nm. Jumlah formazan ungu yang diproduksi oleh sel yang diperlakukan senyawa uji dibandingkan dengan jumlah formazan yang diproduksi oleh sel control (Liu *et al*., 1997; Freimoser *et al*., 1999) atau dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader* (Junedy, 2005).



*Mitochondrial*

*Reductase*

*Enzymes*

**Formazan dye - purple**

**MTT – yellow tetrazolium**

**Gambar 3**. Reaksi pemecahan MTT menjadi kristal formazan yang berwarna ungu oleh sel kanker (Michael, 1988).

Metode MTT *assay* merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh sistem suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader* (Junedy, 2005).

**III. METODOLOGI PENELITIAN**

**3.1 Metode**

Penelitian ini merupakan *true experimental* di Laboratorium yang meliputi tahapan pengumpulan, pengeringan dan penghalusan sampel, ekstraksi, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, uji sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 menggunakan MTT *essay* serta karakterisasi profil senyawa menggunakan spektroskopi NMR dan korelasi antara profil senyawa dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 menggunakan pendekatan metabolomik dengan analisis data OPLS.

**3.2 Alat dan Bahan.**

Alat yang digunakan adalah, alat penghalus (*grinding mill*), alat-alat gelas,botol vial, pipet tetes, corong pisah, timbangan analitik, lemari asam dan penangas air listrik. Peralatan lain yang digunakan adalah *rotary* *evaporator* Heidolph, lampu ultraviolet (UV) dengan λ 254 dan 366 nm, NMR(1H dan 13C) JEOL ECP 500 yang beroperasi pada 500 MHz (1H) dan 125 MHz (13C).

Bahan yang digunakan adalah sampel tanaman langka asli Indonesia yaitu kulit kayu gaharu (*A. malacensisi*s). Bahan kimia berupa beberapa pelarut seperti metanol, etil asetat, *n*-heksan, kloroform, *n*-butanol, diklorometana, asam asetat yang berkualitas teknis terdestilasi, aseton, asam sulfat 2 N, AlCl3, HCl, NaOAc, H3BO3, DMSO (*Dimethyl sulfoxide*), (sel leukemia P-388 yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi LIPI Serpong, FBS (*Fetal Bovine Serum*) 2%, dan larutan MTT (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida*).

**3.3 Cara Kerja**

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut n-heksan teknisterdestilasi, residu dimaserasi berturut-turut dengan etil asetat dan metanol teknis terdestilasi, uji fitokimia menggunakan pereaksi uji fitokimia (pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner: *alkaloid*, pereaki Liberman-Burchard: *steroid dan terpenoid*, serbuk Mg dalam HCl 2N: *flavovoid*, akuades dan HCl 2 N: *saponin*, pereaksi etanol 70% dengan larutan FeCl35%: *fenol*) (Harborne, 1996), Aktivitas antioksidan ekstrak diukur dari kemampuannya melepaskan elektron atau atom hidrogen untuk mengubah senyawa radikal 1,1 –difenil- 2- pikrilhidrazil (DPPH) yang stabil membentuk DPPH non-radikal (Mathew *et al*., 2006). Uji sitotoksik terhadap sel murine leukemia P-388 secara *in vitro* dengan metode *3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida* (MTT) *assay* (Junedy, 2005). Karakterissasi profil senyawa kimia menggunakan metode spektroskopi NMR melalui tahapan sebagai berikut: 1). Preparasi sampel, b) Pemeriksaan sampel, dan c). Analisa data (Lukis dan Ersam, 2010).

**3.4. Analisis multivariat *Orthogonal Projection to the Least Square* (OPLS)**

Analisis OPLS akanmenunjukkan beberapa plot seperti *score plot*, Y *related coefficient plot* dan X varian plot dengan mengunakan *software* SIMCA (v.13.01). *Score plot* akan menunjukkan plot pengelopokan ekstrak dan fraksi berdasarkan aktivitas antikankernya. Dua matriks dari data selang waktu retensi dan data aktivitas antikanker akan dilihat korelasinya dengan menggunakan Y *related coefficient plot*. Korelasi signifikan ditunjukkan dengan nilai Y *corelated coefficient* yang lebih besar dari 0,5 (Erikson *et al*., 2001). Selang waktu retensiyang signifikan aktivitasnya akan dilihat penyebaran area puncaknya pada berbagai ekstrak dan fraksi dengan menggunakan X varian plot. Berdasarkan plot tersebut dapat diketahui ekstrak dan fraksi mana yang memiliki area puncak terbesar, hal ini mengindikasikan adanya komponen aktif. Ekstrak atau fraksi tersebut dapat diidentifikasi waktu retensi komponen aktif yang memberikan aktivitas antikanker yang signifikan terhadap antikanker Leukemia P-388.

**IV. HASIL, PEMBAHASAN DAN HAMBATAN**

**4.1 Ekstraksi Kulit Batang *Aquilaria malaccensis***

 Kulit batang tumbuhan *A. malaccensis* dikumpulkan dari Pulau Kalimantan pada bulan April 2018. Kulit batang *A. malaccensis* dibersihkan, dirajang, dihaluskan dan dikering anginkan pada suhu ruang yang terlindungi dari sinar matahari untuk mengurangi kadar air pada sampel. Sampel yang telah halus dapat membantu mempenerasi pelarut kedalam sel tampel sehingga pelarut akan mudah masuk kedalam sel karena luas permukaan sample yang besar.

Sampel halus *A. malaccensis* (1,5 kg) diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut *n*-heksana selama 3 x 24 jam. Metode maserasi dipilih karena memiliki beberapa keuntungan, diantaranya perlakuan dilakukan pada suhu kamar sehingga tidak membutuhkan banyak sumber energi, perlakuan dengan cara perendaman pada suhu kamar ini dapat melindungi senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung di dalam sampel dari pemanasan sehingga ramah terhadap senyawa kimia yang mudah terdegradasi oleh panas. ekstrak n-heksana kemudian disaring. Terhadap fitrat ekstrak *n*-heksana dipekatkan dengan vakum evaporator, sehingga didapatkan ekstran *n*-heksana (200 g).

 Terhadap residu dilakukan maserasi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat selama 3x24 jam, setiap 24 jam pelarut diganti dengan menggunakan pelarut yang baru. Hasil ekstraksi kemudian dipekatkan kembali dengan cakum evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat etil asetat sebanyak 405 g.

 Residu sisa maserasi etil asetat diekstraksi kembali dengan metanol. Filtrat hasil maserasi kemudian disaring dan dipekatkan dengan vakum evaporator sehingga didapatkan ekstrak pekat metanol sebanyak 425 g.

**4.2. Uji Fitokimia**

 Sampel *A. malaccensis* dilakukan penapisan senyawa metabolit sekunder menggunakan pereaksi uji fitokimia. Berikut hasil uji fitokimia sampel *A. malaccensis*:

**Tabel 1.** Hasil uji fitokimia kulit batang *A. malaccensis*

|  |  |
| --- | --- |
| **Jenis uji** | **Hasil pengujian** |
| Triterpenoid/steroid | + |
| Kuinon | - |
| Flavonoid | + |
| Alkaloid | - |
| Fenolik | - |
| Saponin | - |
| Tanin | - |

**4.3 Uji Aktivitas Antioksidan**

 Tahapan berikutnya adalah uji antioksidan terhadap ketiga fraksi yang didapatkan. Tujuannya adalah untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam meredam radikl bebas. Metode antioksidan yang digunakan adalah melalui pengukuran radikal scavengin DPPH. Pemilihan metode ini cocok digunakan dengan karakter senyawa yang terkandung dalam sampel tanaman *A. malaccensis*. Selain itu, metode DPPH ini mudah dikerjakan dan tidak memerlukan biaya yang cukup tinggi namun tetap akurat. Berikut ini hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi tanaman *A. malaccensis:*

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang *A. malaccensis*

|  |  |
| --- | --- |
| **Fraksi** | **IC50 (ppm)** |
| *n*-heksana | 1.161, 43 |
| Etil asetat | 228,10 |
| Metanol | 188,74 |

 Menurut Armala (2009), tingkat kekuatan antioksidan yang memiliki aktivitas antioksidan di atas 150 ppm tergolong ke dalam senyawa antioksidan golongan lemah. Berdasarkan Tabel 4 fraksi metanol memiliki nilai IC50 paling rendah diantara fraksi n-heksana dan etil asetat yaitu sebesar 188,74 ppm. Hal tersebut dimungkinakan karena pada fraksi metanol terkandung banyak senyawa metabolit sekunder golongan fenolik yang memiliki gugus OH banyak sehingga proton dari OH akan mereduksi radikal DPPH, sehingga memiiki aktivitas antioksidan paling baik diantara fraksi yang lain.

**4.4 Uji Toksisitas sel Murine Leukemia P-388**

Terhadap fraksi teraktif antioksidan maka dilakukan uji toksisitas sel murine Leukemia P-388, untuk melihat aktivitas antikankernya. Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 menunjukkan nilai IC50 dari ekstrak metanol adalah 8,52 µg/mL, Nilai IC50 ekstrak etil asetat sebesar 9,9 µg/mL, dan nilai IC50  ekstrak n-heksan sebesar 23,56 µg/mL.

.**4.5 Analisis NMR Metabolomik**

 Karakterisasi fraksi aktif dilakukan melalui analisis NMR metabolomik untuk mengetahui kandungan senyawa yang terkandung di dalam fraksi metanol, dalam proses penelitian.

**4.6 Analisis Data Multivariat OPLS**

 Analisis multivariat dilakukan setelah data uji toksisitasn dan interpretasi NMR metabolomik, dalam proses penelitiian.

**4.7 Hambatan**

Belum ditemukan hambatan yang berarti hingga saat ini.

**V. KESIMPULAN DAN SARAN**

**5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Berdasarkan hasil uji fitokimia, ampel *A. malaccensis* mengandung senyawa triterpenoid, steroid dan flavonoid.
2. Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak n-heksan, etil asetat dan methanol masing-masing sebanyak 200 g, 405 g dan 425 g.
3. Eekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC50 masing-masing sebesar 1.161,43 ppm, 228, 10 ppm dan 188,74 ppm dan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.
4. Ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 dengan IC50 masing-masing sebesar ppm, ppm, ppm.
5. Terdapat korelasi antara profil senyawa kimia pada ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*) hasil analisa spektroskopi NMR dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 berdasarkan pendekatan metabolomik menggunakan analisis data multivariat OPLS.

**5.2 Saran**

Saran yang perlu disampaikan adalah:

1. Penelitian lebih lanjut mengenai isolasi senyawa yang memiliki aktivitas antiokasidan dan sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 dari ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*).
2. Penentuan struktur molekul senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap sel Murine Leukemia P-388 dari ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol kulit batang gaharu (*A. malaccensis*) mengunakan spektroskopi UV-Vis, FTIR, MS dan NMR.

**DAFTAR PUSTAKA**

Astuti. 2008. Isoflavon Kedelai dan Potensinya Sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. 13 (2). 126 -136.

Aulia IP. 2009. Efek Minyak Atsiri Cabe Jawa terhadap Jumlah Limfosit Tikus Wistar yang Diberi Diet Kuning Telur. [Skripsi]. Semarang (ID): Universitas Diponegoro.

Djajanegara, I., dan Wahyudi, P. 2009. Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksisitas fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *Annona squamosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **7** (1): 7-11.

Donald J. Dykes, BS and William R. Waud. 2008. *Pharmacogenomics in Drug Discovery* *and Development*. XIII, 478., Hardcover ISBN: 978-1-58829-887-4.

Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wold, S., 2001. *Multi and Megavariate* *data analysis*. Umeå, Umetrics.

Freimoser, F.M., Jakob, C.A., Aebi, M., and Tuor, A. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Applied and Environmental Microbilogy*. 65, 3727-3729.

Freshney, R. I.1987. Animal *cell Culture, A practical approach ed. 1st*. Washington DC: IRL Press.

Gujral HS, Sharma P, Kumar A, Singh B. 2014. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extruded Brown Rice. *International Journal of Food Properties.* Vol. 15 (2): 301-311.

Hall, R.D., 2006. Plant Metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic, *New* *Phytologist* 169, 453-468.

Hamid A, Usman L, Ameen M. 2010. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological Applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 4(8). 142-151.

Harbourne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Menganalisis Tumbuhan Terbitan* *Kedua*. Penerbit ITB. Bandung.

Jayuska A, Ardiningsih P, Destiarti L, Puteri T. 2015. *Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Bioaktif Dari Fraksi N-Heksana Daun Gaharu (Aquilaria Malaccensis L) Menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Masa (GC-MS)*. Laporan Penelitian. Kimia FMIPA Universitas Tanjungpura. Pontianak

Junedy, S. 2005. Isolasi dan Uji Sitotoksisitas Senyawa Alkaloid dari Spon Koleksi no MD-02 Cyang*, Skripsi*, Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada.

Krastanov, A., 2011. *Metabolomics the state of art. Biotecnol & Biotechnol 24*: 1537-1543

Kementrian Kehutanan RI. 2010. *Siaran pers Nomor : S. 251 /PIK-1/2010, Keanekaragaman hayati sektor kehutanan.* Retrieved from[www.dephut.go.id:http://www.dephut.go.id/index.php/news/details/7145](http://www.dephut.go.id:http:/www.dephut.go.id/index.php/news/details/7145)

Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., and Schubert, D. 1997. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of* *Neurochemistry*. 69 (2), 581-593

Lukis, P.A. dan Ersam, T. 2010. Dua Senyawa Mangostin dari ekstrak n-heksan pada kayu akar Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Kabupaten Nganjuk Jawa Timur. Prosiding Kimia FMIPA ITS. Surabaya: ITS Surabaya.

Makker K, Agarwal A, Sharma R. 2009.Oxidative stress and male infertility. *Indi an J Med Res.* 129:357 – 67.

Marlin I. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Garcinia lateriflora Blume var. javanica Boerl* dengan Metode DPPH dan Identifikasi Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif. [Skripsi]. Depok (ID) : Universitas Indonesia.

Maser, WH., Rusmarilis, H., Yuliana, ND. 2017. Aplikasi Metabolomik Berbasis HPLC Untuk Mengidentifikasi Waktu Retensi Komponen Antibakteri Stapylococcus aureus Pada Ekstral Bunga Kecombrang (*Etlingera elatior*). *Alchemy* Vol. 13 No.2 : 241-251

Mathew S, Abraham ET. 2006. *In vitro* antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol*.44:198–206.

Michael, C., Alley., Dominic, A., Scudiere., Anne Monks., Miriam L., and Hursey. 1988. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research Journal.* **48**: 589-601.

Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 26(2):211-219.

Nugroho AE, Malik A, Pramono S. 2013. Total Phenolic and Flavonoid Content, and *in Vitro* Antihypertention Activity of Purified Extract of Indonesian Cashew Leaves (*Anacardium occidentale* L.). International Food Research Journal. 20 (1): 299-305.

Pratt DE, Hudson.1992. Natural Antioxidant Not Exploited Commercially*. Food Antioxidant, Elsevier Applied Science*. London.

Priyanto, 2009, *Farmakoterapi dan Terminologi Medis*, hal 143-155 Leskonfi, Depok. Retnomurti, H.R. (2008). Pengujian Toksisitas Akut Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Secara *In Vivo*. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut PertanianBogor. Halaman 30-31.

Reynertson KA. 2007. Rytochemical analysis of bioactive constituen from edible Myrtaceae fruit. *Disertation*. The City University of New York.

Riris, ID., Barus, T., Simanjuntak, P., Wirjosentono, B., 2014. Isolation and Structure Elucidation of Bioaktive Compounds Chemical as Inhibitors of the Enzyme A-Glucosidase Raru Bark Ethanol Extract (*Vatica pauciflaura* Blume). *International Journal of Chemistry* Vol 6 No. 2.

Santoso E, Turjaman M, Irianto RSB, Agustini L, Efiyanti L, Faulina SA. 2014. Buku Seri IPTEK V Kehutanan, Pusat Litbang Konservasi dan Rehabilitasi (Puskonser), Jakarta.

Septiani AKN, Parwata IMO, Putra AAB. 2018. Penentuan Kadar Total Fenol, Kadar Total Flavonoid Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Gyrinops Versteegii)*, *Jurnal Wahana Matematika dan Sains*. Vol. 12 (1): 78-89.

Shekhawat N. 2010. Assement of Free Radical Scavenging Activity of Crude Extract of Some Medicinal Plants. *Journal Scientific Research*. 5 (4):298-301

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

Sukandar, D., S. Hermanto & E. Lestari. 2007. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Majalah Farmasi Airlangga. 7(26) :42-45*

Sukandar D, Hermanto S, Amelia E. 2015. *Penapisan Bioaktivitas Tanaman Pangan Fungsional Masyarakat Jawa Barat dan Banten*. Jakarta (ID): Direktorat Jenderal Pendidikan Islam Kementerian Agama.

Suryohudoyo P. 2007. *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta (ID) : CV Sagung Seto.

Tamuli P, Boruah P, Nath C.S, and Leclercq P, 2005, Essential Oil of Eaglewood Tree: a Product of Pathogenesis, *J. Essent. Oil Res.*, 17, 601-604.

Varh G, Storz P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research.* 44(5): 479–496.

Walujo, E. B.,2011. *Keanekaragaman Hayati Untuk Pangan*, Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Disampaikan pada Konggres Ilmu Pengetahuan Nasional X . Jakarta, 8 – 10 November 2011.

Wang L, Unehara N, Kitanaka S. 2005. *Lignans from the roots of wikstroemia indica and their DPPH radical, scavenging and nitric oxide inhibitory activities*. *ChemPharm*. Bull. 53 (10). 1348-1351.

Widayati E. 2012. *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant*. Semarang (ID) : Unissula.

Wil, N.N.A.N., Omar, N.A.M., Ibrahim, N.A., Tajuddin,S.N., 2014. In Vitro Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of *A.* *Malaccensis* Leaf Extracts. *Journal of Chemical* *and* *Pharmaceutical Research*, 6(12), 688-693 Alimon, H., Arriffin, Azziz, S.A., Ibrahim, R., Jaafar, F.M., Sukari, M. 2011. Biological Activities of Leaf and Bark from *Aquilaria cassna* Pierre.

Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta (ID) : Kanisius.

Wu Y, Liu C, Li F-H, Sun B-J, Li Y-Y, Gu W, Wang D-Y, Liu G-J, Hu L-Y 2014, A novel neolignan glycoside from *Aquilaria sinensis,* Biochemical Systematics and Ecology, Vol 55, 41–45.

Yuliana, N.D., Alfi, K., Young, H.C and Robert, V. 2011. Metabolomics for bioactivity assesment of natural products. *Phytotherapy Research* 25 No. 2, 157-169

Yusuf, S, Jayuska A, Idiawati N. 2016.Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Triterpenoid dari Daun Gaharu (*Aquilaria Malaccensis* Lam.). *JKK*, Vol. 5 (1): 65-69.

Zhao H, Wang Z, Cheng C, Yao L, Wang L, Lu W, Yang X, Ma F. 2011. In-Vitro Free Radical Scavenging Activities of Anthocyanins from Three Berries *Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 5(32), pp. 7036-7042.

Zuhud, E,. 2011. *Bukti Kedahsyatan Sirsak Menumpas Kanker*. Yunita Indah. Cetakan-1. Agromedia Pustaka : Jakarta.