

STUDI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN CEM-CEM (*Spondias pinnata* L.f Kurz) DAN IDENTIFIKASI SENYAWANYA DENGAN LC-MS/MS

N. K. Ariati\*, A. A. Putri, E. Sahara, I W. Suarsa

*Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Kabupaten Badung, Bali, Indonesia*

\*Email: [komangariati@unud.ac.id](mailto:komangariati@unud.ac.id)

---

## ABSTRAK

Tanaman Cem-cem (*Spondias pinnata* L.f Kurz) sering digunakan oleh masyarakat Bali sebagai tanaman obat tradisional. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan ( $IC_{50}$ ) pada ekstrak daun cem-cem dan mengidentifikasi senyawa aktifnya menggunakan metode *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Serbuk daun cem-cem sebanyak 750 g dimaserasi dengan 5 L etanol menghasilkan 35 g ekstrak kental etanol. Pada ekstrak kental hasil uji aktivitas antioksidannya ( $IC_{50}$ ) sebesar 10,35 ppm, untuk hasil partisi menunjukkan bahwa antioksidan tertinggi terdapat pada ekstrak n-butanol dengan nilai  $IC_{50}$  44,99 ppm, diikuti oleh kloroform dengan nilai  $IC_{50}$  98,03 ppm, n-heksan dengan nilai  $IC_{50}$  219,89 ppm dan air dengan nilai  $IC_{50}$  298,43 ppm. Ekstrak n-butanol selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom dan diperoleh hasil 3 fraksi gabungan (F1, F2, F3) dan 1 fraksi yang tidak terelusi (F4), dengan aktivitas antioksidan tertinggi pada F1 yang memiliki nilai  $IC_{50}$  151,91 ppm. Berdasarkan analisis data LC-MS/MS ekstrak kental etanol dan F1 diduga mengandung senyawa rhamnetin yang berperan sebagai antioksidan.

**Kata kunci:** antioksidan, daun cem-cem, LC-MS/MS, rhamnetin

## ABSTRACT

Cem-cem plants (*Spondias pinnata* L.f Kurz) are often used by Balinese people for traditional medicine. This research aimed to determine the antioxidant activity ( $IC_{50}$ ) of cem-cem leaf extract and identify its active compounds using the *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) method. About 750 g of cem-cem leaf powder was macerated with 5 L of ethanol to produce 35 g of crude ethanol extract. In the crude extract, the antioxidant activity test results ( $IC_{50}$ ) amounted to 10.35 ppm, for the partition results showed that the highest antioxidant was found in n-butanol extract with  $IC_{50}$  value of 44.99 ppm, followed by chloroform with  $IC_{50}$  value of 98.03 ppm, n-hexane with  $IC_{50}$  value of 219.89 ppm and water with  $IC_{50}$  value of 298.43 ppm. The n-butanol extract was further separated by column chromatography, and the results of the separation obtained three combined fractions (F1, F2, F3) and one fraction that did not elute (F4), with the highest antioxidant activity in F1 that has the  $IC_{50}$  value of 151.91 ppm. Based on the LC-MS/MS data analysis, the ethanol extract of F1 was suspected to contain rhamnetin compounds that acted as antioxidants.

**Keywords:** antioxidant, cem-cem leaf, LC-MS/MS, rhamnetin

## PENDAHULUAN

Tanaman cem-cem (*Spondias pinnata* L.f Kurz) merupakan tanaman yang sering digunakan oleh masyarakat Bali sebagai tanaman obat tradisional. Daun cem-cem memiliki berbagai manfaat Kesehatan yang efektif dalam mengobati disentri, luka bakar, sakit kulit, bisul, batuk, dan sebagai antioksidan dalam tubuh. Hal ini disebabkan oleh senyawa flavonoid, saponin, dan tanin yang terdapat pada daun cem-cem yang memiliki sifat antiinflamasi, antioksidan, antivirus, antibakteri dan anti kanker (Rosyidah, 2021). Flavonoid memiliki kemampuan untuk

bertindak sebagai antioksidan yang melawan radikal bebas (Sujarwo dkk, 2015).

Radikal bebas adalah suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Elektron yang tidak berpasangan dan sangat reaktif dari senyawa radikal bebas ini selanjutnya akan menetralkan diri dengan mengambil elektron dari molekul lain termasuk protein, lipid, karbohidrat, dan DNA. Radikal bebas didalam tubuh terbentuk secara alami sebagai bagian dari proses metabolisme. Radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan penyakit seperti kanker, penyakit jantung, stroke, dan penuaan dini (Amiani dkk, 2022). Antioksidan merupakan suatu senyawa yang mampu

menangkal atau merendam efek negatif dari radikal bebas dengan cara mendonorkan salah satu elektronnya (Wahdaniahd kk, 2020). Salah satu metode dalam pengujian antioksidan yaitu Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode ini digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak, dengan parameter uji berdasarkan perbandingan nilai IC<sub>50</sub> dalam sampel (Lung dan Destiani, 2017). Metode ini merupakan metode yang paling sederhana, cepat, mudah, akurat, murah, dan mampu mengukur berbagai komponen yang bertindak sebagai radikal bebas.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, daun cem-cem diketahui mengandung flavonoid, tanin dan saponin (Wulansari dan Armayanti, 2018). Nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak air daun cem-cem dengan konsentrasi 4% (b/v) adalah 240,58 ppm. Nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH (Pratiwi dan Wiadnyani, 2018). Mengingat kandungan senyawa flavonoid, saponin, tanin yang terkandung dalam daun cem-cem dan kemampuan flavonoid dalam menangkal radikal bebas maka mendorong untuk dilakukan penelitian tentang studi aktivitas antioksidan ekstrak daun cem-cem (*Spondias pinnata* L.f Kurz) dan identifikasi senyawanya dengan LC-MS/MS.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, rak tabung, kertas saring, kuvet, botol vial, syringe, oven, ayakan 60 mesh, alat ekstraksi, blender, *rotary vacum evaporator*, kromatografi kolom, neraca analitik, Spektrofotometer Uv-Vis (Shimadzu/UV-1800), LC-MS/MS (LC: ACQUITY UPLC® H-Class System and a mass spectrometer Xevo G2-S QToF). Bahan yang digunakan adalah daun cem-cem, aquades, etanol 96% p.a, n-butanol p.a, kloroform p.a, n-heksan p.a amonia, pereaksi Mayer, FeCl<sub>3</sub> 1%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a, asam asetat anhidrat, HCl p.a, serbuk Mg, Kristal DPPH, NaOH, silika gel GF254, dan silika gel 60.

### Persiapan

Tanaman cem-cem yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Dawan Kaler, Kecamatan Dawan, Kabupaten Klungkung, Bali. Daun cem-cem yang segar dicuci dengan air

mengalir dan disortasi basah, selanjutnya dipotong kecil-kecil dan dikering anginkan selama 3 hari. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh.

### Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air daun cem-cem ditentukan dengan metode gravimetri. Cawan kosong dikeringkan di dalam oven selama 60 menit lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang dengan neraca analitik. selanjutnya serbuk daun cem-cem dimasukkan ke dalam cawan sebanyak 2 g dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Setelah proses pengeringan cawan didinginkan dan ditimbang. Perlakuan tersebut dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Perhitungan kadar air menggunakan persamaan 1.

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{W_a - W_b}{W_a} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

W<sub>a</sub> = massa sampel basah (g)

W<sub>b</sub> = massa sampel akhir (g)

### Ekstraksi dan Partisi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sebanyak 750 g serbuk daun cem-cem diekstraksi dengan 1 L pelarut etanol selama 1 x 24 jam, dan diulangi sebanyak 5 kali. Selanjutnya etanol diuapkan dengan *rotary vacum evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental daun cem-cem. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian skrining fitokimia. Rendemen ekstrak yang diperoleh dihitung dengan menggunakan persamaan 2.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{massa ekstrak}(g)}{\text{massa serbuk}(g)} \times 100\% \quad (2)$$

Ekstrak kental yang diperoleh dilarutkan dengan menggunakan pelarut campuran etanol dan air (7:3) kemudian pelarut diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50-60 °C hingga seluruh etanol menguap. Selanjutnya air yang tersisa dipartisi berturut-turut dengan n-heksan kloroform dan n-butanol. Ekstrak yang diperoleh dari hasil partisi dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan.

### **Skrining Fitokimia (Harborne, 1996)**

#### **Identifikasi alkaloid**

Serbuk daun cem-cem diekstrak dengan kloroform dan ditambahkan amonia. Ekstrak disaring dan dimasukkan pada tabung reaksi kemudian tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N dikocok dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Fraksi asam dipisahkan dan ditambahkan pereaksi Mayer. Perubahan yang terjadi diamati dan terbentuknya endapan putih yang menandakan positif alkaloid.

#### **Identifikasi flavonoid**

Serbuk daun cem-cem diekstrak dengan etanol kemudian disaring dan dimasukkan ke tabung reaksi. Untuk pengujian flavonoid ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat jika positif mengandung flavonoid akan berwarna merah.

#### **Identifikasi terpenoid**

Serbuk daun cem-cem diekstrak dengan kloroform dan diuapkan pada suhu kamar, kemudian ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Perubahan warna yang terjadi diamati, jika positif terpenoid maka akan berwarna hijau/biru.

#### **Identifikasi saponin**

Serbuk daun cem-cem diekstrak dengan aquades dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ekstrak daun dikocok sampai berbusa kemudian ditambahkan HCl pekat dan kocok kembali. Kestabilan busa yang terbentuk diamati, jika busa yang terbentuk stabil maka positif saponin.

#### **Identifikasi tanin**

Ekstrak daun cem-cem diambil 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 2-3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Apabila larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka ekstrak tersebut mengandung tanin (Harborne, 1996).

#### **Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan 4 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL etanol dengan menggunakan labu ukur. Selanjutnya untuk menentukan panjang gelombang maksimum digunakan larutan DPPH 0,1 mM dipipet sebanyak 1,5 mL, kemudian ditambahkan 4,5 mL etanol ke dalam botol gelap

dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis yang telah diatur panjang gelombangnya dari 400 - 600 nm (Rohmaniyah, 2016). Untuk pengukuran absorbansi sampel dibuat beberapa variasi konsentrasi. Masing-masing variasi konsentrasi diambil sebanyak 4,5 mL dan dimasukkan ke dalam botol gelap. Setelah itu ditambahkan 1,5 mL larutan DPPH 0,1 mM ke dalam masing-masing variasi dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada λmaks. Nilai absorbansi dari tiap sampel dihitung presentase (%) inhibisinya dengan persamaan 3 dan menentukan nilai IC<sub>50</sub> dari persamaan regresi linear ( $y = a \pm bx$ ).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs blangko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blangko}} \times 100\% \quad (3)$$

#### **Pemisahan dengan Kromatografi Kolom**

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan silika gel 60 sebagai fase diam dan campuran kloroform:etanol (1:3) sebagai fase gerak. Kran pada kolom dibuka dan ditampung setiap 3mL dalam botol vial. Eluat yang mempunyai nilai R<sub>f</sub> dan pola noda yang sama digabungkan sebagai fraksi yang sama kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan.

#### **Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS**

Identifikasi senyawa menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) dilakukan pada fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling baik. Sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a. Larutan disaring menggunakan filter syringe 0,22 mikron, dimasukkan ke dalam vial 2 mL, dan diinjeksikan ke sistem LC-MS.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **Kadar Air**

Analisis kadar air merupakan salah satu parameter fisikokimia yang berhubungan langsung dengan stabilitas dan kualitas senyawa aktif bahan alam (terutama selama proses penyimpanan) (Wandira dkk, 2023). Berdasarkan Departemen Kesehatan RI (1995), kadar air dalam simplisia tidak boleh lebih dari 10%. Berdasarkan hasil perhitungan, serbuk daun cem-cem memiliki kadar air sebesar 7,53 %. Hal ini

menunjukkan bahwa kadar air dalam serbuk daun cem-cem telah memenuhi standar simplisia.

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan untuk mendapatkan gambaran

tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Berdasarkan hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil data uji fitokimia pada Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan n-butanol daun cem-cem mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder.

**Tabel 1.** Hasil Uji Skrining Fitokimia

Sampel	Identifikasi	Perubahan	Hasil
Ekstrak kental etanol	Alkaloid	Endapan berwarna putih	+
	Flavonoid	Jingga	+
	Terpenoid	Hijau	+
	Saponin	Busa	+
	Tanin	Hijau kebiruan	+
Ekstrak n-butanol	Alkaloid	Terdapat Endapan	+
	Flavonoid	Merah	+
	Terpenoid	Hijau	+
	Saponin	Tidak berbusa	-
	Tanin	Hijau kebiruan	+

Hasil pengujian flavonoid ekstrak etanol dan n-butanol diperoleh perubahan warna menjadi merah. Menurut Fransworth (1996), perubahan warna menjadi merah menunjukkan senyawa flavonoid yang terkandung adalah flavonol. Hasil positif pada alkaloid yaitu munculnya endapan terjadi karena alkaloid dalam ekstrak akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kalium-alkaloid yang mengendap (Yasser dkk, 2022). Pada uji steroid penambahan reagen Liebermann-Burchad mengakibatkan steroid mengalami dehidrasi menghasilkan kompleks yang berwarna hijau atau biru (Sulistyarini dkk, 2019). Pada uji saponin Busa dapat terbentuk karena saponin merupakan senyawa yang mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob. Pada saat dikocok gugus hidrofilik akan berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofob akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih. Pada uji tanin hasil positif ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna hijau kehitaman disebabkan oleh tanin yang bereaksi dengan ion  $Fe^{3+}$  membentuk senyawa kompleks.

### Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cem-Cem

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui kapasitas senyawa aktif dalam

ekstrak untuk menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan ekstrak daun cem-cem diukur dengan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*). Aktivitas antioksidan hasil pengujian dinyatakan dalam  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi zat antioksidan yang menghasilkan persen penghambatan sebesar 50%. Semakin rendah nilai  $IC_{50}$  maka daya hambatnya ekstrak terhadap radikal bebas semakin tinggi. Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak daun Cem-cem dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak kental etanol dan ekstrak n-butanol memiliki kekuatan aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena nilai  $IC_{50} < 50$ . Ekstrak kloroform tergolong kedalam aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  yang berada dalam range 50-100. Sedangkan pada ekstrak n-heksan dan ekstrak air tergolong kedalam aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan nilai  $IC_{50} > 200$  (Rosyidah, 2021).

Perbedaan aktivitas antioksidan pada ekstrak dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung. Ekstrak n-butanol yang menunjukkan nilai  $IC_{50}$  terendah atau paling aktif antioksidan dilanjutkan dengan pemisahan kromatografi kolom

**Tabel 2.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Daun Cem-cem

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Larutan uji	% inhibisi larutan uji	Persamaan linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
Ekstrak kental etanol	20	0,1198	51,38	$y = 48,352 + 0,1591x$ $r = 0,9955$	10,3583
	40	0,1124	54,38		
	60	0,1017	58,73		
	80	0,0960	61,04		
	100	0,0888	63,96		
Ekstrak air	50	0,2096	14,94	$y = 9,2045 + 0,1367x$ $r = 0,9975$	298,431
	100	0,1879	23,74		
	150	0,1716	30,36		
	200	0,1551	37,05		
	250	0,1418	42,45		
Ekstrak n-heksan	50	0,1658	32,71	$y = 28,494 + 0,0978x$ $r = 0,9923$	219,898
	100	0,1523	38,19		
	150	0,1359	44,85		
	200	0,1290	47,65		
	250	0,1172	52,44		
Ekstrak kloroform	50	0,1323	46,31	$y = 43,255 + 0,0688x$ $r = 0,9955$	98,0378
	100	0,1210	50,89		
	150	0,1156	53,08		
	200	0,1052	57,31		
	250	0,0978	60,31		
Ekstrak n-butanol	20	0,1356	44,97	$y = 41,015 + 0,1997x$ $r = 0,9977$	44,9925
	40	0,1261	48,82		
	60	0,1158	53,00		
	80	0,1043	57,67		
	100	0,0973	60,51		

### Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Ekstrak n-butanol merupakan ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan paling baik. Fraksi-fraksi hasil dari pemisahan dalam kromatografi kolom dilanjutkan dengan menguji aktivitas antioksidan. Berdasarkan hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, fraksi n-butanol memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-butanol, yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada fraksi n-butanol lebih rendah. Kandungan senyawa-senyawa antioksidan pada ekstrak n-butanol, yaitu alkaloid, tannin, flavonoid, dan terpenoid dapat mempengaruhi kapasitas antioksidan yang lebih tinggi. Kombinasi beberapa senyawa dapat yang bekerja secara sinergis sehingga meningkatkan aktivitas antioksidan secara keseluruhan (Hardiada dkk, 2022).

Fraksi 1 menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> terbaik yang tergolong dalam aktivitas antioksidan lemah. Fraksi 2 juga tergolong dalam aktivitas antioksidan lemah, namun memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang lebih tinggi dari pada fraksi 1, sedangkan fraksi 3 dan fraksi 4 aktivitas antioksidannya sangat lemah karena memiliki nilai IC<sub>50</sub> >200. Selanjutnya fraksi 1 diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS untuk mengidentifikasi senyawa aktif yang bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan. Identifikasi senyawa aktif tidak dilakukan pada ekstrak n-butanol karena ekstrak n-butanol mengandung campuran dari berbagai senyawa. Analisis langsung menggunakan LC-MS pada campuran senyawa yang sangat kompleks dapat menghasilkan puncak spektrum yang saling tumpang tindih sehingga tidak efektif dalam interpretasi data.

**Tabel 3.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan pada Masing-Masing Fraksi

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Larutan uji ( $\lambda$ : 515)	% inhibisi larutan uji	Persamaan linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
Fraksi 1	50	0,1411	42,74	$y = 39,184 + 0,0712x$ $r = 0,9956$	151,91
	100	0,1336	45,78		
	150	0,1222	50,41		
	200	0,1135	53,94		
	250	0,1073	56,45		
Fraksi 2	50	0,1375	44,20	$y = 41,68 + 0,0508x$ $r = 0,9958$	163,78
	100	0,1302	47,16		
	150	0,1264	48,70		
	200	0,1184	51,95		
	250	0,1121	54,50		
Fraksi 3	50	0,1358	44,89	$y = 43,888 + 0,0244x$ $r = 0,9953$	250,492
	100	0,1319	46,47		
	150	0,1288	47,73		
	200	0,1261	48,82		
	250	0,1237	49,80		
Fraksi 4	50	0,1421	42,33	$y = 40,698 + 0,0302x$ $r = 0,9969$	308,013
	100	0,1393	43,47		
	150	0,1349	45,25		
	200	0,1307	46,96		
	250	0,1278	48,13		

### Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS

Identifikasi senyawa kimia dilakukan dengan menggunakan *liquid chromatography-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Hasil yang diperoleh berupa kromatogram yang dianalisis menggunakan aplikasi *Masslyn* v4.1, database chemspider, dan database pubchem. Masing-masing spektra massa pada waktu retensi tertentu dianalisis untuk mengetahui rumus molekul dari massa molekul yang diperoleh dengan pendekatan *i-fit*. Persentase *i-fit* (%*i-fit*) menunjukkan kelimpahan senyawa pada spektra massa dan kemiripan dengan spektra massa dari senyawa yang terdapat pada database.

Ekstrak kental etanol daun cem-cem memiliki aktifitas antioksidan terbaik, kemudian dilanjutkan analisis menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui puncak area, berat molekul,

dan kemungkinan struktur senyawa yang terdapat pada daun cem-cem. Hasil identifikasi menggunakan LC-MS/MS menghasilkan beberapa puncak spektrum kromatografi dengan waktu retensi yang berbeda. Hasil analisis serta dugaan senyawa dapat dilihat pada Tabel 4. Identifikasi senyawa pada ekstrak kental etanol terdapat 11 puncak dengan 1 puncak yang dapat teridentifikasi yaitu pada waktu retensi 7,55. Pada 10 puncak yang lainnya tidak dapat diidentifikasi karena tidak ada kecocokan antara spektra massa dari X puncak tersebut terhadap database.

Hasil pemisahan dari kromatografi kolom juga dilakukan identifikasi dengan LC-MS/MS. Fraksi yang dilakukan pengujian merupakan fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan yang terbaik. hasil analisis serta dugaan senyawa dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 4** Hasil Analisis Ekstrak Kental Etanol dengan LC-MS/MS

Waktu Retensi (Rt)	Ion [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	i-fit (%)	Rumus Molekul	Dugaan Senyawa
2,16	258,1132	71,99	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	-
5,88	303,0508	100	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	-
6,10	287,0549	99,97	C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> N <sub>10</sub>	-
7,55	317,0663	68,15	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Rhamnetin
7,92	301,0724	97,59	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-
8,19	317,0673	99,29	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-
11,91	478,3372	87,75	C <sub>24</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>8</sub>	-
12,30	272,2590	99,97	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>2</sub>	-
17,10	593,2770	94,61	C <sub>35</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	-
18,00	637,3030	83,69	C <sub>36</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-
18,34	621,3104	94,86	C <sub>38</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> O	-

**Tabel 5.** Hasil Analisis Fraksi 1 dengan LC-MS/MS

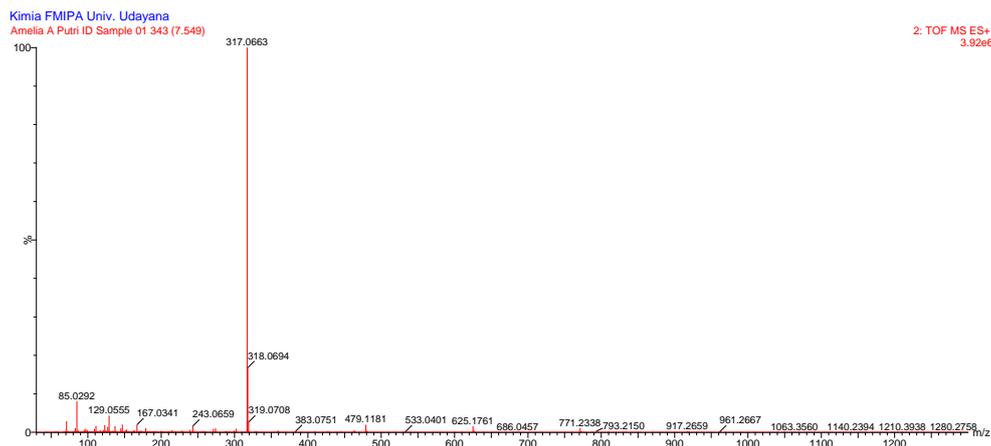
Waktu Retensi (Rt)	Ion [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	i-fit (%)	Rumus Molekul	Dugaan Senyawa
2,01	125,9869	82,15	C <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	-
2,18	203,0534	80,87	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	-
6,05	388,2538	100	C <sub>16</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>9</sub>	-
6,24	432,2816	99,45	C <sub>18</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>10</sub>	-
7,14	325,1775	99,09	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-
7,86	317,0648	86,75	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Rhamnetin
9,89	325,2278	99,92	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O	-
10,72	343,1357	63,92	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	-
11,78	225,1981	100	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	-
13,16	154,9980	100	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	-

Identifikasi senyawa pada fraksi 1 menunjukkan 10 puncak dengan 1 puncak yang dapat teridentifikasi. Setelah dilakukan analisis 9 puncak tidak dapat diidentifikasi karena tidak ada kecocokan antara spektra massa dari X puncak tersebut terhadap database.

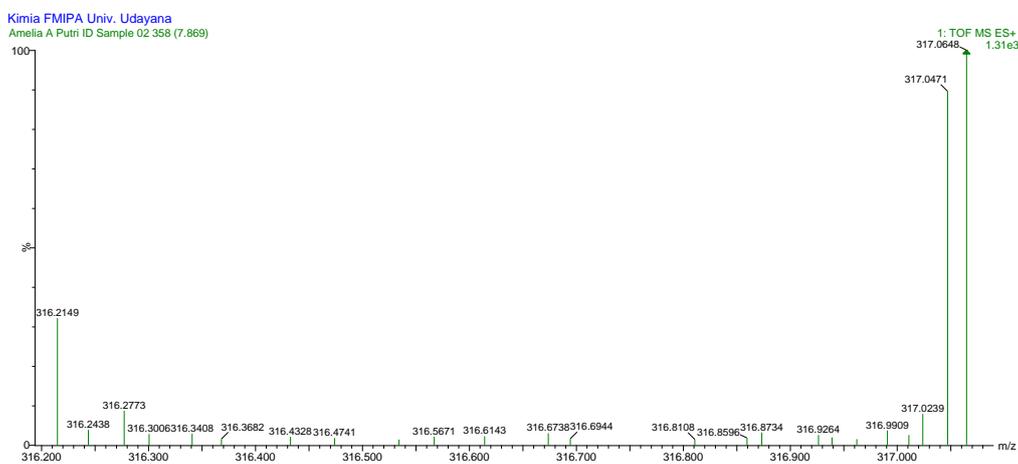
Hasil identifikasi dari ekstrak kental etanol dan fraksi 1 memiliki dugaan senyawa yang sama namun pada waktu retensi yang berbeda. Perbedaan waktu retensi disebabkan karena pengaruh Komposisi Matriks. Ekstrak kental etanol mengandung lebih banyak campuran senyawa dibandingkan fraksi 1. Efek matriks dapat menyebabkan perubahan waktu retensi melalui gangguan pada interaksi analit dengan fase stasioner (Fang et al., 2014). Pada ekstrak kental etanol senyawa yang dapat diidentifikasi yaitu pada waktu retensi 7,55 dan menghasilkan ion molekuler pada m/z 317,0658 g/mol. Melalui pendekatan i-fit (kedekatan yang

dibaca oleh *software masslynk*) yaitu sebesar 68,15% diperoleh rumus molekul C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>. Untuk mengidentifikasi dugaan senyawa tersebut menggunakan spektrum yang dapat dilihat pada Gambar 1.

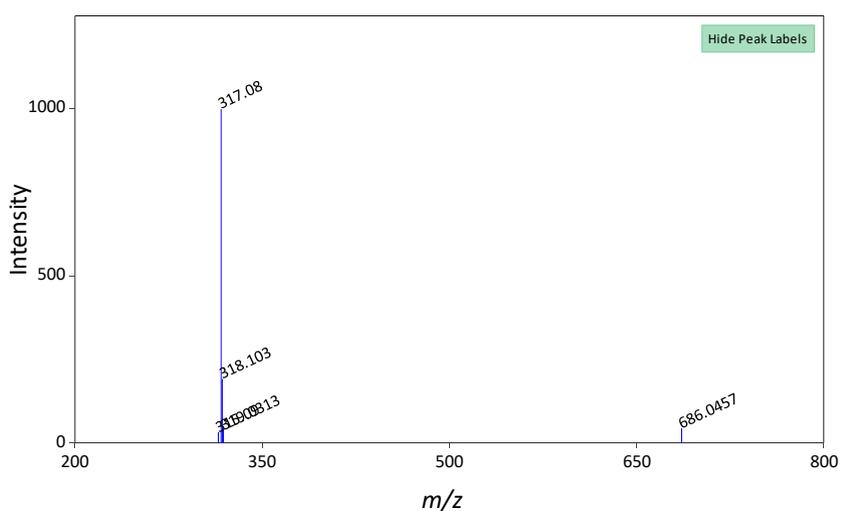
Pada fraksi 1 senyawa yang dapat diidentifikasi adalah pada waktu retensi 7,86 menghasilkan ion molekuler pada m/z 317,0648 g/mol (Gambar 2). Melalui pendekatan i-fit yaitu sebesar 86,75% diperoleh rumus molekul C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>7</sub>. Saat proses pemisahan pada Mass Spectroscopy (MS) dipisahkan dengan penembakan satu proton (H<sup>+</sup>) maka rumus molekul yang akan dicocokkan dengan database dikurangi 1 atom H, sehingga rumus molekulnya menjadi C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>. Rumus molekul dan spektrum hasil analisis dicocokkan dengan database Massbank. Untuk mengidentifikasi dugaan senyawa tersebut menggunakan spektrum yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 1. Spektrum massa pada waktu retensi 7,55

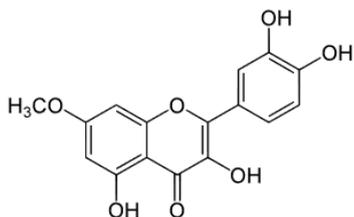


Gambar 2. Spektrum massa pada waktu retensi 7,86



Gambar 3. Spektrum massa rhamnetin

Berdasarkan hasil pencocokan rumus molekul dan spektrum diperoleh dugaan senyawanya yaitu 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-one atau Rhamnetin dengan struktur dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur senyawa rhamnetin

Rhamnetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-one) merupakan metabolit sekunder golongan flavonoid yang termasuk kedalam golongan flavonol dan umumnya ada sebagai O-glikosida (Medeiros dkk, 2022). Gugus aktif yang berperan dalam aktivitas antioksidan flavonol adalah gugus hidroksil (-OH) pada cincin B memungkinkan delokalisasi elektron, pembentukan ikatan hidrogen intramolekul, dan stabilisasi radikal. Hidrogen pada gugus hidroksil pada posisi C3 di cincin C menjadi situs abstraksi yang paling disukai karena menghasilkan struktur radikal yang stabil. Gugus karbonil pada posisi C4 juga berkontribusi terhadap stabilisasi radikal bebas (Spiegel et al., 2020). Rhamnetin biasanya terdapat pada berbagai tumbuhan dan buah-buahan serta memiliki sifat farmakologis yang seperti aktivitas antioksidan, antikanker, anti-inflamasi, antivirus dan antibakteri.

## SIMPULAN

Ekstrak kental etanol daun cem-cem menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 10.35 ppm. Hasil partisi dengan aktivitas antioksidan tertinggi yang tergolong sangat kuat adalah ekstrak n-Butanol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 44,99 ppm. Hasil pemurnian ekstrak n-Butanol dengan aktivitas antioksidan tertinggi yang tergolong lemah adalah fraksi 1 dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 151,91 ppm. Dugaan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun cem-cem dan fraksi 1 yang dapat teridentifikasi dengan LC-MS/MS adalah dari golongan flavonol yaitu 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxychromen-4-one atau Rhamnetin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amiani, Winney., Fahrizal, M.R., dan Aprelea, R.N. 2022. Kandungan Metabolit Sekunder dan Aktivitas Tanaman Bajakah Sebagai Agen Antioksidan. *Jurnal Health Sains*. 3(4): 516-522.
- Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Farnsworth, Norman. R., 1996. Biological and Pytochemical Screening of Plants, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55(3): 225-276..
- Fang, N., Yu, S., Ronis, M. J., & Badger, T. M. 2014. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. *Experimental Biology and Medicine*, 240(4): 488–497.
- Harborne, J. 1996. *Metode Fitokimia: Penurunan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Cetakan Kedua. a.b Padmawinata, K. dan I. Soediro. ITB. Bandung.
- Hardiadana, M. F., Hudi, L., & Budiandari, R. U. 2022. Pengaruh Konsentrasi Pengemulsi Inulin dan Lama Pemasakan terhadap Kualitas Selai Lidah Buaya. *Journal of Tropical Food and Agroindustrial Technology*, 3(2): 33–39.
- Lung, Jackie Kang Sing dan Destiani, Dika Pramita. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan metode DPPH. *FARMAKA*. 15(1): 53-61
- Medeiros, D. L., Lima, E. T. G., Silva, J. C., Medeiros, M. A., dan Pinheiro, E. B. F. 2022. Rhamnetin: a review of its pharmacology and toxicity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 74(6): 793–799.
- Pratiwi, I. D. P. K., dan Wiadnyani, A. S. 2018. Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Flavonoid Minuman Ready to Serve Dari Ekstrak Daun Cem-Cem (*Spondias pinnata* (Lf) kurz), Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban) dan Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L)). *Media Ilmiah Teknologi Pangan*. 5(1): 19-26.
- Rohmaniyah, M. 2016. Uji Aktitvitas Ekstrak Etanol 80% dan Fraksi Aktif Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* B.) Menggunakan Metode DPPH Serta Identifikasi Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.

- Rosyidah, Afafa Ainur. 2021. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air, Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Metanol Daun Kedondong (*Spondias Dulcis*) Dengan Menggunakan Metode Dpph. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Spiegel, M., Andruniów, T., & Sroka, Z. 2020. Flavones' and Flavonols' Antiradical Structure–Activity Relationship—A Quantum Chemical Study. *Antioxidants*. 9(6): 461.
- Sujarwo, W., Keim, A.P., Savo, V., Guarrera, P.M., Caneva, G. 2015. Ethnobotanical Study of Loloh: Traditional Herbal Drinks from Bali (Indonesia). *Journal of Ethnopharmacology*. 169: 34-48.
- Sulistyarini, I., Sari, D.A., dan Wicaksono, T.A. 2019. Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 56-62.
- Wulansari, N. T. dan L. Y. Armayanti. 2018. Efektivitas Ekstrak Daun Cem-cem (*Spondias pinnata* (L.f) Kurz) dalam Menghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *JURNAL MEDIA SAINS*. 2(2): 59 – 63.
- Wahdaniah., Erika, Mega., dan Purwaningsih, Indah. 2020. Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol Daun Jeringau Merah (*Acorus Sp.*) Metode DPPH. *Jurnal laboratorium khatulistiwa*. 4(1): 26-33.
- Wandira, Ayu., Cindiansya., Jihan R., Riswanti F.A., Sri A.N., dan Lia F. 2023. Menganalisis Pengujian Kadar Air Dari Berbagai Simplisia Bahan Alam Menggunakan Metode Gravimetri. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*. 9 (17): 190-193.
- Yasser, M., M. Ilham Nurdin., Amri., Herman Banggalino., Ninin Angraini., dan Ririn Urfi Said. 2022. Skrining Fitokimia Senyawa Flavonoid, Alkaloid, Saponin, Steroid Dan Terpenoid Dari Daun Kopasanda (*Chromolaena odorata* L.). *Prosiding 6th Seminar Nasional Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat 2022*. Makassar: Politeknik Negeri Ujung Pandang.