

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Mindi (*Melia azedarach* Linn)

Melia azedarach Linn merupakan tanaman asli dari Asia Selatan dan Australia Timur. Sekarang tumbuhan mindi banyak ditemukan di banyak negara seperti Malaysia, Birma, Jepang, Afrika, Australia dan Indonesia^[5,9].

Tanaman mindi tumbuh dengan baik di daerah tropik dan subtropik, di tempat yang cukup lembab, baik di dataran rendah maupun di daerah pegunungan sampai ketinggian 1100 meter di atas permukaan laut, dan mampu tumbuh dengan baik pada musim kering^[2]. Nama lain dari *Melia azedarach* Linn adalah *Melia japonica* D. Don., *Melia toosenden* Sieb., *Melia sumbucina* bl. en. M. Nama tanaman ini berbeda-beda pada tiap daerah di Indonesia, seperti: gringging, mindi (Jawa), renceh, mindi kecil (Sumatera), cakra cikri (Melayu), intaran (Bali).

Secara umum tanaman mindi ini digunakan sebagai obat cacing, insektisida dan obat penyakit kulit^[10].

2.1.1. Taksonomi Tanaman Mindi^[11]

Klasifikasi tanaman mindi secara taksonomi adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Subdivisi: Angiospermae

Kelas : Dicotyledone

Ordo : Rutales

Famili : Meliaceae

Genus : Melia

Species : *Melia azedarach* Linn

2.1.2. Morfologi Tanaman Mindi

Mindi merupakan pohon atau perdu dengan ketinggian sampai 30 meter. Daunnya menyirip rangkap tiga, panjang 2-8 cm, anak daunnya empat sampai delapan pasang, ditambah anak ujung daun. Daun berwarna hijau, dan bentuknya lanset sampai elips. Tepi daunnya bergerigi kasar dengan ujung daun yang runcing sedangkan bagian bawah daun halus. Kelopak daun berwarna hijau panjang 1,5-2 mm, daun bunga kemerah-merahan 1-1,3 cm, dan benang sari berbentuk silinder berwarna ungu tua. Buah yang dihasilkan berupa buah dengan tangkai yang panjang. Buahnya berbentuk bulat lonjong, buah mindi sesudah masak berwarna kuning atau kuning kecoklatan dan berbiji satu^[2,5].

2.1.3. Penggunaan Tradisional

Daun mindi dapat digunakan sebagai obat lepra, penguat gigi, dan sebagai obat beberapa penyakit kulit. Di Persia dan Arab, perasan daun mindi digunakan sebagai peluruh haid, sedangkan bubur daun atau bunganya digunakan untuk mengobati sakit kepala yang hebat. Di pulau Jawa, pasta daun mindi digunakan untuk mengobati gatal-gatal. Di Indocina, daun mindi digunakan untuk melindungi buah-buahan yang disimpan dari serangan serangga dan dapat disimpan pada lipatan buku untuk melindunginya dari serangan kutu buku. Di

Amerika, rebusan daun mindi digunakan sebagai obat sakit perut, sedangkan di Tongkin, daun yang berwarna hijau dan ekstrak airnya dianggap dapat berfungsi sebagai insektisida.

Kulit pohon mindi digunakan sebagai obat cacing gelang. Serbuk kulit pohon digunakan untuk beberapa penyakit kulit. Kulit pohonnya yang dibakar kemudian diseduh dengan air dapat digunakan sebagai obat gudik.

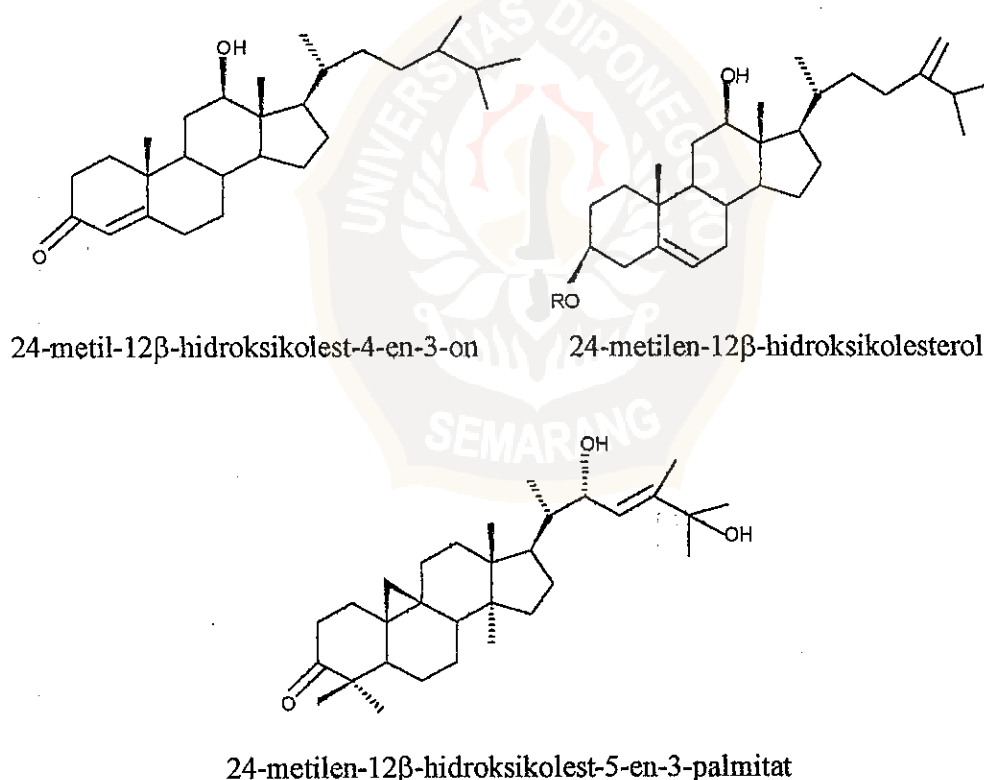
Biji buah mindi digunakan sebagai obat demam, gangguan saluran urine, gangguan pada panggul, dan reumatik. Di Cina, buah mindi digunakan sebagai racun ikan, sedangkan di Amerika digunakan sebagai insektisida. Kulit akarnya digunakan sebagai obat penyakit kulit, tumor, keracunan dalam darah, sakit kepala, gangguan paru-paru, dan kadang-kadang digunakan untuk mengobati encok.

Dalam akar mindi ditemukan senyawa yang mempunyai daya antifeedant (tidak suka makan) terhadap insektisida yaitu *Azedarachin C*. Daya antifeedant diuji terhadap larva *Spodoptera Hubner*^[7].

2.1.4. Tinjauan Kimia

Skrining fitokimia daun mindi menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin, dan steroid/triterpenoid. Selain itu, telah diketahui pula bahwa daun mindi mengandung pigmen karotenoid dan klorofil, lipida, serta meliatin.

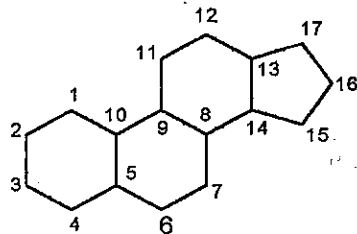
Skrining fitokimia ekstrak eter minyak bumi dan ekstrak kloroform menunjukkan adanya senyawa golongan steroid/triterpenoid, sedangkan dalam ekstrak etanol ditemukan senyawa golongan flavonoid, tanin, dan saponin. Di samping itu, ekstrak etanol juga dapat diduga mengandung asam p-hidroksi-benzoat, asam p-kumarat, asam vanilat, dan asam ferulat dalam bentuk ester dan glikosida^[7]. Ekstrak etanol dari batang mindi ditemukan adanya senyawa tipe limonoid yaitu *1-tigloyl-3-acetyl-11-methoxymeliacarpinin* dan *1-acetyl-3-tigloyl-11-methoxymeliacarpinin* yang memiliki aktifitas sitotoksik^[4]. Selain itu dilaporkan dalam ekstrak metanol Meliaceae ditemukan adanya senyawa golongan steroid dan terpenoid seperti gambar di bawah ini.



Gambar 2.1. Senyawa steroid dan terpenoid dalam famili Meliaceae^[12]

2.2. Steroid^[13]

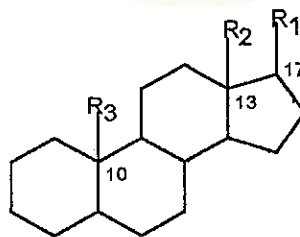
Steroid adalah senyawa yang mempunyai kerangka dasar karbon, yang merupakan turunan dari hidrokarbon siklopentenoperdihidrofenantren.



Gambar 2.2. Struktur siklopentenoperhidrofenantren^[13]

Steroid terdiri berbagai jenis struktur dan mempunyai peran penting dalam kehidupan, sebagai kolesterol, vitamin D, hormon seks, hormon kortikoid, dan antibiotik.

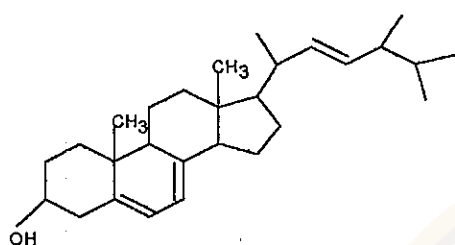
Steroid dapat diklasifikasikan berdasarkan sifat fisiologis. Kelompok-kelompok itu adalah sterol, asam-asam empedu, hormon seks, hormon adrenokortikoid, aglikon kardiak, dan sapogenin. Ditinjau dari segi struktur molekul, perbedaan antara berbagai kelompok steroid ini ditentukan oleh jenis substituen R_1 , R_2 , dan R_3 , yang terikat pada kerangka dasar karbon.



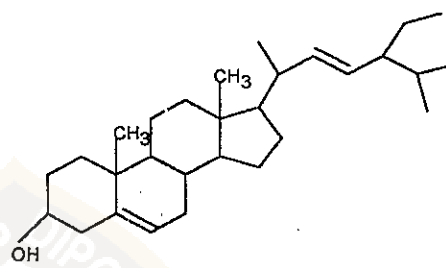
Gambar 2.3. Kerangka dasar karbon steroid^[13]

Sedangkan perbedaan antara senyawa satu dengan yang lain dari suatu kelompok tertentu ditentukan oleh panjang rantai karbon R_1 , gugus fungsi yang terdapat pada substituen R_1 , R_2 , dan R_3 , jumlah serta posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap, dan konfigurasi dari pusat-pusat asimetris pada kerangka dasar karbon itu. Beberapa contoh masing-masing kelompok steroid ditunjukkan pada daftar di bawah ini.

Sterol

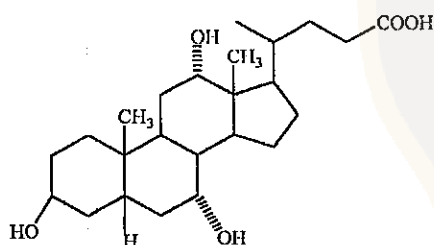


Ergosterol

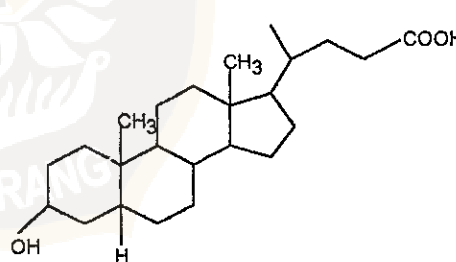


Stigmasterol

Asam-asam empedu

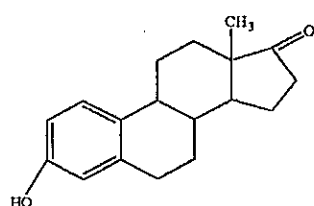


Asam kolat

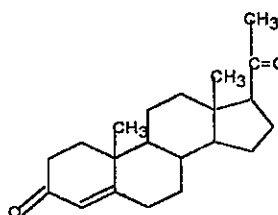


Asam litokolat

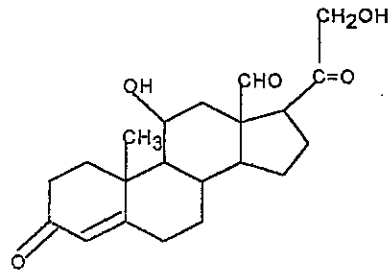
Hormon seks



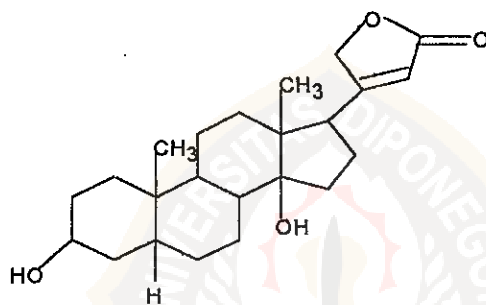
Oestron



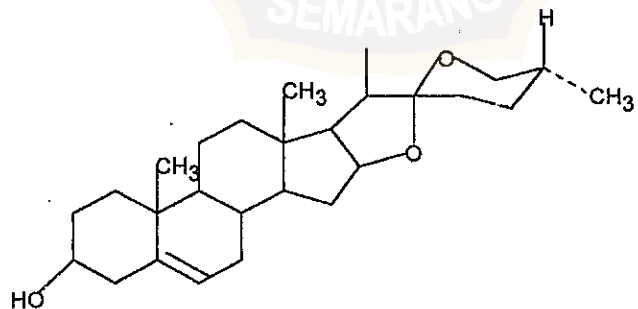
Progesteron

Hormon adrenokortikoid

Aldosteron

Aglikon kardiak

Digitoksigenin

Sapogenin

Diosgenin

Gambar 2.4. Contoh beberapa kelompok steroid^[13]

2.3. Metode Pemisahan

2.3.1. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu cara untuk mendapatkan ekstrak kasar atau *crude* yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam suatu pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel, masuk dalam rongga sel dan larut dalam pelarut tersebut sehingga didapatkan ekstrak kasar (*crude*). Keuntungan metode maserasi ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah serta hasilnya cukup baik.

Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah pelarut yang murah dan mudah diperoleh, selektif dan tidak merusak senyawa yang akan diekstrak^[14].

2.3.2. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah salah satu metode pemisahan yang termasuk dalam kromatografi serapan. Pemisahan senyawa-senyawa dengan kromatografi kolom ini tergantung distribusi diantara fasa gerak dan fasa tetap dalam perbandingan yang berbeda-beda dari satu senyawa dengan senyawa yang lain^[15,16]. Kromatografi kolom terdiri atas 2 jenis, kromatografi kolom vakum dan kromatografi kolom gravitasi. Teknik kedua jenis kromatografi kolom ini sama, terdiri dari suatu kolom yang berisi zat padat sebagai fase diamnya. Fase kedua yaitu fase gerak yang akan mengalir sepanjang kolom^[17]. Pemisahan campuran senyawa dilakukan dalam suatu kolom gelas vertikal. Sampel ditambahkan melalui bagian atas kolom dalam suatu pelarut yang dilewatkan melalui kolom untuk memisahkan komponen-komponen sampel^[15]. Kecepatan bergerak dari

suatu kolom tergantung pada besarnya komponen tertambat/tertahan oleh penyerap di dalam kolom.

Elusi pertama kali digunakan oleh Tsweet pada tahun 1903 untuk pemisahan senyawa berwarna yaitu pigmen-pigmen daun. Senyawa-senyawa tak berwarna dapat juga dilihat dari lokasinya karena fluoresensi senyawa pada sinar ultraviolet. Setelah terjadi pemisahan, pita komponen dapat diambil dengan jalan memotong bagian-bagian yang mengandung berbagai komponen, kemudian diekstrak dengan pelarut yang sesuai. Cara lain aliran dari zat pengelusi dapat diteruskan hingga tiap-tiap komponen tercuci sempurna dari kolom. Untuk mengetahui tiap-tiap komponen dapat dideteksi dengan menggunakan pereaksi kimia yang cocok atau tes fisika^[16].

2.3.3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan yang cukup baik untuk senyawa-senyawa bahan alam seperti lipid, steroid, kuinon, alkaloid dan terpenoid. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan 2 fasa, yaitu fasa tetap/diam dan fasa gerak. Penyerap sebagai fase diam dibentangkan di atas permukaan penyokong, biasanya digunakan pelat kaca. Plat yang telah dilapisi kemudian dipanaskan/diaktifkan dengan jalan memanaskannya pada suhu $\pm 100^{\circ}\text{C}$ selama beberapa waktu lamanya. Tetapi sekarang kebanyakan pemisahan menggunakan plat pralapis niaga yang seragam dan memberikan hasil yang dapat terulangkan. Plat dapat mengandung indikator fluoresensi atau tidak. Penambahan indikator ini memungkinkan pendeteksian senyawa bila plat diamati dengan sinar

ultraviolet berpanjang gelombang 254 nm atau 365 nm^[3,16]. Setelah penyiapan plat selanjutnya larutan cuplikan dalam pelarut yang mudah menguap ditotolkan pada plat dengan menggunakan pipa kapiler. Bila noda telah kering plat diletakkan secara vertikal dalam bejana dengan tepi bawah dicelupkan dalam fase gerak tertentu. Lokasi dari senyawa pada plat tersebut diidentifikasi dengan fluoresensi menggunakan lampu ultraviolet atau pereaksi kimia yaitu penyemprotan dengan H₂SO₄ pekat sehingga kedudukan noda dapat diberi tanda. Metode identifikasi paling mudah adalah menggunakan harga R_f (*retardation factor*), yaitu perbandingan antara jarak noda dengan jarak pelarut^[16].

Kromatografi lapis tipis preparatif adalah suatu kromatografi lapis tipis dari sampel dalam jumlah yang relatif banyak dan digunakan untuk menyiapkan dan mengisolasi senyawa yang terpisah secara kuantitatif untuk langkah lebih lanjut seperti analisis inframerah/sintesis. Kromatografi preparatif dapat dikerjakan dalam plat yang disediakan sendiri. Bubur penyerap disiapkan dalam pelarut dan disapukan pada permukaan plat dan kemudian pelarut diuapkan. Sampel ditotolkan pada plat dengan pipa kapiler dan dilakukan pengembangan, pita yang mengindikasikan senyawa dikerok dari plat dan diekstraksi dengan pelarut yang sesuai^[18].

2.4. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

2.4.1. Spektroskopi Ultra Violet dan Tampak

Suatu spektra ultra violet diperoleh dari alat spektrofotometer UV-Vis yang secara sederhana memetakan panjang gelombang dari suatu serapan terhadap

intensitas serapan, yaitu absorbansi atau transmitansi^[15]. Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultra violet dan terlihat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Oleh karena itu, serapan radiasi ultraviolet/terlihat sering dikenal sebagai *spektroskopi elektronik*. Transisi-transisi tersebut biasanya antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital-orbital yang bersangkutan^[19].

Pemisahan yang paling tinggi diperoleh bila elektron-elektron dalam ikatan σ tereksitasi yang menimbulkan serapan pada daerah 120-200 nm. Daerah tersebut dikenal sebagai daerah ultra violet vakum dan relatif tidak banyak memberikan keterangan. Di atas 200 nm merupakan daerah eksitasi elektron dari orbital p, orbital d, dan orbital π , terutama sistem π terkonjugasi, mudah pengukurannya dan spektrumnya memberikan banyak keterangan.

Dalam praktek, spektrometri ultra violet digunakan terbatas pada sistem terkonjugasi. Meskipun demikian, terdapat keuntungan yang selektif dari serapan ultra violet, yaitu gugus-gugus karakteristik dapat dikenal dalam molekul-molekul yang sangat kompleks^[20].

2.4.2. Spektroskopi Infra Merah

Bila sinar infra merah dilewatkan melalui cuplikan senyawa organik, maka sejumlah frekuensi diserap, sedangkan frekuensi yang lain diteruskan/ditransmisikan^[20]. Suatu molekul yang menyerap sinar infra merah akan mengalami perubahan energi vibrasi dan perubahan tingkat energi rotasi^[21].

Penggunaan spektrum infra merah untuk penentuan struktur senyawa organik biasanya antara $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Daerah di bawah frekuensi 650 cm^{-1} dinamakan infra merah jauh dan daerah di atas frekuensi 4000 cm^{-1} dinamakan infra merah dekat^[19]. Pada suhu kamar, molekul-molekul organik dalam keadaan vibrasi yang tetap. Setiap ikatan mempunyai frekuensi ulur dan frekuensi tekuk yang karakteristik dan dapat menyerap sinar pada frekuensi tersebut^[20].

2.4.3. Spektrometri Massa

Spektrum massa menunjukkan, massa dari molekul dan massa-massa dari belahannya^[19]. Molekul-molekul ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion bermuatan positif yang bertenaga tinggi (ion-ion molecular/ion-ion induk), yang dapat pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (ion-ion pecahan/ion-ion anak). Lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation dan proses ini dapat dinyatakan sebagai $M \rightarrow M^+$.



Ion molekular M^+ biasanya terurai menjadi sepasang pecahan/fragmen, yang dapat berupa radikal dan ion, atau molekul yang kecil dan radikal kation^[19].

2.5. Uji Toksisitas Akut

Uji toksisitas merupakan bagian dari toksikologi. Toksikologi didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari tentang aksi berbahaya zat kimia dalam kondisi tertentu mampu menimbulkan efek atas jaringan biologi^[22].

Uji toksisitas akut merupakan uji toksisitas dengan pemberian suatu senyawa pada hewan uji pada suatu saat. Maksud uji tersebut adalah untuk menentukan gejala sebagai akibat pemberian suatu senyawa. Prosedur awal untuk menentukan toksisitas akut senyawa baru adalah dengan membuat satu kisaran dosis kasar untuk diberikan pada hewan uji. Takaran dosis yang dianjurkan berkisar dari dosis terendah yang belum memberikan efek kematian seluruh hewan uji sampai dengan tertinggi yang dapat mematikan seluruh hewan^[23].

Pengamatan aktivitas biologi yang dilakukan pada uji toksisitas akut dapat berupa pengamatan gejala-gejala klinis atau kematian hewan uji. Adapun data yang diperoleh pada uji toksisitas akut dapat berupa data kuantitatif yang dinyatakan dengan harga LD_{50}/LC_{50} . LC_{50} (*Lethal Concentration*) adalah konsentrasi yang diperlukan untuk mematikan 50% hewan percobaan dalam jangka waktu tertentu, sedangkan LD_{50} (*Lethal Dose*) yaitu dosis yang diperlukan (dalam mg) untuk mematikan 50% hewan percobaan, dinyatakan dalam mg/kilogram berat badan^[24].

2.5.1. Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach^[25].

Meyer melaporkan suatu metode uji hayati yang tepat dan murah untuk skrining ekstrak tanaman aktif dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina*

yang dikenal dengan metode *Brine Shrimp Lethality*. Dalam metode ini ditentukan harga LC_{50} dalam $\mu\text{g/mL}$ dari ekstrak yang diujikan dalam medium larutan NaCl. Metode ini cepat, murah dapat dipercaya dan sampel yang digunakan relatif sedikit (2-20 mg) dan sesuai untuk analisis bioassay umum. Telur *Artemia salina* sebelumnya digunakan dalam sejumlah metode bioassay, namun saat ini telah dikembangkan suatu metode dimana ekstrak fraksi dan senyawa murni yang telah diisolasi dari bahan alam diuji pada konsentrasi 10, 100, 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) dalam botol yang berisi larutan NaCl dan 10-30 ekor *Artemia salina* dalam tiap pengujian yang sama. Setelah 24 jam *Artemia salina* yang hidup dihitung dan prosentase kematian dicatat. Data-data yang diperoleh diproses dengan program komputer yaitu *Bliss Method* untuk menentukan LC_{50} . Senyawa yang mempunyai $LC_{50} < 30$ bersifat sitotoksik, $LC_{50} 30-200$ bersifat anti mikroba dan $LC_{50} > 200$ bersifat pestisida.

Uji dengan menggunakan *Artemia salina* ini banyak digunakan untuk uji sitotoksik. Hasil uji ini telah dibuktikan secara *in vivo* dengan menggunakan sel tumor dan kanker dengan hasil yang baik dan dalam beberapa hal terdapat korelasi.