TESIS – SK142502

ISOLASI SENYAWA TERPENOID, ASAM LEMAK DAN ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN KACANG KAYU (*Cajanus cajan* (L) Millsp) DARI PULAU POTERAN-MADURA

DEBORA ARIYANI
NRP. 1412 201 012

PEMBIMBING
Prof. Dr. Taslim Ersam

PROGRAM MAGISTER
BIDANG KEAHLIAN KIMIA HAYATI
JURUSAN KIMIA
BIDANG KEAHLIAN KIMIA HAYATI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015

THESIS – SK142502

ISOLATION OF TERPENOID, FATTY ACID COMPOUNDS AND BIOACTIVITY ANTIOXIDANTS FROM *CAJANUS CAJAN* (L) MILLSP FROM POTERAN-MADURA ISLAND

DEBORA ARIYANI
NRP. 1412 201 012

SUPERVISOR
Prof. Dr. Taslim Ersam

MASTER PROGRAM
CHEMISTRY DEPARTMENT
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA
2015

Telah disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Sains (M.Si.)
di
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :
Debora Ariyani
NRP. 1412 201 012

Tanggal Ujian : 23 Maret 2015
Periode Wisuda : September 2015

Disetujui oleh :

1. **Prof. Dr.Taslim Ersam, MS** **(Pembimbing)**
   NIP. 19520816 197903 1 004

2. **Adi Setyo Purnomo, M.Sc., Ph.D** **(Penguji)**
   NIP. 19800724 200812 1 002

3. **Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D** **(Penguji)**
   NIP. 19801103 200212 2 001

Direktur Program Pascasarjana,

Prof. Dr. Ir. Adi Suprijanto, M.T.
NIP. 19640405 199002 1 001

Isolasi Senyawa Asam lemak, Terpenoid Dan Bioaktivitas Antioksidan Dari Tumbuhan Kacang Kayu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) Dari Pulau Poteran-Madura

Nama Mahasiswa	:	Debora Ariyani
NRP	:	1412 201 012
Dosen Pembimbing	:	Prof.Dr.Taslim Ersam

ABSTRAK

Dua senyawa asam lemak dan satu senyawa terpenoid telah berhasil diisolasi dari ekstrak metanol tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) yang terdapat di Pulau Poteran-Madura yaitu 2-Hidroksi Asam icosanat dan 3-(4',8',12'- trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol. Pada penelitian ini, pemisahan senyawa dilakukan dengan ekstraksi secara maserasi dan kombinasi teknik kromatografi. Penentuan struktur dilakukan menggunakan data spektroskopi UV, IR, ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR dan dengan perbandingan data yang telah dilaporkan sebelumnya. Berdasarkan pengujian antioksidan menggunakan radikal DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) yang telah dilakukan diketahui bahwa 2-Hidroksi Asam icosanat bersifat tidak aktif dan 3- (4',8',12'- trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol bersifat lemah dengan nilai IC_{50} 271,53 μg/mL.

Kata kunci : *Cajanus cajan* (L) Millsp, asam lemak, terpenoid, antioksidan *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*

Isolation of Fatty Acid, Terpenoid Compounds and Bioactivity Antioxidants from *Cajanus cajan* (L) Millsp from Poteran-Madura Island

By : Debora Ariyani
Student Identity Number : 1412 201 012
Supervisor : Prof.Dr.Taslim Ersam

ABSTRACT

Fatty acid derivatives and terpenoid had been isolated from methanol extract of kacang kayu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) from Poteran-MaduraIsland, namely 2-hydroxy icosanoic acid, and 3-(4',8',12'- trimethyltridecyl) cyclohexena-1-ol. Isolation of compounds were achieved by extraction (maceration) and combination of chromatographic technique. The structure of the compound were determined basis on UV, IR , ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR spectra and by comparing with the previously reported data. These compounds were evaluated for its *in vitro* antioxidant activity using 2,2 - diphenyl - 1 – picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging have 2-hydroxy icosanoic acid not active and 3-(4',8',12'-trimethyltridecyl) cyclohexena-1-ol IC_{50} 271,53 μg/mL.

Keywords: *Cajanus cajan* (L) Millsp, fatty acid, terpenoid, 2,2 - diphenyl - 1 – picrylhydrazyl (DPPH)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan tesis yang berjudul, **"Isolasi Senyawa Asam Lemak, Terpenoid Dan Bioaktivitas Antioksidan Dari Tumbuhan Kacang Kayu (*Cajanus Cajan* (L) Millsp) Dari Pulau Poteran-Madura"**, dapat diselesaikan oleh penulis dengan baik. Naskah ini disusun sebagai syarat mata kuliah Tesis (SK 14-2502), program pascasarjana jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Taslim Ersam, selaku dosen pembimbing yang telah berkenan memberikan bimbingan, saran serta nasehat-nasehat.
2. Hamzah Fansuri, Ph. D selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA-ITS.
3. Prof. Mardi Santoso, Ph. D selaku ketua program studi pascasarjana Jurusan Kimia FMIPA-ITS.
4. Prof. Dr. Perry Burhan, selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan pengarahan selama perkuliahan
5. Keluarga tercinta mama, bapak, adikku vicko kakak devi dan abang Samuel yang memberikan dukungan dan doa penuh selama mengerjakan penelitian tesis ini.
6. Seluruh jajaran Bapak Ibu Dosen Pascasarjana Kimia FMIPA ITS, atas segala dedikasinya dan ilmu yang diberikan.
7. Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas Beasiswa Unggulan yang diberikan periode 2012-2014.
8. Mas Irfan, analis laboratorium Instrumen ITS atas bantuan analisa IR. Tegar Achsendo, analis Laboratorium SATREPS ITD-Universitas Airlangga atas bantuan analisa NMR dan bapak M. Holil atas bantuan analisa GC-MS.
9. Teman-teman Laboratorium kimia bahan alam dan sintesis, teman-teman Hayati 2012 yang telah memberikan dukungan dan semangat dan semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya naskah tesis ini.

Penulis menyadari bahwa naskah Tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun dari para pembaca sangat diharapkan. Akhir kata, penulis juga berharap naskah ini bermanfaat bagi pembaca.

Surabaya, Maret 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL ..... **Error! Bookmark not defined.**
HALAMAN PENGESAHAN ..... **Error! Bookmark not defined.**
ABSTRAK iv
ABSTRACT v
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI ix
DAFTAR GAMBAR xii
DAFTAR TABEL xiii
DAFTAR LAMPIRAN xiv
BAB 1 PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 2
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.3 Manfaat Penelitian 3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Tumbuhan Fabacea 5
2.2 Kandungan kimia dari famili Fabaceae. 7
2.3 Senyawa yang terdapat pada C.*cajan* (L.) Millsp. 8
2.4 Tinjauan Tentang Senyawa Terpenoid 8
2.4.1 Senyawa Diterpenoid 9
2.5 Biosintesis senyawa Terpenoid 10
2.6 Tinjauan Tentang Senyawa Asam Lemak 12
2.6.1 Asam lemak Tak Jenuh 13
2.7 Aktivitas Antioksidan 15
2.8 Teknik Isolasi, Pemisahan dan Pemurnia Senyawa 18
2.8.1 Ekstraksi 18
2.8.2 Pemisahan 19
2.8.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 19
2.8.2.2 Kromatografi Cair Vacum (KCV) 20
2.8.3 Pemurnian 20

2.9 Metode Spektroskopi 21
2.9.1 Spektrofotometer Serapan Ultraviolet dan Sinar Tampak (UV-Vis) 21
2.9.2 Spektrofotometer Infrared 22
2.9.3 Spektrokopi NMR 23
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN 25
3.1. Alat dan Bahan 25
3.1.1. Alat 25
3.1.2. Bahan 25
3.2. Pengumpulan Tumbuhan 26
3.3 Persiapan Bahan 26
3.4. Isolasi dan Identifikasi 26
3.4.1 Isolasi Senyawa 26
3.4.1.1 Maserasi 26
3.4.1.2 Fraksinasi Fraksi Metanol 26
3.5 Uji titik leleh dan kelarutan 27
3.6 Penentuan Struktur 28
3.6.1 Spektroskopi IR 28
3.6.2 Spektroskopi ^{1}H NMR 28
3.7 Uji Aktifitas Antioksidan dengan Metode DPPH 28
3.7.1 Uji Aktifitas Antioksidan Larutan Uji Senyawa 1 dan senyawa 2 .28
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN 31
4.1 Uji Pendahuluan 31
4.2 Fraksinasi Ekstrak Metanol 32
4.3 Pemurnian dengan Rekristalisasi dan Uji Kemurnian 36
4.4 Elusidasi Struktur 37
4.4.1 Elusidasi Struktur Senyawa 1 37
4.4.2 Elusidasi Struktur Senyawa 2 41
4.5 Aktifitas Antioksidan Senyawa 1 dan Senyawa 2 47
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN 49
5.1 Kesimpulan 49
5.2 Saran 49
DAFTAR PUSTAKA 51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV 1 33
Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV 2 35
Tabel 4.3 Data pergeseran ^{1}H dan ^{13}C NMR senyawa **1** 38
Tabel 4.4 Perbandingan Parsial Data ^{1}H dan ^{13}C NMR Senyawa **1** dengan Asam icosanat 40
Tabel 4.5 Data korelasi HMBC dan HMQC senyawa **1** 41
Tabel 4.6 Data pergeseran ^{1}H dan ^{13}C NMR senyawa **2** 42
Tabel 4.7 Perbandingan Parsial data ^{1}H dan ^{13}C NMR senyawa **2** 2-metil-2-sikloheksenol 43
Tabel 4.8 Perbandingan Parsial Data ^{1}H dan ^{13}C NMR Senyawa **2** dengan Phytol 44
Tabel 4.9 Data korelasi HMBC dan HMQC senyawa **2** 45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Profil Tumbuhan Kacang kayu 6
Gambar 2.2 Struktur Senyawa Phytol 10
Gambar 2.3 Mekanisme Biosintesis senyawa terpenoid 11
Gambar 2.4 Contoh Asam lemak 13
Gambar 2.5 Jalur Asam Lemak Tak Jenuh 15
Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi DPPH dengan Senyawa Turunan Fenolat 17
Gambar 2.7 Daerah Pergeseran Proton NMR 24
Gambar 2.8 Daerah Pergeseran Karbon NMR 24
Gambar 4.1 Kromatogram hasil uji pendahuluan 31
Gambar 4.2 Kromatogram ekstrak metanol kacang kayu eluen tunggal 32
Gambar 4.3. Kromatogram pemisahan KCV 1 33
Gambar 4.4. Kromatogram fraksi gabungan KCV 1 34
Gambar 4.5 Kromatogram fraksi D 34
Gambar 4.6 Kromatogram fraksi pemisahan KCV 2 35
Gambar 4.7 Kromatogram fraksi gabungan KCV 2 36
Gambar 4.8 Kromatogram Uji 3 eluen senyawa 2 37
Gambar 4.9 Perbandingan struktur senyawa 1 39
Gambar 4.10 HMBC Senyawa 1 40
Gambar 4.11 Struktur Senyawa 1 41
Gambar 4.12 Perbandingan struktur senyawa 2 dengan 2-metil-2-sikloheksenol 44
Gambar 4.13 Perbandingan struktur Senyawa 2 dengan Phytol 45
Gambar 4.14 HMBC Senyawa 2 46
Gambar 4.15 Struktur Senyawa 2 46
Gambar 4.16 Penghambatan antioksidan ekstrak metanol 47
Gambar 4.17 Penghambatan antioksidan senyawa 2 48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema pemisahan dan pemurnian 55
Lampiran 2 Skema pemisahan dan pemurnian senyawa 1 56
Lampiran 3 Skema Kerja Penentuan Aktivitas Antioksidan 57
Lampiran 4 Spektrum IR Senyawa 1 dalam KBr 58
Lampiran 5 Spektrum IR prediksi senyawa 2 dalam KBr 59

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan molekul atau atom yang tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain (Jati, 2008). Radikal bebas yang mengambil elektron dari sel tubuh manusia dapat menyebabkan perubahan struktur DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*), sehingga timbul sel-sel mutan. Bila perubahan DNA ini terjadi bertahun-tahun, maka dapat menyebabkan penyakit kanker. Tubuh manusia dapat menghasilkan antioksidan tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh, maka diperlukan makanan yang dapat menghasilkan antioksidan. Zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas dalam oksidasi lemak adalah antioksidan (Kochar dan Rosell, 1990).

Menurut Pratt dan Hudson (1990), senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya ditemukan sebagai senyawa fenolat atau polifenol yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Senyawa fenolat tersebut bersifat sebagai penangkap radikal bebas dan peredam terbentuknya *singlet* oksigen. Flavonoid bersifat antioksidan karena flavonoid dapat menghambat enzim-enzim oksidatif dan dapat menguatkan dinding-dinding pembuluh darah. Selain itu flavonoid sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas.

Sampai saat ini telah diketahui beberapa senyawa baru hasil isolasi tumbuhan obat dari golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid dan santon yang memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro* dan *in vivo*. Contoh senyawa flavonoid jenis calkon, yaitu 1-(2′-hidroksifenil)-3-fenil-2-propena-1-on dan 1-(2′-

hidroksifenil)-3-(4′-metoksifenil)-2-propena-1-on (Belsare, dkk., 2010), senyawa flavonoid jenis flavanon, yaitu 2′,3′,5′,5,7-pentahidroksi-3,4′-dimetoksiflavon dan 2′,3,5′,5,7-pentahidroksi-4′-metoksiflavon yang positif mempunyai aktivitas antioksidan melalui uji DPPH (Awouafack, 2012).

Di Indonesia salah satu pulau penghasil tumbuhan yang mengandung senyawa terpenoid adalah pulau Poteran-Madura. Pulau Poteran merupakan pulau kecil terluar yang terletak di Pulau Madura. Di Pulau ini terdapat beberapa tumbuhan obat yang produktif. Penelitian ini dilakukan sebagai tindak lanjut dari proyek kerjasama "Sustainable Island Development Initiative" (SIDI) antara ITS, Kementrian Kelautan dan Perikanan (KKP) dan Universitas Wismar, Jerman, tentang pemberdayaan peningkatan sosial dan ekonomi masyarakat di pulau-pulau kecil terluar, melalui pembudidayaan tumbuh-tumbuhan endemik yang berpotensi dikembangkan sebagai produk "supplemen" sehingga tercipta kemandirian pulau-pulau kecil terluar yang pada akhirnya berfungsi menjaga keutuhan wilayah NKRI.

Beberapa tumbuhan yang terdapat di pulau Poteran tersebut diantaranya: Kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), Mimba (*Azadirachta indica*), Cabe Jamu (*Piper retrofactum, Vahl*), Kesambi (*Schleichera aleosa*), Saga (*Adenanthera pavonima*), Waru (*Hibiscus tiliaceus*), Pulai (*Alstonia scholaris*), Kelor (*Moringa oleifera*), Sukun (*Artocarpus altius*), Juwet (*Syzygium cumini*). Pada penelitian ini dipilih tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) yang dimanfaatkan oleh penduduk sekitar sebagai obat gangguan pada kulit, demam, herpes, cacingan, batuk berdahak, luka dan memar.

Pada penelitian ini akan dilakukan penentuan aktivitas senyawa dari tanaman kacang kayu asal Pulau Poteran (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) dari famili *fabacea*. Kacang kayu ini berpotensi mengandung senyawa asam lemak dan terpenoida yang diharapkan dapat berpotensi sebagai antioksidan.

1.2 Perumusan Masalah

Kacang kayu (*Cajanus cajan)* memiliki kandungan metabolit sekunder yang bermacam-macam, penelitian yang pernah dilaporkan mengenai isolasi dari tumbuhana *Cajanus cajan* telah berhasil diisolasi senyawa metabolit sekunder

golongan fenolat. Berdasarkan penelitian tersebut, masih sedikit informasi senyawa golongan asam lemak dan terpenoid yang pernah diisolasi dari *Cajanus cajan* dan dilakukan uji aktivitas antioksidan.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan turunan senyawa asam lemak dan terpenoid dari tumbuhan *C. cajan* (L.) Millsp. dan mengetahui potensinya sebagai antioksidan serta melengkapi data senyawa dan aktivitas antioksidan dari *C. cajan* (L.) Millsp.

1.4 Manfaat Penelitian

Keberhasilan uji antioksidan senyawa asam lemak dan terpenoid yang dihasilkan dari tumbuhan *C. cajan* (L.) Millsp. ini diharapkan dapat memperoleh sumber obat baru yang efektif dan aman, serta meningkatkan peranan penelitian kimiawi tumbuhan dalam mengembangkan bahan-bahan berkhasiat tersebut untuk produk "supplement" biofarmaka sebagai agen antioksidan. Selain itu juga dapat meningkatkan daya guna kacang kayu yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat dan bahan pangan serta dapat meningkatkan perekonomian petani kacang kayu di Pulau Poteran-Madura. Selanjutnya secara bertahap dapat dijadikan model pengembangan dan pemberdayaan pulau-pulau kecil terluar di wilayah NKRI. Disamping itu, dapat pula dikembangkan untuk menjaga keutuhan wilayah nusantara, karena pulau terluar diberdayakan secara terpadu dan berkelanjutan.

“**Halaman ini sengaja dikosongkan**”

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan *Fabacea*

Suku polong-polongan atau *fabacea* merupakan salah satu suku tumbuhan dikotil yang terpenting dan terbesar. Banyak tumbuhan budidaya penting termasuk dalam suku ini, dengan bermacam-macam kegunaan diantaranya : biji, buah (polong), bunga, kulit kayu, batang, daun, umbi, hingga akarnya digunakan manusia. Biasanya digunakan sebagai bahan makanan, minuman, bumbu masak, zat pewarna, pupuk hijau, pakan ternak, bahan pengobatan, hingga racun yang dihasilkan oleh anggota-anggotanya. Semua tumbuhan anggota ini memiliki satu kesamaan yang jelas yaitu buahnya berupa polong. *Fabacea* pernah dikenal dengan nama *leguminosae* serta *papilionaceae*. Nama yang terakhir ini kurang tepat dan sekarang dipakai sebagai salah satu subsukunya. Dalam dunia pertanian, tumbuhan anggota suku ini seringkali disebut sebagai tanaman *legume* (*legume*). Tanaman dari Famili *Fabacea* merupakan famili tumbuhan yang besar, dengan 650 genus dan melebihi 18.000 spesies (Heyne, 1987). Menurut ilmu kemotaksonomi, tumbuhan dalam suku yang sama mengandung senyawa dengan kerangka struktur kimia sama sehingga berpotensi memiliki aktivitas biologis yang sama (Tringali, 2001).

Cajanus merupakan salah satu tumbuhan dari famili *fabaceae*. Terdapat 37 macam spesies *cajanus* yang tersebar di Asia, Afrika dan Australia. Salah satu spesies dari cajanus yang tersebar di Indonesia adalah *Cajanus cajan* dalam bahasa Indonesia dikenal dengan nama kacang kayu. Kacang kayu adalah sejenis tanaman kacang-kacangan yang bersifat tahunan (perennial). Kacang kayu mengandung protein, karbohidrat, lemak, dan vitamin yang cukup tinggi. Bahkan Heyne, (1987) menyebutkan bahwa kandungan proteinnya hingga 22%. Bijinya dapat dimakan dan menjadi sumber pangan alternatif. Selain itu, tanaman kacang kayu mudah sekali tumbuh dan sangat produktif. Tumbuhan ini relatif tahan panas dan kering sehingga cocok sebagai tumbuhan penghijau kawasan kering (Jose, 2009).

Berdasarkan penggunaan secara tradisional oleh masyarakat, tumbuhan ini dapat mengobati berbagai penyakit, di antaranya sakit kuning, demam, sariawan, batuk, diare, sakit perut, cacingan, batuk berdahak, luka, dan memar. Bagian-bagian yang bisa digunakan untuk pengobatan adalah bagian daun, akar, dan biji. Daun berkhasiat untuk mengatasi sakit kuning, sakit di dalam mulut, batuk, dan diare, gangguan perut. Akar berkhasiat untuk mengatasi cacingan, batuk berdahak, dan luka. Sedangkan biji berkhasiat untuk mengatasi memar (Mohanty, *et al*., 2011).

Di Indonesia kacang kayu dikenal dengan nama lain: kacang hiris (Sunda), kacang bali, ritik lias (Sumatera); Kacang kayu, gude, kacang kayu (Jawa), kance (Bugis); Kacang bali, ritik lias (Sumatera); kacang kaju (Madura); Kekace, undis (Bali); lebui, legui, kacang iris, kacang turis; Puwe jai (Halmahera) dan fou hate (Ternate, Tidore) (Rensisca, 2008).

Gambar 2.1 Profil Tumbuhan Kacang Kayu (*Cajanus cajan*)

Dalam perdagangan internasional, kacang gude disebut *pigeon pea* (Inggris), *shu tuo* (China), *kagios*, *kalios, kadios*, *gablas* (Tagalog); *straucherbse* (Jerman), *arhar, red gram, toovar, toor* (India). Tanaman ini diduga berasal dari India, dan telah dibudidayakan paling sedikit sekitar 1.000 tahun sebelum masehi. Kemudian tanaman ini menyebar ke Asia Tenggara, dan Afrika Timur. Sekarang, tanaman gude sudah dibudidayakan dan dimanfaatkan secara luas di kawasan tropis serta sub tropis di seluruh dunia (Pande, *et al*., 2011).

Adapun klasifikasi tanaman kacang kayu sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/ dikotil)
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae / Leguminoaceae (suku polong-polongan)
Genus	: Cajanus
Spesies	: *Cajanus cajan* (L.) Millsp.

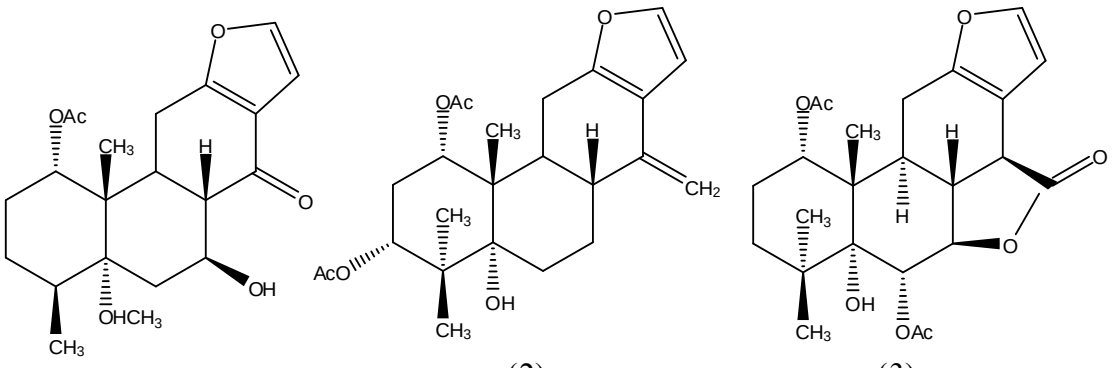
(Heyne, 1987)

2.2 Kandungan Kimia dari family *Fabacea*

Tumbuhan cajanus yang merupakan salah satu famili dari *Fabaceae* dilaporkan kaya kandungan kimia seperti alkaloid, glikosida, karbohidrat, tannin, flavonoid, isoflavon, saponin, sterol, polifenol, triterpenoid dan turunan antrakuinon. T umbuhan famili *Fabaceae* merupakan tumbuhan tingkat tinggi yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder (Wink, 2013).

Metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman ini sangat beragam, dari molekul sederhana sampai molekul yang rumit. Keberagaman metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu tumbuhan menunjukkan adanya tingkat evolusi dari tumbuhan tersebut. Kandungan fenolik dan non-fenolik.

Kelompok terpenoid sebagai metabolit sekunder non-fenolik ditemukan dalam bentuk yang bervariasi misalnya diterpen dan triterpen glikosida (saponin). Diterpen yang telah ditemukan di fabaceae berupa senyawa furanoditerpen tipe cassane. Furanoditerpen merupakan metabolit sekunder yang diketahui aktif sebagai anti malaria yang dominan ditemukan pada genus *caesalpinia*. Misalnya dari *Caesalpino crista* diketahui mengandung norceasalpini E (1), caesalpinin C (2) dan caesalpinin D (3) yang aktif sebagai antimalarial (Linn, *et al.,* 2005).



(1) (2) (3)

2.3 Senyawa yang terdapat pada *C.cajan (L.)* Millsp.

Beberapa senyawa yang ditemukan pada tanaman ini adalah senyawa flavon, calkon, stilben (Ajaiyeoba, *et al*., 2005) steroid dan terpenoid. Senyawa terpenoid yang ditemukan pada tanaman ini antara lain : phytol, α-Pinene, Cyperene, steroid : β-sitosterol, stigmaterol (Toshihiro akihisa, *et. al.,* 1992), golongan asam lemak yaitu : asam stearat, asam palmitat, asam miristat. Asam icosanoid (Xiao Yan-hua, *et. al.*,2008).

2.4. Tinjauan Tentang Senyawa Terpenoid

Senyawa terpenoid berasal dari molekul isoprene CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2 dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan C_5 ini. Kedua senyawa itu dibagi menjadi beberapa golongan berdasarkan jumlah satuan yang terdapat di dalam senyawa tersebut; dua (C_{10}), tiga (C_{15}), empat (C_{20}), enam (C_{30}), atau delapan (C_{40}) satuan. Terpenoid terdiri atas beberapa macam senyawa, mulai dari komponen minyak atsiri, yaitu monoterpenoid dan seskuiterpenoid yang mudah menguap (C_{10} dan C_{15}), diterpena yang lebih sukar menguap (C_{20}), sampai senyawa yang tidak menguap, yaitu triterpenoida dan sterol (C_{30}), serta pigmen karotenoida (C_{40}). (Harborne, JB.1987)

2.4.1. Senyawa Diterpenoid

Senyawa diterpenoid merupakan senyawa yang beraneka ragam yang mempunyai kerangka karbon C_{20} yang berasal dari empat unit isopren. mungkin, satu-satunya diterpenoid yang tersebar di semesta ialah senyawa induk alifatik dari beberapa senyawa tersebut, yaitu fitol, yang terbentuk ester dalam molekul klorofil. Ada tiga kelas diterpenoid : diterpena damar, diterpena racun, dan gliberil (Harborne, 1987)

Diterpena damar**,** meliputi senyawa seperti asam abietat dan asam agatat yang terdapat dalam damar tumbuhan mutakhir dan tumbuhan fosil (Thomas, 1975). Di alam senyawa damar ini berfungsi sebagai pelindung ketika dikeluarkan sebagai eksudat dari kayu pepohonan atau sebagai getah tumbuhan herba. Asam abietat terdapat luas dalam damar gimnospermae, terutama dalam pinus. Berbagai damar 'kopal' pada tumbuhan kacang-kacangan mengandung sederetan diterpena yang berlainan, salah satu contoh adalah asam hardwikat. Sekelompok diterpena racun ialah grayanatoksin, contohnya cgrayanatoksin-1 yang terdapat dalam daun kebanyakan jenis Rhododendron dan Kalmia. Daun tersebut beracun karena adanya senyawa tersebut.

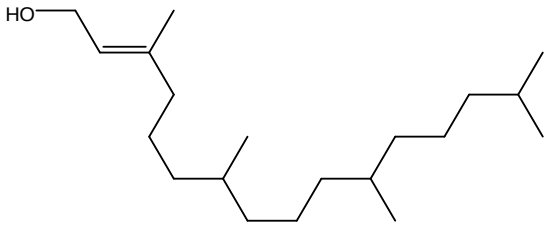
Kelas diterpenoid yang ketiga adalah giberelin, segolongan hormon yang merangsang pertumbuhan secara umum dan diketahui sangat tersebar luas pada tumbuhan. Asam giberalat adalah giberelin paling dikenal, tetapi sebenarnya lebih dari 60 senyawa dalam deret ini sekarang telah dikenal. Secara kimia mereka sangat erat berkaitan, jadi, sukar dipisahkan dan dibedakan. Satu-satunya cara penentuan yang memuaskan adalah KGC-SM. (Harborne, 1987)

Senyawa diterpen mempunyai bioaktifitas yang cukup luas yaitu sebagai hormon pertumbuhan tanaman, podolakton inhibitor pertumbuhan tanaman, antifeedant serangga, inhibitor tumor, senyawa pemanis, anti fouling dan anti karsinogen. Senyawa diterpenoid dapat berbentuk asiklik, bisiklik, trisiklik dan tetrasiklik dan tatanama yang digunakan lebih banyak adalah nama trivial.

Diterpen adalah senyawa bahan alam yang mengandung 20 atom karbon, yang secara luas terdapat dalam tumbuhan damar, yang berasal dari pohon- pohonan. Beberapa senyawa diterpen telah dikenal sejak bertahun-tahun lalu, walaupun baru dipelajari mendalam pada akhir-akhir ini. Beberapa

kelompok dari diterpen di klasifikasi s ecara konve nsional dengan da sar adanya c incin karbon. (Pinder, 1960) Contoh senyawa diterpenoid adalah fitol, asam giberelat, α-kamforena, (-)- kaurena, asam dekstro-pimarat, marubin, asam abietat.

Phytol adalah diterpen alkohol $C_{20}H_{40}O$, yang dikembangkan oleh Willstatter menjadi f ragmen a lkohol da ri molekul-molekul kl orofil da n kebanyakan di isolasi dari tumbuhan jelatang. phytol merupakan alkohol primer tak jenuh mengandung satu ikatan rangkap dan merupakan senyawa alisiklis. Pada ozonolisis akan menghasilkan aldehid glikolat dan keton jenuh $C_{18}H_{36}O$, yang mengandung gugus CH_3CO- (reaksi haloform). Keton ini dapat ditulis $C_{16}H_{33}COCH_3$, dan phytol dapat dituliskan dengan struktur parsial pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Senyawa Phytol

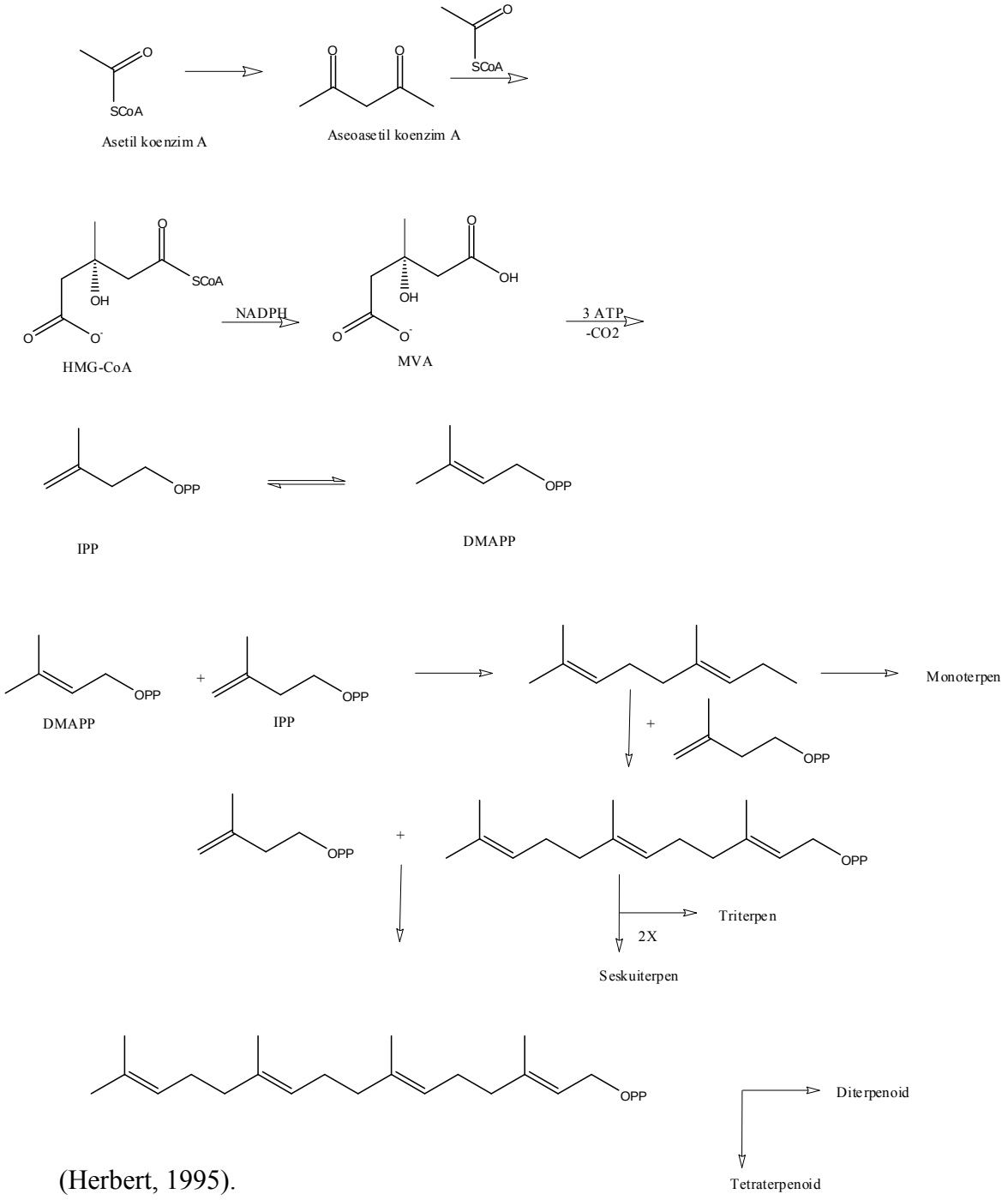
2.5. Biosintesis Senyawa Terpenoid

Secara umum biosintesa dari terpenoid dengan terjadinya tiga reaksi dasar yaitu :

1. Pembentukan 10soprene aktif berasal dari asam asetat melalui asam mevalonat
2. Penggabungan kepala dan ekor dua unit 10soprene akan membentuk mono-, seskui-,di-, sester- dan poli-terpenoid
3. Penggabungan ekor dan ekor dari unit C-15 atau C-20 menghasilkan triterpenoid dan steroid.

Mekanisme dari tahap-tahap reaksi biosintesa terpenoid adalah asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A melakukan kondensasi jenis Claisen menghasilkan asam asetoasetat. Senyawa yang dihasilkan ini dengan asetil koenzim A melakukan kondensasi jenis aldol menghasilkan rantai karbon

bercabang sebagaimana ditemukan pada asam mevalonat. Mekanisme biosintesis senyawa terpenoid ditunjukan pada Gambar 2.3.



(Herbert, 1995).

Gambar 2.3 Mekanisme biosintesis senyawa terpenoid

Reaksi-reaksi berikutnya adalah fosforilasi, eliminasi asam fosfat dan dekarboksilasi menghasilkan Isopentenil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya

berisomerisasi menjadi Dimetil alil pirofosfat (DMAPP) oleh enzim isomerase. IPP sebagai unit Isoprene aktif bergabung secara kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid. Penggabungan ini terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom karbon dari DMAPP yang kekurangan elektron diikuti oleh penyingkiran ion pirofosfat yang menghasilkan Geranil pirofosfat (GPP) yaitu senyawa antara bagi semua senyawa monoterpenoid.

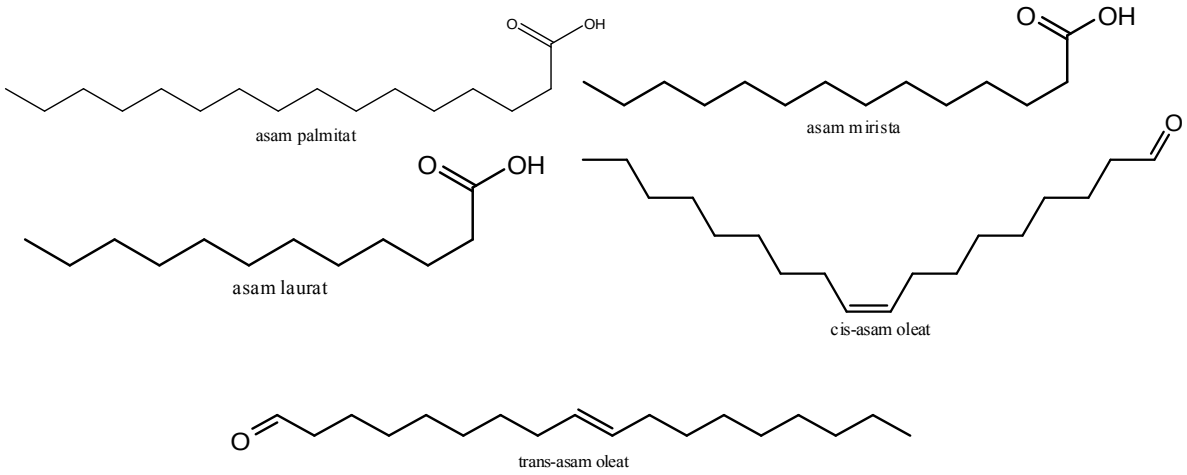
Penggabungan selanjutnya antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama menghasilkan Farnesil pirofosfat (FPP) yang merupakan senyawa antara bagi semua senyawa seskuiterpenoid. senyawa diterpenoid diturunkan dari Geranil-Geranil Pirofosffat (GGPP) yang berasal dari kondensasi antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama.

2.6 Tinjauan Tentang Senyawa Asam Lemak

Asam lemak merupakan asam karboksilat alifatik dengan rantai panjang rantai karbon berbeda dan pada cincin karbon berikatan dengan gugus karboksil COOH. Rumus umum adalah R-$(CH_2)_n$-COOH. Minyak mengandung prosentase asam lemak tak jenuh yang lebih tinggi dibanding lemak. Asam lemak tak jenuh memiliki titik leleh yang sangat rendah jika dibandingkan asam lemak jenuh. Seperti pada asam stearat dan asam oleat yang strukturnya hanya dibedakan oleh satu trigliserida. Semakin banyak ikatan rangkap dalam porsi asam lemak trimester semakin tinggi titik lelehnya. Hal ini dikarenakan ikatan antar molekul asam lemak tidak jenuh kurang kuat, sebab rantai pada ikatan rangkap (cis) tidak lurus. Demikian juga dapat dimengertibahwa asam lemak jenuh mempunyai titik lebur lebih tinggi daripada asam lemak tidak jenuh. Adanya bentuk trans pada asam lemak akan menyebabkan lemak mempunyai titik lebur yang lebih tinggi daripada bentuk cis. Selain titik leleh, tiga titik penting yang menentukan mutu lemak adalah titik asap, titik nyala, dan titik bakar lemak. Ketiga titik ini dipengaruhi oleh jumlah asam lemak bebas. Jika asam lemak bebasnya besar maka ketiga titik turun begitu juga densistasnya (Winarno,1991).

Kandungan asam lemak jenuh yang tinggi juga berpengaruh negatif terhadap mutu minyak goreng yang dihasilkan seperti rendahnya bilangan iod,

titik keruh dan titik pelunakan. Di lain pihak asam lemak tak jenuh tunggal maupun majemuk dinilai sebagai *healthy oil*. Asam lemak menunjukkan molekul memanjang sehingga bersifat polar. Titik leleh asam lemak meningkat sejalan dengan bertambah panjangnya rantai dan menurunnya sejalan dengan peningkatan jumlah rantai rangkap. Asam lemak jarang terdapat bebas di alam, tetapi terdapat sebagai ester dalam gabungan dengan fungsi alkohol. Salah satu contoh asam lemak yang terdapat didalam tanaman adalah asam oleat (Winarno, 1991).



Gambar 2.4 contoh asam lemak

2.6.1 Asam lemak tak jenuh

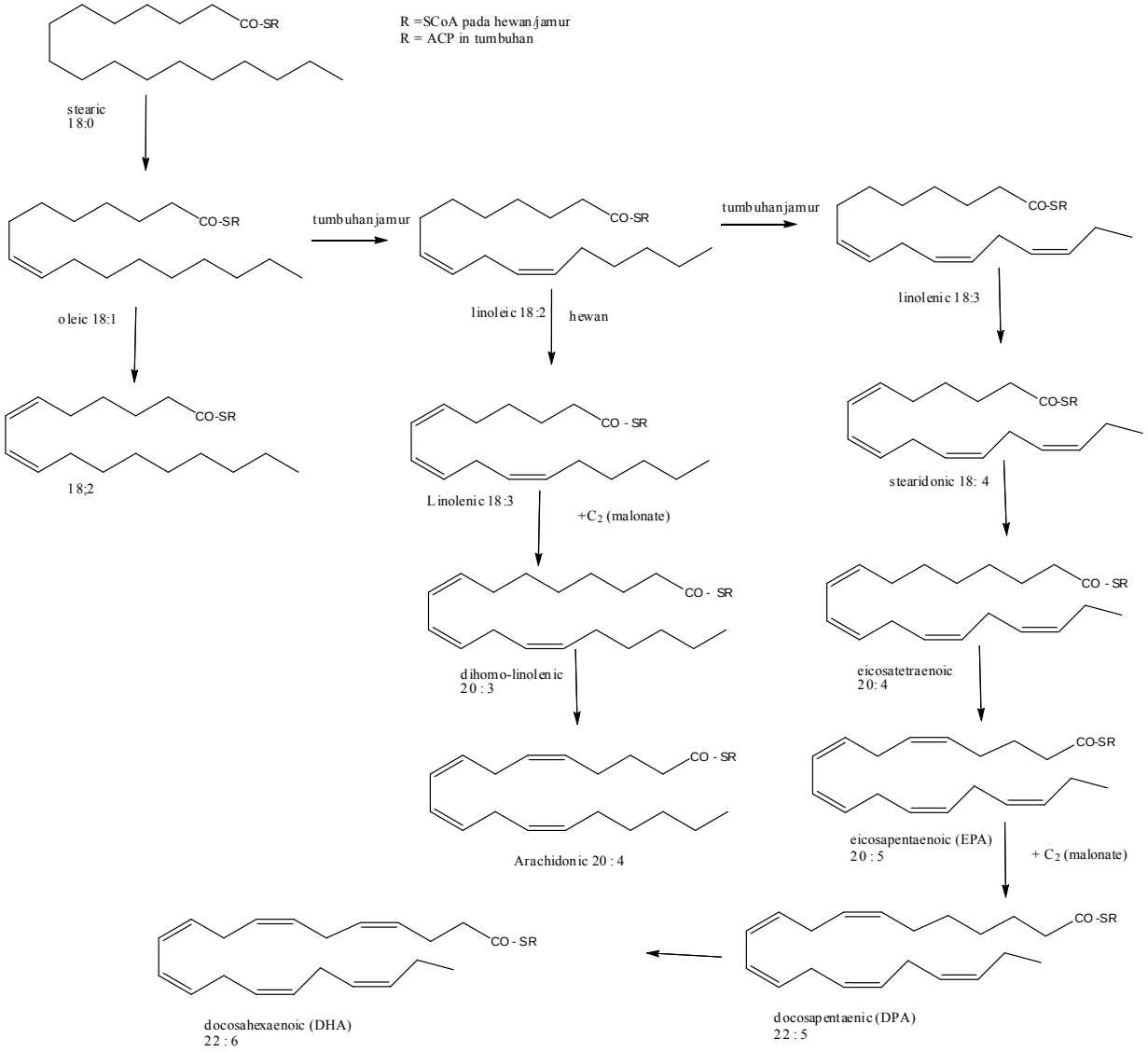
Lemak hewani mengandung proporsi yang tinggi dari gliserida dari asam lemak jenuh dan cenderung padat, sementara bagian dari tanaman dan ikan mengandung ester asam lemak tak jenuh dan cenderung menjadi cairan. Kelompok utama asam lemak ditunjuk ω-3 (omega-3) , ω-6 (omega-6), ω-9 (omega-9), (atau kadang-kadang n-3, n- 6, n-9), jika pada ikatan rangkap pada karbon pada ujung memiliki gugus metil. Pada rantai ini terdapat beberapa nilai yang saling berhubungan antar struktur ketika asam lemak tak jenuh adalah pada biosintesis pada rantai panjang dari ujung karboksil seperti pada biosintesis prostaglandin. Pada umumnya ikatan rangkap pada posisi 9, tetapi ikatan tidak jenuh dapat terjadi pada posisi lain pada rantai. Asam lemak tak jenuh ganda

cenderung memiliki ikatan rangkap obligasi dalam tidak terkonjugasi sebagai terjadi pengulangan pada unit $(CH=CHCH_2)_n$.

Dalam hampir semua kasus, stereokimia ikatan ganda Z (cis), dikenal dengan istilah 'tikungan' ke dalam rantai alkil. Lemak dan minyak merupakan smber energi bagi kebanyakan organisme, tujuan metabolisme oksidatif yang diperlukan. Minyak yang diproduksi secara komersial untuk digunakan sebagai makanan, perlengkapan mandi, obat-obatan, atau formulasi farmasi Palm kernel dan kelapa Minyak keduanya semi- padat yang memiliki konsentrasi tinggi dari rantai C jenuh seperti asam laurat. Karakteristik minyak zaitun yang sangat tinggi asam oleat (18:1), sementara minyak rapeseed memiliki konsentrasi tinggi rantai panjang C_{20} dan C_{22} asam lemak, misalnya Asam erusat (22:1). Ciri-ciri asam lemak dalam minyak ikan memiliki rantai jenuh yang tinggi dan panjang rantai panjang, misalnya *eicosapentaenoic acid* (EPA) (20:5) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) (22:6) dalam minyak ikan cod.

Asam lemak tak jenuh dapat dilakukan lebih dari satu jalur biosintesis (gambar 2.5), tetapi pada kebanyakan organisme yang memiliki mekanisme umum adalah dengan desaturasi yang sesuai Asam alkanoat, dengan desaturasi lanjut dalam langkah-langkah berikutnya. Kebanyakan organisme eukariotik memiliki suatu Δ^9-desaturase yang dikenal dalam ikatan cis ikatan rangkap menjadi asam lemak jenuh, yang membutuhkan O_2 dan NADPH atau NADH kofaktor. Pada mekanisme desaturasi tidak melibatkan intermediet dihidroksilasi pada C-9 atau C-10, dan O_2 adalah sebagai akseptor pada rantai transpor elektron. Sebuah stearoil (C18) Thioester adalah substrat yang biasa memberi turunan oleoil, koenzim ester banyak dimanfaatkan oleh hewan dan enzim jamur, dan ACP ester dengan sistem tanaman.

Posisi dari desaturasi lanjut sangat tergantung pada organisme. Enzim non -mamalia cenderung untuk memperkenalkan ikatan rangkap tambahan antara ikatan rangkap yang ada dan ujung metil, egoleate→ linoleat → α - linolenate . hewan selalu terdapat ikatan rangkap baru terhadap gugus karboksil. Berikut jalur asam lemak tak jenuh (Dewick. M, 2002).



Gambar 2.5 Jalur Asam Lemak Tak Jenuh

2.7 Aktivitas Antioksidan

Radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dapat berasal dari dalam tubuh sendiri (endogen) atau dari luar tubuh (eksogen). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai peristiwa biokimia dalam tubuh, misalnya peristiwa transport elektron, fosforilasi oksidatif, dan proses pembentukan ATP. Secara eksogen, radikal bebas diperoleh dari bermacam-

macam sumber antara lain polutan, makanan dan minuman, radiasi ozon, rokok yang dikonsumsi, polusi udara, dan seterusnya (Rengarajan, et al., 2014).

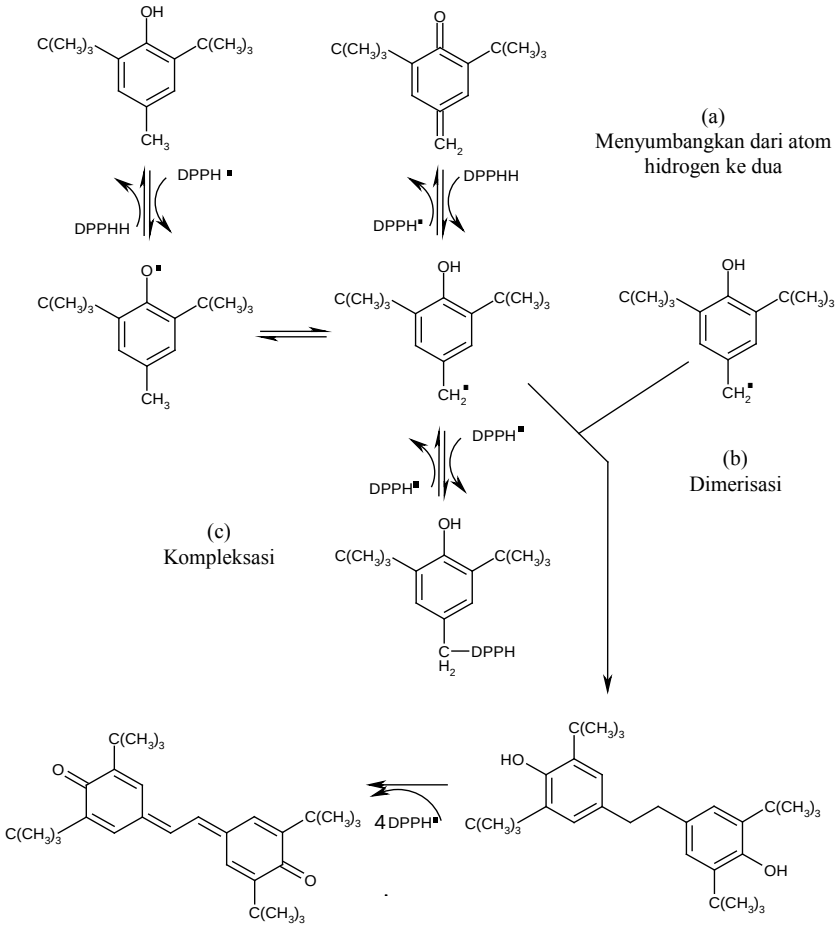
Elektron di dalam tubuh yang tidak berpasangan dari radikal bebas mencari pasangan dengan mengambil elektron dari senyawa lain seperti protein, DNA, membran atau selaput sel, membran liposom, mitokondria, enzim-enzim, lemak, serta komponen jaringan lainnya. Atom dari radikal bebas yang mengambil elektron dari senyawa dalam tubuh membentuk senyawa baru yang tidak normal, dari sinilah timbul penyakit degeneratif. Untuk mencegah akibat peristiwa radikal bebas maka di butuhkan suatu zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas yang dikenal dengan antioksidan (Tapan, 2005).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal dan mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Senyawa ini dapat mengurangi atau menangkap oksidan sebelum oksidan bereaksi dengan target biologis, mencegah terjadinya reaksi berantai, dan mencegah aktivasi oksigen agar tidak terbentuk produk reaktif (Brand-Williams, et al., 1995; Ratnam et al., 2006). Antioksidan merupakan zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Zat ini memperlambat atau menghambat oksidasi zat yang mudah teroksidasi meskipun dalam konsentrasi rendah. Antioksidan juga dapat didefinisikan sebagai senyawa-senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif (Jimenez & Garcia-Carmona, 1999). Tubuh manusia sesungguhnya mempunyai sistem antioksidan yang berupa enzim. Enzim tersebut antara lain yaitu superoksid dismutase, katalase, dan glutation, akan tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dalam jumlah yang berlebih, sehingga diperlukan makanan yang mengandung bahan antioksidan, seperti flavonoid, vitamin A, vitamin C, vitamin E (Jimenez & Garcia-Carmona, 1999; (Li, et al., 2014).

Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan penyakit-penyakit kronis yang dihasilkan akibat radikal bebas. Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan penggunaanya untuk makanan dan penggunaannya telah sering

digunakan, yaitu butil hidroksi anisol (BHA), butil hidroksi toluen (BHT), propil galat, tert-butil hidroksi quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial (Tapan, 2005).

Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat penyakit degeneratif, dan peroksidasi lipid pada makanan. Beberapa tahun terakhir terjadi peningkatan minat untuk mendapatkan antioksidan alami karena adanya kekhawatiran akan timbulnya efek samping terhadap antioksidan sintetik (Kahl, 1984).



(Bondet V, dkk ., 1997)

2.8. Teknik Isolasi, Pemisahan dan Pemurnian Senyawa

Metode isolasi senyawa metabolit sekunder pada penelitian ini, meliputi ekstraksi, pemisahan menggunakan berbagai teknik kromatografi dan pemurnian dengan cara rekristalisasi.

2.8.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat terlarut berdasarkan sifat distribusinya dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Berdasarkan perbedaan kelarutan maka suatu senyawa dapat terpisah secara selektif pada suatu jenis pelarut tertentu yaitu senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar dan sebaliknya senyawa non polar akan larut didalam pelarut non polar atau umumnya dikenal dengan istilah *"like dissolves like"* (Harborne,1996). Berbagai macam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan lain pada tumbuhan yang diekstraksi dan juga pada jenis senyawa yang diisolasi. Terdapat dua cara untuk mendapatkan ekstrak kasar yaitu ekstraksi berkesinambungan dan bertahap, namun yang akan dipakai untuk penelitian ini adalah ekstraksi bertahap yaitu proses ekstraksi dimana pada setiap tahap selalu dipakai pelarut yang berbeda sampai proses selesai (Harborne,1996). Salah satu caranya adalah maserasi.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol paling banyak digunakan untuk proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder (Pavia, *et al.*, 1990).

2.8.2 Pemisahan

Teknik pemisahan dan pemurnian yang sering digunakan adalah teknik kromatografi. Kromatografi merupakan teknik pemisahan fisikokimia yang menggunakan fase diam berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai penyerap atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair. Serbuk yang paling umum digunakan antara lain silika gel, selulosa, dan alumina (Harborne, 1996). Fase gerak dapat berupa segala macam pelarut atau campuran beberapa macam pelarut.

Prinsip kromatografi adalah pemisahan campuran zat-zat kimia berdasarkan pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisahkan pada fase diam di bawah pengaruh pergerakan fase gerak. Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Poole & Salwa, 1991). Berikut ini merupakan penjelasan beberapa jenis kromatografi.

2.8.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisiokimia yang menggunakan fasa diam berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair. Serbuk yang digunakan antara lain silika gel, selulosa, atau alumina. Fase diam sebagai zat penyerap berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada lempeng kromatografi yang berupa plat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Fase diam yang biasa digunakan adalah silika gel. Umumnya silika gel ditambah dengan bahan pengikat untuk memberi kekuatan. Bahan pengikat yang sering digunakan adalah gipsum, maka dikenal dengan istilah silika gel G. Kadang-kadang untuk memudahkan identifikasi ditambahkan zat yang berfluoresensi sehingga disebut silika gel GF-254, selain itu juga bisa digunakan aluminium oksida, kieselgur, selulosa, dan turunannya.

Fasa gerak dapat berupa segala macam pelarut atau campuran beberapa pelarut. Sistem kerja pada KLT yaitu campuran yang akan dipisahkan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan berupa bercak atau noda pada lapisan dekat salah satu ujung. Selanjutnya lapisan dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisi pelarut yang di dalamnya. Bejana tersebut ditutup

pelarut dibiarkan 10-15 cm diatas totolan cuplikan (Gritter, *et al.*, 1991). Pelarut bergerak naik sepanjang lapisan tipis zat padat di atas lempengan, dan bersamaan dengan pergerakan pelarut tersebut, zat terlarut sampel dibawa dengan laju yang tergantung pada kelarutan zat tersebut dalam fasa gerak dan interaksinya dengan zat padat.

Perilaku senyawa di dalam sistem kromatografi dinyatakan dengan harga R_f Selama proses pengembangan noda atau bercak yang telah dikembangkan tersebut akan menunjukkan harga R_f, yang didefinisikan sebagai rasio jarak noda terhadap titik awal dibagi jarak noda terhadap titik awal dibagi jarak eluen terhadap titik awal (Hostettmann, *et al.*, 1995)

2.8.2.2 Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi Cair Vakum merupakan salah satu jenis kromatografi kolom yang menggunakan alat vakum untuk mempercepat laju penurunan masing-masing spot atau noda. Pada sistem KCV, kolom kromatografi dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Sampel diletakkan pada bagian atas kolom dan dihisap perlahan-lahan dan dielusi dengan campuran pelarut yang sesuai. Kolom dihisap sampai kering pada pengumpulan fraksi. Oleh karena itu, kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Hostettmann, *et al.*, 1995). Pada sistem KCV ini, fraksi-fraksi yang ditampung biasanya bervolume lebih besar dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom biasa. Langkah pemisahan menggunakan sistem ini biasanya dilakukan pada tahap awal pemisahan.

2.8.3 Pemurnian

Senyawa bahan alam yang berbentuk padat hasil isolasi dari suatu tanaman sering terkontaminasi oleh pengotor meski kadang-kadang hanya dalam jumlah yang relatif kecil. Teknik umum yang sering digunakan untuk pemurnian senyawa tersebut adalah rekristalisasi yaitu salah satu pemurnian zat padat dari campurannnya dengan cara mangkristalkan kembali zat tersebut setelah dilarutkan dalam pelarut yang cocok. Hal ini didasarkan pada perbedaan kelarutannya dalam

keadaan panas atau dingin dalam suatu pelarut. Pelarut yang digunakan bisa satu macam pelarut atau campuran dua pelarut.

Pemilihan pelarut yang tepat yaitu pelarut harus dapat melarutkan senyawa yang direkristaliasi dalam keadaan panas namun tidak melarutkan dalam keadaan dingin, tidak mudah bereaksi secara kimia dengan campuran yang akan dipisahkan komponen-komponennya, serta memilki titik didih yang lebih rendah dari senyawa yang akan direkristalisasi. Penyaringan dilakukan dalam keadaan panas yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor-pengotor yang tidak larut dalam pelarut. Sedangkan pendinginan berfungsi untuk membentuk kristal-kristal, serta memisahkan kristal dari pengotornya (Singh, *et al.*, 1990). Sistem pasangan pelarut dapat digunakan jika kedua pelarut saling bercampur dan kelarutan zat dalam kedua pelarut perbedaannya relatif besar (Werthelm, 1956).

Untuk menguji tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan penentuan titik leleh, dan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan sedikitnya tiga sistem eluen. Titik leleh merupakan suhu dimana fasa padat dari suatu zat berada dalam kesetimbangan dengan fasa cairnya. Suatu zat dikatakan murni apabila memiliki interval titik leleh ± 1 ^{o}C dan menunjukkan satu noda pada kromatografi lapis tipis (Singh, *et al.*, 1990).

2.9. Metode Spektroskopi

Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada penelitian ini menggunakan metode spektroskopi yang meliputi spektroskopi UV, IR dan NMR.

2.9.1 Spektrofotometer Serapan Ultraviolet dan Sinar Tampak (UV-Vis)

Spektrofotometer ultraviolet merupakan teknik analisis spektroskopi yang terjadi karena eksitasi molekul dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi setelah mengabsorbsi sinar tampak (Anderson, *et al.*, 2004). Spektrum UV-Vis juga disebut spektrum elektronik, karena terjadi sebagai hasil interaksi cahaya UV-Vis terhadap molekul tersebut mengalami transisi elektronik (Field, *et al.*, 2007).

Spektrum yang dihasilkan oleh radiasi (cahaya) dengan panjang gelombang 400-800 nm disebut sinar tampak sedangkan spektrum pada panjang

gelombang 200-400 nm disebut spektrum ultraviolet. Setiap eksitasi elektron dapat memberikan informasi yang berbeda mengenai ikatan dalam sebuah molekul. Dalam senyawa organik, eksitasi elektron yang paling penting adalah $\pi \rightarrow \pi^*$, pada λmaks 210–280 nm yang mengindikasikan adanya gugus kromofor yang berkonjugasi (C=C–C=C), sedangkan eksitasi elektron $n \rightarrow \pi^*$, pada λmaks 320–400 nm memberikan informasi mengenai adanya gugus heteroatom terkonjugasi, misalnya gugus karbonil yang tersubtitusi pada suatu ena (C=C–C=O).

Spektroskopi serapan ultraviolet dan tampak dapat digunakan untuk membantu mengidentifikasi jenis flavonoid dan menentukan pola oksigenasi. Kedudukan gugus hidroksi fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan penambahan pereaksi geser.

2.9.2 Spektrofotometer Inframerah (IR)

Analisis senyawa dengan menggunakan spektrofotometri inframerah didasarkan pada vibrasi dari gugus fungsional dari suatu senyawa. Radiasi IR yang digunakan untuk analisis instrumental adalah radiasi IR yang rentang bilangan gelombangnya antara 4000-670 cm^{-1}. Radiasi pada rentang 4000 hingga 1600 cm^{-1} disebut daerah gugus fungsi, sedangkan radiasi pada rentang antara 1600-670 cm^{-1} disebut daerah sidik jari (Anderson, *et al.*, 2004).

Radiasi yang diserap oleh molekul seperti –OH dan –NH terdapat pada daerah 3000–3700 cm^{-1}, C–C aromatik terdapat pada daerah 1450–1600 cm^{-1}, C=O pada daerah 1705–1750 cm^{-1}, C–H aromatik menghasilkan puncak pada gelombang 3000–3100 cm^{-1} disertai dengan keluarnya *overtone* pada panjang gelombang 2000–1650 cm^{-1} (Anderson, *et al.*, 2004).

Pengukuran spektrofotometer ini untuk mengenal struktur molekul antara lain C-C, C-O, C-N, C=C, C=O, C=N, N=O. Molekul yang menyerap radiasi inframerah menyebabkan amplitudo getaran atom-atom yang terikat sehingga molekul berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi. Keadaan vibrasi dari ikatan terjadi pada keadaan tetap tingkat-tingkat energinya. Panjang gelombang dari absorbsi oleh suatu tipe ikatan tertentu bergantung pada macam getaran dari ikatan tersebut. Oleh sebab itu tipe ikatan berbeda-beda menunjukkan penyerapan

radiasi inframerah pada panjang gelombang dengan karakteristik yang berbeda-beda pula. Daerah antara 1400-4000 cm^{-1} merupakan bagian kiri spektrum inframerah adalah daerah khusus untuk mengidentifikasi gugus fungsional. Bagian kanan spektrum inframerah seringkali yang dikenal dengan daerah sidik jari (Silverstein, *et al.*, 2005).

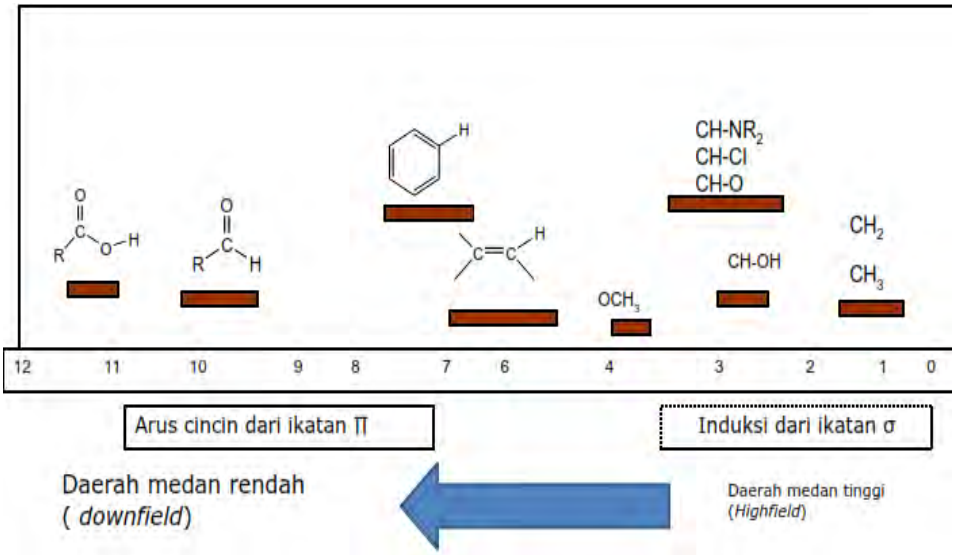
2.9.3 Spektroskopi NMR

Spektroskopi NMR didasarkan pada absorbsi radiasi elektromagnetik pada wilayah radio oleh inti-inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul ini berada dalam medan magnet yang kuat. Senyawa yang dipilih untuk titik rujukan adalah tetrametilsilana (TMS), $(CH_3)_4Si$ yang proton-protonnya menyerap pada ujung kanan dalam spektrum NMR. Absorpsi kebanyakan proton lain dijumpai di bawah medan absorpsi TMS (Anderson, *et al.*, 2004).

Dalam praktek, TMS ditambahkan langsung pada contoh dan *peak* TMS bersama dengan *peak-peak* absorpsi dari senyawa contoh diperoleh dalam spektrum. Selisih antara posisi absorpsi TMS dan posisi absorbsi suatu proton tertentu disebut geseran kimia *(chemical shift).*

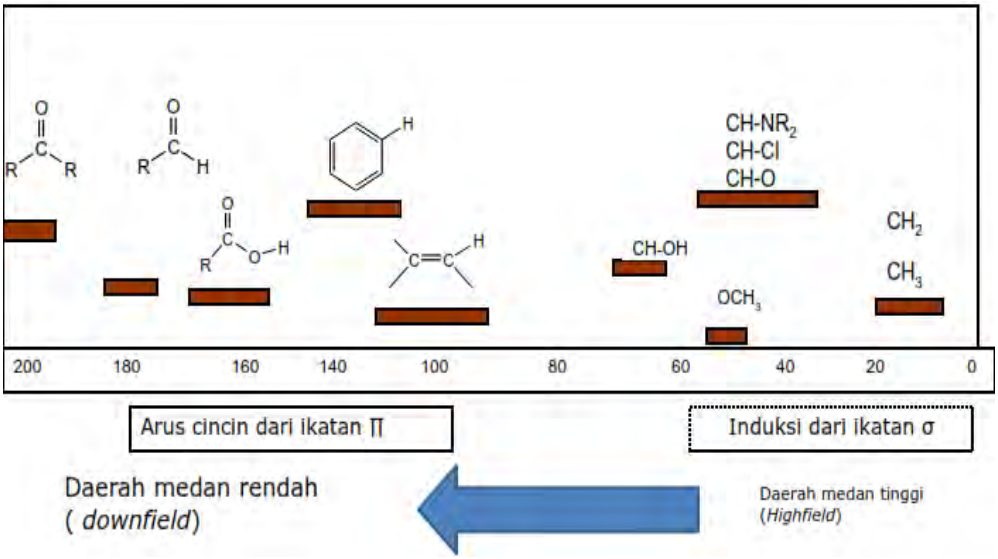
Berdasarkan prinsip penggunaannya terdapat dua macam NMR yaitu NMR proton atau ^{1}H-NMR dan NMR karbon atau ^{13}C-NMR. Spektroskopi proton memberikan informasi struktural mengenai atom-atom hidogen dalam sebuah molekul organik. Spektroskopi ^{13}C–NMR menghasilkan informasi mengenai karbon-karbon dalam sebuah molekul organik. Pada spektroskopi NMR proton, suatu proton dengan lingkungan tertentu memiliki pergeseran kimia yang tertentu pula. Harga pergeseran kimia proton-proton senyawa organik terjadi pada daerah 0-15 ppm. Spektroskopi NMR karbon juga memberikan spektrum posisi absorbsi karbon berdasarkan jenis ikatan yang menyusun senyawa tersebut, sehingga setiap atom karbon berlainan yang akan memberikan sinyal. Resonansi untuk ^{13}C–NMR berada di daerah 0-200 ppm. Spektroskopi resonansi magnetik nuklir (NMR) memberikan gambaran mengenai jenis atom, jumlah, maupun lingkungan atom hidrogen (^{1}H NMR) maupun karbon (^{13}C NMR) (Silverstein, *et al.* 2005).

Daerah geseran kimia proton bernilai antara 0 – 12 ppm, berikut daerah geseran kimia yang penting untuk beberapa proton:



Gambar 2.7 Daerah Pergeseran kimia proton pada NMR

Daerah geseran kimia proton bernilai antara 0 – 200 ppm, berikut daerah geseran kimia yang penting untuk beberapa jenis karbon.



Gambar 2.8 Gambar Pergeseran kimia karbon pada NMR

(Silverstein, *et al.* 2005)

BAB 3
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat gelas (gelas beker, gelas ukur, gelas vial kecil, gelas vial besar, erlenmeyer, labu bundar, labu ukur, dan corong kaca), bejana maserasi, chamber KLT, kaca arloji, pipet tetes, pipet kapiler, pinset, spatula, cawan porselen, cawan petri, *hot plate*, penyaring Buchner, pompa vakum, *rotary vacuum evaporator*, neraca analitik, timbangan digital, seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV), seperangkat alat kromatografi kolom grafitasi (KKG), seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), plat tetes, pipa kapiler, *Fisher John Melting Point Apparatus*, botol semprot, *microplate*, inkubator, vortex, mikropipet, spektrofotometer UV, spektrofotometer IR, lampu UV 254 dan 366 nm, dan spektrometer ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR.

3.1.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan untuk isolasi senyawa terdiri dari tumbuhan *Cajanus cajan* (L.) Millsp., pelarut organik seperti *n*-heksana, metilen klorida, kloroform, etil asetat, aseton, metanol, akuades, etanol, kapas steril, aluminium foil, kertas saring Whatman 40, silika gel 60 (35-70 mesh) untuk kromatografi kolom, plat silika gel Merck 60 F_{254} 0,25 mm ukuran 20 x 20 cm dengan aluminium sebagai fasa diam, plat silika gel Merck 60 F_{254} 0,5 ukuran 20 x 20 cm dengan kaca sebagai penyangga fasa diam, pereaksi penampak noda serium sulfat, larutan $FeCl_3$ 1% dalam metanol dan DPPH 0.004%.

3.2. Pengumpulan Tumbuhan

Tumbuhan kacang kayu dari pulau Poteran, Madura dikumpulkan seluruh bagian tumbuhan mulai dari daun, batang, dan akar. Semua bagian dibersihkan, dikeringkan, kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus.

3.3. Persiapan Bahan

Tumbuhan *C. cajan* (L.) Millsp. yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini berasal dari Pulau Poteran, Madura. Sebanyak 2,25 kg aerial part kacang kayu yang telah kering digiling hingga menjadi serbuk halus dan siap untuk diekstraksi. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi dilakukan dengan menyiapkan 5 vial masing-masing diisi 5 ml pelarut (*n*-heksana, metilen klorida, kloroform, etil asetat, dan metanol) sebanyak 2 g serbuk halus dimasukkan ke dalam masing-masing vial 10 ml kemudian didiamkan selama 1 x 24 jam. Masing-masing ekstrak dimonitoring dengan KLT dan disemprot dengan reagen penampak noda serium sulfat.

3.4. Isolasi dan Identifikasi

3.4.1. Isolasi Senyawa

3.4.1.1. Maserasi

Serbuk halus tumbuhan *C. cajan* (L.) Millsp. (2,25 kg) dimaserasi dengan metanol selama 3x24 jam agar semua senyawa dapat terekstrak sempurna. Ekstrak metanol kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*.

3.4.1.2. Fraksinasi Fraksi Metanol

Pada ekstrak metanol *C. cajan* (L.) Millsp dilakukan uji pendahuluan pelarut dengan plat KLT menggunakan eluen tunggal dari pelarut non polar hingga pelarut polar. Tujuan dari perlakuan ini adalah untuk menentukan eluen yang tepat untuk proses fraksinasi. Ekstrak metanol pekat (2x40 gram) difraksinasi dengan KCV menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat yang

ditingkatkan kepolarannya (5-100%). Metode ini dilakukan secara bergantian menggunakan kolom yang sama. Pengelompokan fraksi dilakukan pada fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan nilai R_f dan pola noda sama pada monitoring KLT, sehingga menghasilkan 10 fraksi gabungan (A-J). Fraksinasi dilakukan lebih lanjut terhadap fraksi D. Pada saat dilarutkan dengan metanol pada fraksi D terbentuk endapan putih pada dasar vial kemudian disaring dan direkristalisasi menghasilkan padatan putih (30 mg), padatan ini dimurnikan dengan rekristalisasi. Kemudian dilakukan uji KLT tiga eluen yang berbeda kepolaran dan pengukuran titik leleh untuk mengetahui kemurniannya menghasilkan padatan putih (30 mg) disebut senyawa **1**.

Fraksi D difraksinasi lebih lanjut terhadap filtrat dari fraksi D dengan kromatografi cair vakum dengan eluen *n*-heksana:etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (2-15%) menghasilkan 12 fraksi gabungan (D_1-D_{12}). Selanjutnya endapan yang terdapat pada dasar vial fraksi D_3 disaring lalu dimurnikan dengan rekristalisasi yang menghasilkan padatan putih. Padatan ini dimurnikan dengan rekristalisasi, lalu dilakukan uji KLT tiga eluen yang berbeda kepolarannya dan pengukuran titik leleh untuk mengetahui kemurnian menghasilkan padatan putih (15 mg) disebut senyawa **2**.

3.5. Uji Titik leleh dan Kelarutan

Uji kemurnian meliputi uji KLT tiga eluen dan pengukuran titik leleh. Uji KLT tiga eluen dilakukan dengan memonitoring masing-masing kristal menggunakan tiga eluen yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Eluen yang digunakan untuk senyawa **1** adalah metilen klorida:petroleum eter (1:9), etil asetat: *n*-heksana (3%), dan metilen:klorida (5%), dan uji KLT 2 dimensi menggunakan eluen etil asetat: *n*-heksana (3%). Sedangkan untuk senyawa **2** eluen yang digunakan adalah metilen klorida:*n*-heksana (1:9), etil asetat: *n*-heksana (3%), dan metanol:kloroform (1:9). Senyawa diidentifikasi sebagai senyawa murni jika profil noda yang dihasilkan berupa noda tunggal pada plat KLT terhadap campuran eluen tersebut.

Titik leleh senyawa murni dilakukan dengan meletakkan butiran kecil senyawa pada lempengan kaca tipis (*object glass*) kemudian diletakkan pada alat

pengukur t itik leleh *Fisher John Melting Point*. Suhu pada alat dinaikkan perlahan-lahan sambil mengamati perubahan fisis yang terjadi pada senyawa. Indikator senyawa murni adalah memiliki titik leleh ± 1.

Kelarutan sampel murni dilakukan dengan melarutkan kristal sampel dalam berbagai pelarut (*n*-heksana, diklorometana, kloroform, etil asetat, metanol) kemudian diamati kelarutannya.

3.6. Penentuan Struktur

3.6.1. Spektroskopi IR

Analisa spektroskopi IR dilakukan dengan menggunakan peralatan spektrofotometer FT/IR. Sampel murni (± 1mg) digerus sampai homogen dengan KBr, kemudian dipadatkan sehingga menjadi pelet dengan menggunakan alat pembuat pelet. Pelet sampel diletakkan di dalam tempat sampel (*sample cell*) pada alat kemudian diukur serapannya pada bilangan gelombang 800-4000 cm^{-1}.

3.6.2. Spektroskopi ^{1}H NMR

Analisa spektrum ^{1}H-NMR dilakukan dengan menggunakan spektrometer ^{1}H-NMR 500 MHz. Sampel murni (± 10 m g) dilarutkan dalam aseton d_6 kemudian dimasukkan dalam tabung sampel (*sample tube*) dan diletakan dalam tabung pada alat, pergeseran kimia diukur pada 0-15 ppm. Ekspansi dilakukan pada bagian-bagian spektrum yang diperlukan untuk mengetahui secara detail pergeseran kimianya. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada analisis ^{13}C-NMR dengan pergeseran kimia diukur pada 0-220 ppm.

3.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

3.7.1. Uji aktivitas antioksidan larutan uji senyawa 1 dan senyawa 2

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas penangkapan radikal DPPH secara kuantitatif adalah metode yang dilakukan oleh Brand Williams yang dimodifikasi sedikit oleh Dudonn'e, dkk. (Brand-Williams, dkk., 1995)

(Dudonn'e, S., dkk., 2009). Langkah pertama, pembuatan larutan DPPH radikal 6 × 10^{-5} M dilakukan dengan melarutkan 1.182 mg DPPH kedalam 50 mL metanol. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan melarutkan 10 mg sampel ke dalam 1 mL metanol. Larutan uji dipipet 33.33 μL dan dimasukkan ke dalam tube yang terlindung dari cahaya, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH. Campuran larutan tersebut divortex mixer selama 10 detik untuk menghomogenkan. Selanjutnya, larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selama proses reduksi oleh antioksidan, larutan DPPH radikal akan berubah warna dari ungu menjadi kuning pucat. Penurunan absorbansi ini diukur pada spektrofotometer UV pada panjang gelombang 515 nm (As). Larutan blanko yang digunakan terdiri dari 33.33 μL metanol dalam 1 mL DPPH yang diukur pada panjang gelombang yg sama (Ab). Asam askorbat digunakan sebagai control positif. Perlakuan pada uji DPPH ini dilakukan dengan dua kali pengulangan (*duplo*). Aktivitas penghambatan radikal dapat dihitung dengan menggunakan rumus di bawah ini

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \left[\frac{Ab - As}{Ab}\right] \times 100$$

Ab : absorbansi blanko

As : absorbansi senyawa uji

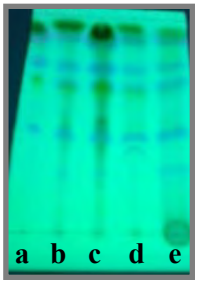
Setelah diperoleh persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, persamaan y = Ax + B ditentukan dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi (µg/mL) dan y adalah persentase inhibisi. Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibisi Concentration* 50% yaitu konsentrasi larutan uji yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan

Keberhasilan suatu proses ekstraksi dan pemisahan senyawa bahan alam ditentukan dengan uji pendahuluan pada setiap perlakuan. Pengujian bahan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan kacang kayu dan menentukan pelarut yang sesuai untuk proses maserasi. Maserasi dilakukan dengan pelarut tunggal yaitu *n*-Heksana, kloroform, metil klorida, etil asetat dan metanol masing-masing 20 ml selama 24 jam. Hasil ekstrak dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan eluen chloroform : metanol (9:1), dideteksi dibawah lampu UV kemudian disemprot dengan larutan penampak noda serium sulfat 15% dalam H_2SO_4 dan dipanaskan dalam oven, hasil analisis kromatogramnya ditunjukkan pada Gambar 4.1.



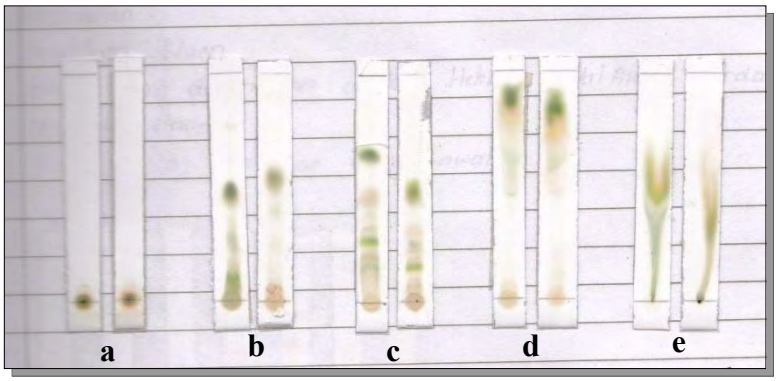
Keterangan:
a. Ekstrak *n*-heksana
b. Ekstrak metilen klorida
c. Ekstrak kloroform
d. Ekstrak etil asetat
e. Ekstrak metanol

Gambar 4.1 Kromatogram hasil uji pendahuluan dielusi dengan metanol:kloroform (1:9)

Dari hasil analisa kromatogram KLT menunjukan bahwa metabolit sekunder baik terdapat pada pelarut metanol. Pelarut metanol memperlihatkan kemampuan mengekstrak komponen lebih baik dibandingkan pelarut lain, maka metanol digunakan sebagai pelarut. Kromatogram pada Gambar 4.1 memperlihatkan bahwa pelarut metanol dapat mengekstrak senyawa yang ada pada sampel secara maksimal. Metanol merupakan pelarut universal yang baik untuk ekstraksi semua

golongan senyawa metabolit sekunder. Pada penelitian ini dipilih metode maserasi karena memiliki beberapa kelebihan diantaranya adalah mudah digunakan, waktu yang efisien, sampel yang digunakan bisa dalam jumlah yang besar dan tidak terjadi dekomposisi senyawa-senyawa target karena dilakukan pada suhu kamar. Ekstrak pekat hasil maserasi yang diperoleh sebanyak ekstrak pekat 345 gram dari serbuk sampel 2.25 kg. Randemen ekstrak kasar yang diperoleh sebesar 15,33 %.

Performa KLT dari hasil uji pendahuluan terhadap ekstrak metanol dengan eluen tunggal yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda (Gambar 4.2) menunjukkan bahwa pada eluen *n*-heksana relatif tidak ada senyawa yang terbawa adsorben plat KLT. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang ada pada ekstrak metanol tidak larut dalam *n*-heksana. Sementara dengan eluen etil asetat memperlihatkan bahwa distribusi senyawa yang merata dimana hampir semua senyawa dalam ekstrak metanol tersebut terelusi oleh etil asetat. Dengan dasar ini dapat dilakukan pemilihan eluen untuk proses fraksinasi terhadap ekstrak metanol. Hal ini dilakukan karena kolom yang digunakan adalah silika gel yang bersifat polar. Eluen yang baik untuk proses fraksinasi selanjutnya adalah campuran eluen etil asetat dan *n*-heksana. Pada kromatografi kolom, hal yang paling berperan dalam keberhasilan pemisahan diantaranya adalah pemilihan adsorben dan eluen.



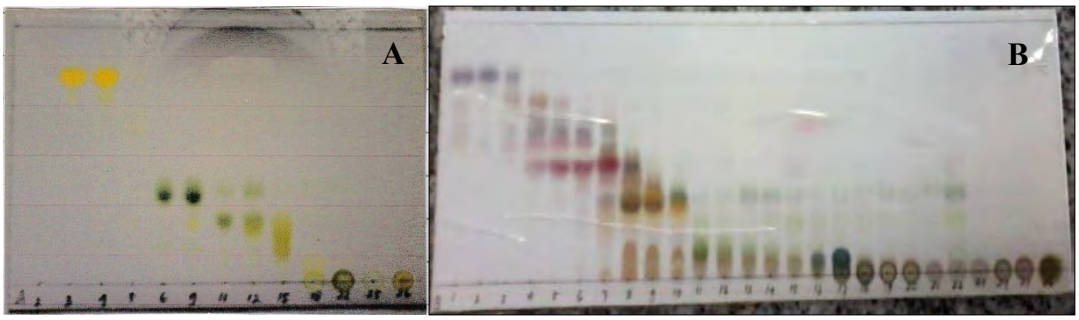
Keterangan eluen:
a. *n*-heksana
b. metilen klorida
c. kloroform
d. etil asetat
e. metanol

Gambar 4.2 Kromatogram ekstrak metanol kacang kayu dengan eluen tunggal

4.2 Fraksinasi Ekstrak metanol

Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan eluen *n*-heksana-etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (5-100%) dimana perlakuan elusi ada pengulangan terhadap sampel ekstrak metanol. Penggunaan

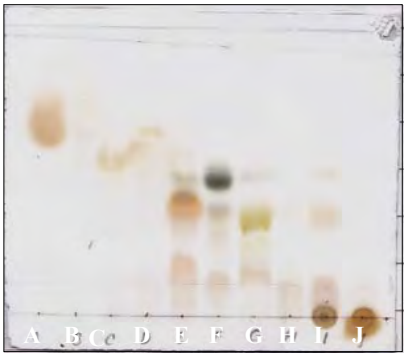
dua kali sampel ini bertujuan untuk memperbanyak massa fraksi yang diperoleh. Pada kromatografi cair vakum, kolom dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kerapatan adsorben yang maksimum. Hasil fraksinasi ditampung dalam botol vial dan dimonitoring dengan plat KLT yang ditunjukkan pada Gambar 4.3. Pengelompokan fraksi dilakukan dengan dasar nilai R_f yang sama pada KLT dan diperoleh 10 fraksi gabungan seperti pada Tabel 4.1 sedangkan performa KLT fraksi gabungan ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.3. Kromatogram pemisahan KCV 1 dielusi dengan etil asetat:*n*-heksana (1:3)

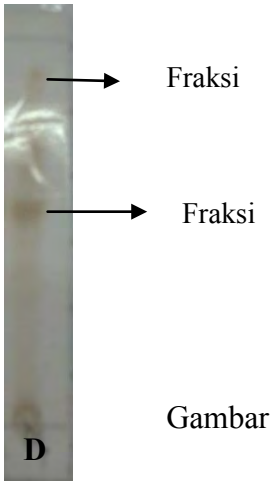
Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV 1

Fraksi Gabungan	No. Vial	Massa (gram)
A	1_A-2_A	0,24
B	3_A-4_A ; 1_B-3_B	3,46
C	5_A	0,46
D	4_B-7_B	4,67
E	6_A; 8_B-10_B	6,12
F	7_A-12_A	5,96
G	13_A-15_A; 11_B-15_B	5,78
H	16_B-17_B	6,21
I	16_A-24_A; 18_B-26_B	9,17
J	25_A-26_A; 13_B-26_B	40,97



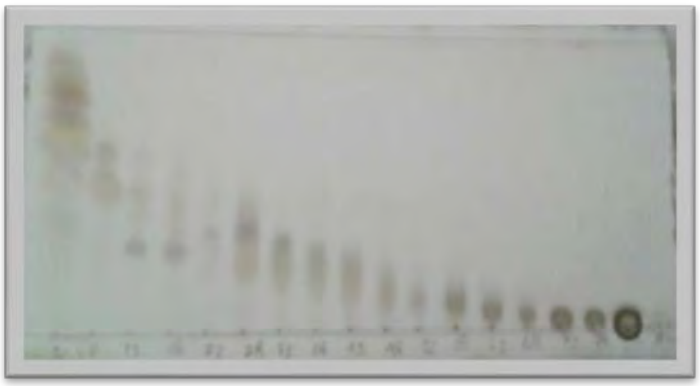
Gambar 4.4. Kromatogram fraksi gabungan pemisahan KCV 1 yang dielusi dengan etil asetat:*n*-heksana (1:3)

Berdasarkan hasil kromatogram fraksi gabungan tersebut dapat dilihat proses pemisahan senyawa pada ekstrak metanol. Pada fraksi A merupakan kelompok fraksi yang terdiri dari senyawa-senyawa yang paling non polar. Fraksi yang terdiri dari senyawa yang non polar lain ditunjukkan pada fraksi B, C dan D. Sementara fraksi E, F, G, dan H, senyawa-senyawa yang terkandung terdistribusi secara merata. Fraksi I dan J terdiri dari beberapa senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang tinggi. Kromatogram fraksi gabungan memperlihatkan profil noda berwarna ungu yang intens pada fraksi **D**, sehingga pada fraksi **D** ini diperkirakan terdapat senyawa target terpenoid yang cukup banyak. Pada saat dilakukan pelarutan fraksi **D** ini terbentuk endapan putih. Endapan ini ditampung lalu dikeringkan lalu diuji monitoring KLT. Hasil monitoring KLT menunjukkan noda tunggal. Lalu direkristalisasi sehingga diperoleh padatan putih (30 mg) disebut sebagai senyawa **1**. selanjutnya filtrat fraksi **D** dilakukan fraksinasi lanjut.



Gambar 4.5 Kromatogram fraksi D

Fraksi D (4,67 g) difraksinasi lebih lanjut dengan metode kromatografi cair vacum (KCV) dan dielusi dengan *n*-heksana:etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya (2-15%). Hasil fraksinasi ditampung dalam botol vial dan dimonitoring dengan plat KLT. Noda dideteksi dengan lampu UV kemudian disemprot dengan penampak noda serium sulfat yang memperlihatkan kromatogram seperti pada Gambar 4.6.

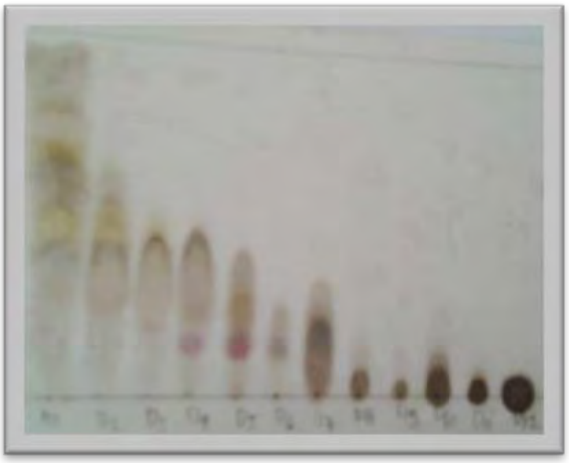


Gambar 4.6 Kromatogram pemisahan KCV 2 yang dielusi dengan etil asetat : *n*-heksana (1:9)

Fraksi-fraksi yang memiliki kemiripan Rf dan pola noda yang sama pada monitoring KLT tersebut digabung sehingga didapatkan 12 fraksi gabungan yang disajikan pada Tabel 4.2. hasil monitoring kedua belas fraksi gabungan dapat diliat pada Gambar 4.7.

Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi hasil pemisahan KCV 2

Fraksi Gabungan	No. Vial	Massa (miligram)
D_1	1-3	120
D_2	5-6	470
D_3	7-8	320
D_4	9-11	120
D_5	12-19	40
D_6	20-22	10
D_7	23-45	260
D_8	46-53	80
D_9	54-56	10
D_{10}	57-70	110
D_{11}	71-80	90
D_{12}	81-85	180



Gambar 4.7. kromatogram fraksi gabungan KCV 2 dielusi dengan etil asetat : *n*-heksana (1:9)

Pada fraksi D_3 setelah beberapa hari dibiarkan dalam suhu ruang terbentuk endapan putih pada dasar vial, endapan kemudian disaring vakum sambil dicuci dengan pelarut metanol sehingga diperoleh padatan putih disebut sebagai senyawa **2** (15 mg). padatan tersebut larut baik dalam pelarut *n*-heksana, metilen klorida dan kloroform. Kurang larut pada etil asetat, sementara dalam metanol tidak larut.

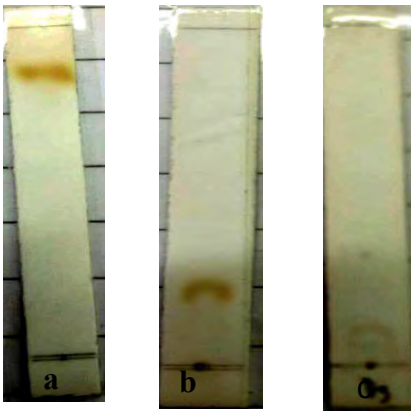
4.3 Pemurnian dengan rekristalisasi dan Uji kemurnian

Senyawa bahan alam yang berbentuk padat hasil isolasi dari suatu tanaman sering terkontaminasi oleh pengotor meski kadang-kadang hanya dalam jumlah yang relatif kecil. Teknik umum yang sering digunakan untuk pemurnian senyawa tersebut adalah rekristalisasi yang didasarkan pada perbedaan kelarutannya dalam keadaan panas atau dingin dalam suatu pelarut. Berdasarkan uji kelarutan pada senyawa **1**, proses rekristalisasi menggunakan metilen klorida dan metanol. Kristal diletakkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam metilen klorida sampai semua terlarut, kemudian dipanaskan dan langsung disaring dalam keadaan panas untuk memisahkan pengotor yang tidak larut. Setelah itu ditambahkan tetes demi tetes pelarut yang tidak melarutkan yaitu metanol sampai terjadi perubahan warna menjadi keruh. Perubahan keadaan ini menandakan bahwa larutan ini sudah dalam keadaan tepat jenuh atau telah mencapai kesetimbangannya. Kemudian erlenmeyer ditutup rapat agar pelarut tidak

menguap dan didinginkan. Pada keadaan tepat jenuh kelarutan suatu zat akan berkurang sehingga mudah terbentuk padatan. padatan yang diperoleh berbentuk jarum berwarna putih dengan massa 30 mg.

Senyawa **2** yang direkristalisasi menggunakan campuran pelarut metilen klorida dan metanol. Kristal yang diperoleh sebagai padatan berwarna putih dengan massa 15 mg. Masing-masing kristal hasil rekristalisasi tersebut diuji kemurniannya dengan uji titik leleh dan uji tiga eluen dengan eluen yang berbeda yang terlihat pada hasil KLT pada Gambar 4.8.

Titik leleh merupakan suhu dimana fasa padat dari suatu zat berada dalam kesetimbangan dengan fasa cairnya. Parameter untuk menunjukkan kemurnian zat dengan prinsip pengaruh pengotor terhadap rentang titik leleh adalah ± 1 ^{o}C. Senyawa **1** memiliki rentang titik leleh sebesar 74-75 ^{o}C sedangkan senyawa **2** memiliki rentang titik leleh sebesar 137-138 ^{o}C.



Gambar 4.8 Kromatogram uji tiga eluen senyawa **2**, menggunakan eluen : a. metanol;kloroform (1:9), b. etil asetat:*n*-heksana (1:19), c. metilen klorida:*n*-heksana (3:22).

4.4. Elusidasi Struktur

4.4.1. Elusidasi struktur senyawa 1

Senyawa **1** diperoleh sebagai padatan jarum berwarna putih dengan titik leleh 74-75 ^{o}C. Spektrofotometer Inframerah juga mendukung keberadaan terpen dengan terdapatnya serapan untuk beberapa gugus fungsi. Adanya gugus hidroksi pada 3413.77 cm^{-1}, serapan pada daerah 2848,67; 2916,17 da n 2954.74 cm^{-1}

menunjukkan sistem CH sp^3 alifatik dan serapan pada 1735,81 dan 1708,81 cm^{-1} menunjukkan adanya karbonil (C=O).

Data pergeseran (δ) ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR merupakan data penting untuk menentukan struktur hasil isolasi karena dari data tersebut dapat diketahui jenis, lingkungan dan integrasi (jumlah) proton maupun karbon. Pengukuran NMR dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform ($CDCl_3$), Senyawa **1** dengan frekuensi 400 MHz.

Tabel 4.3 Data pergeseran ^{1}H dan ^{13}C NMR senyawa 1

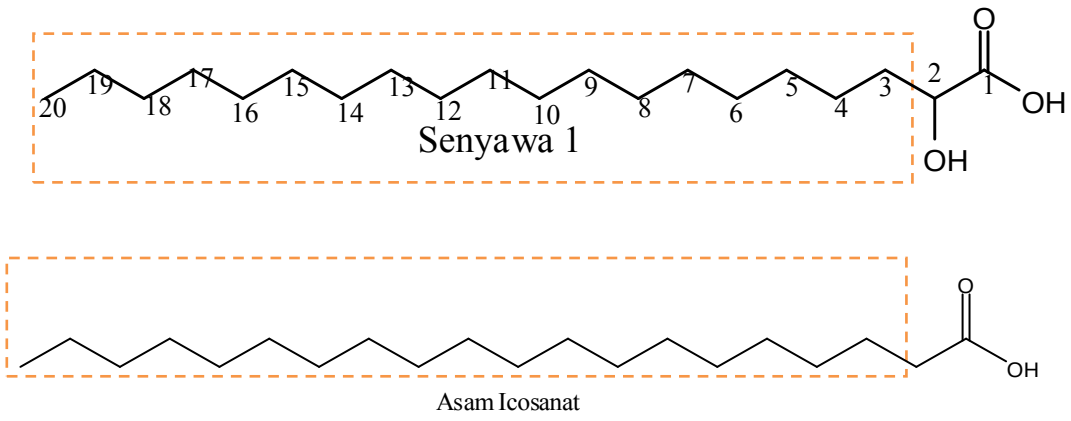
Karbon Posisi	**^{13}C-NMR**	**^{1}H-NMR**
1	180	
2	63,2	3,63 (1 H, *t*)
3	32,8	2,33 (2H, *m*)
4	31,9	1,55 (2H, *m*)
5	22,7-31,9	1,23 (32 H, br *s*)
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20	14,2	0,87 (3H, *t*)

Dari data pergeseran (δ) ^{1}H-NMR senyawa **1** dapat memberi informasi adanya 40 jenis proton, sedangkan data pergeseran (δ) ^{13}C-NMR senyawa hasil isolasi dapat diketahui informasi adanya 20 jenis karbon. Hasil analisa yang disajikan pada Tabel 4.3 terhadap senyawa **1**. Berdasarkan spektrum NMR membuktikan bahwa senyawa 1 adalah turunan asam lemak. Karakteristik senyawa ini adalah adanya sinyal proton pada pergeseran sinyal 1 proton metilen (CH_2) pada pergeseran δ_H 1,5 ppm (3H, *m)* juga teramati pada senyawa ini. Satu sinyal proton pada pergeseran δ_H 0,87 ppm (3H, *t*). Sinyal singlet dengan puncak

tinggi pada pergeseran δ_H 1,23 ppm (32H, *s*) yang membentuk konstanta kopling yang besar mengindikasikan adanya struktur rantai panjang senyawa **1** merupakan ciri khas dari rantai asam lemak.

Spektrum ^{13}C-NMR senyawa **1** memperlihatkan adanya sinyal karbonil pada δ_C 178 ppm, 18 sinyal metilen ditunjukan pada δ_C 31,9 ppm dan 22,7-29,8 ppm dan sinyal 1 metil terdapat pada pergeseran δ_C 14,2 ppm. Sekelompok sinyal pada pergeseran kimia yang khas dan sesuai ikatan rantai panjang yang terletak pada pergeran δ_H 1,23 ppm (32H, *s*) merupakan ciri khas dari asam lemak. Pada C_1 terikat dengan gugus hidroksi (OH) pada pergeseran δ_C 1,56 (2H,*m*). Sinyal karbon singlet pada 178,2 ppm menunjukkan daerah khas karbonil yang dapat memperkuat data IR pada bilangan gelombang 1735,81 cm^{-1}. Berdasarkan data-data tersebut, maka dihipotesis bahwa senyawa **1** memiliki kerangka dasar asam lemak.

Data ^{1}H dan ^{13}C-NMR yang diperoleh pada senyawa **1** memiliki kemiripan dengan data senyawa asam icosanat yang ditemukan dari tanaman *Debregeasia orientalis* (XIAO Yan-hua, *et. al.*,2008) yang ditunjukan pada Gambar 4.9 dan Tabel 4.4.



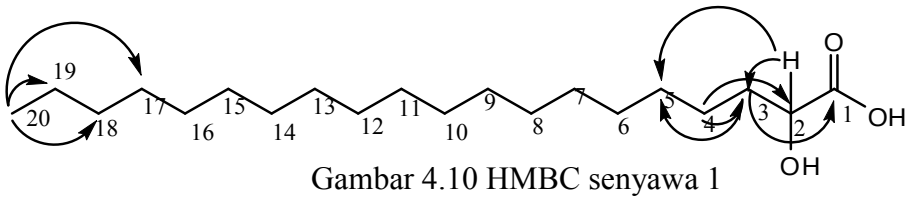
Gambar 4.9 Perbandingan struktur senyawa 1 dengan Asam icosanat

(Xiao Yan-hua, *et. al*., 2008)

Tabel 4.4 Perbandingan parsial data ^{1}H dan ^{13}C NMR senyawa 1 dengan Asam icosanat (Xiao Yan-hua, *et. al*., 2008)

Karbon Posisi	^{13}C-NMR		^{1}H-NMR	
	Senyawa 1	Asam icosanat	Senyawa 1	Asam Icosanat
1	180			
2	63,2		3,63 (1 H, *t*)	
3	32,8	33,7	2,33 (2H, *m*)	2,36 (2H, *t*)
4	31,9	31,9	1,55 (2H, *m*)	1,65 (2H, *m*)
5	22,7-31,9	29,1-29,7	1,23 (32 H, br *s*)	1,26-1,32 (32 H, *s*)
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18		24,7		
19		22,7		
20	14,2	14,2	0,87 (3H, *t*)	

Subtituen pada rantai panjang senyawa 1 diduga sama dengan subtituen yang ada pada asam Icosanat. Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan analisis lebih lanjut pengukuran NMR dua dimensi yaitu HMBC dan HMQC. Korelasi HMBC untuk mengetahui korelasi jarak jauh antara proton dan karbon tetangga sedangkan pengukuran korelasi HMQC digunakan untuk mengetahui korelasi dari pergeseran kimia karbon dengan pergeseran kimia proton, yang menunjukkan dimana posisi proton tersebut terikat langsung pada karbon. Berdasarkan data HMBC diperoleh korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon-karbon tetangga sebagaimana dalam Tabel 4.5 dan Gambar 4.10.

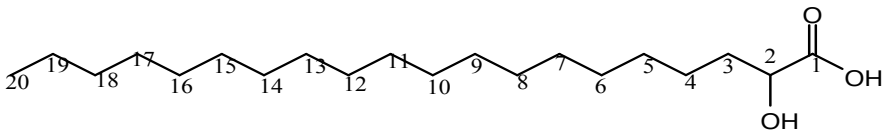


Gambar 4.10 HMBC senyawa 1

Tabel 4.5 Data korelasi HMBC dan HMQC Senyawa 1

Karbon Posisi	^{13}C-NMR		^{1}H (δ_H ppm)	Korelasi HMBC
	(HMQC)	DEPT		
1				
2	63,2	CH	3,63 (1 H, *t*)	32,8 ; 25,7
3	32,8	CH_2	2,33 (2H, *m*)	25,7 ; 180
4	31,9	CH_2	1,55 (2H, *m*)	32,8 ; 63,2
5	22,7-31,9	CH_2	1,23 (32 H, br *s*)	14,1 ; 22,7 ; 25,7 ; 29,0 ; 29,2 ; 29,7 ; 31,9 ; 32,8
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20	14,2	CH_3	0,87 (3H, *t*)	22,7 ; 31,9 ; 25,7

Hal ini juga sesuai dengan korelasi HMQC bahwa terdapat 39 proton yang terikat langsung dengan karbon dari kerangka asam lemak senyawa 1. Berdasarkan data korelasi HMBC dan HMQC yang diperoleh, maka struktur senyawa 1 adalah 2-Hidroksi asam icosanat, dengan struktur ditunjukkan pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Struktur senyawa 1 (2-Hidroksi asam icosanat)

4.4.2. Elusidasi Struktur Senyawa 2

Prediksi senyawa **2** diperoleh sebagai padatan berwarna putih dengan titik leleh 137-138 ^{o}C. Spektrofotometer Inframerah terdapatnya serapan untuk

beberapa gugus fungsi. Adanya gugus hidroksi pada 3326,98 cm^{-1}, serapan pada daerah 2850,59; 2871,81; 2918,10 dan 2945,10 cm^{-1} menunjukkan sistem CH sp^3 alifatik, serapan pada daerah 1380,94 dan 1463,87 98 cm^{-1} menunjukkan sistam C Alken (C = C).

Data pergeseran (δ) ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR merupakan data penting untuk menentukan struktur hasil isolasi karena dari data tersebut dapat diketahui jenis, lingkungan dan integrasi (jumlah) proton maupun karbon. Pengukuran NMR dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform ($CDCl_3$), Senyawa 2 dengan frekuensi 400 MHz.

Dari data pergeseran (δ) ^{1}H-NMR prediksi senyawa 2 yang terdapat pada Tabel 4.6 dapat memberi informasi adanya 42 jumlah proton, sedangkan data pergeseran (δ) ^{13}C-NMR senyawa hasil isolasi dapat diketahui informasi adanya 22 jumlah karbon terdapat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Data pergeseran ^{1}H dan ^{13}C NMR prediksi senyawa 2

Karbon Posisi	**^{13}C-NMR**	**^{1}H-NMR**
1	79,1	3,20
2	27,2	1,66
3	145,2	-
4	121,7	5,16
5	37,2	1,23
6	23,6	1,85
1’	18,4	1,66
2’	34,8	1,37
3’	37,2	1,23
4’	27,5	1,57
5’	37,2	1,23
6’	29,9	1,23
7’	29,9	1,23
8’	27,5	1,57
9’	37,2	1,23
10’	34,8	1,23
11’	29,9	1,23
12’	27,5	1,57
13’	15,6	0,80
14’	15,6	0,80
15’	23,6	0,85
16’	15,6	0,93

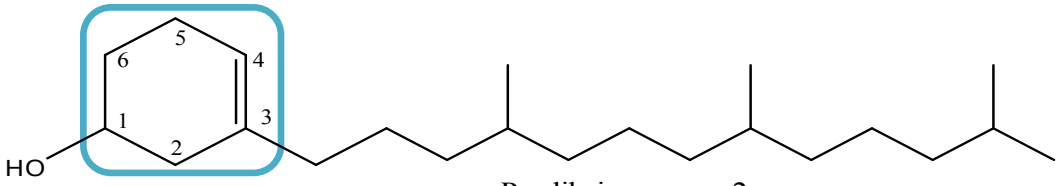
Hasil analisa yang disajikan pada untuk senyawa 2. Berdasarkan spektrum NMR karakteristik senyawa ini adalah adanya sinyal proton pada pergeseran δ_H 0,80; 0,85 dan 0,93 ppm adanya gugus metil (3H, *m*). Terdapat sinyal δ_H 1,85; 1,66; 1,37 dan 1,23 ppm (2H, *m*) adanya gugus metilen. Pada pergeseran δ_H 5,16; 3,20 dan 1,57 ppm (1H, *d*) merupakan gugus metin.

Spektrum ^{13}C-NMR Prediksi Senyawa **2** yang memperlihatkan adanya 4 sinyal metil yang terdapat pada pergeseran δ_C 15,6 dan 23,6 ppm. Adanya 12 sinyal metilen yang terdapat pada pergeseran δ_C 18,4; 23,6; 27,2; 29,9; 34,8 dan 37,2 ppm. Adanya 4 sinyal metin pada pergeseran δ_C 121,7 ; 79,1 dan 27,5 ppm. Sinyal metil pada pergeseran δ_C 79,1 ppm sinyal karbon ini juga berikatan dengan gugus hidroksi (OH). Sinyal hidroksi ini yang memperkuat data serapan IR pada panjang gelombang 3326,98 cm^{-1}.

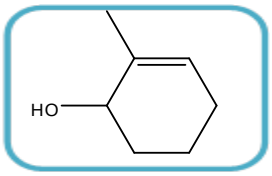
Data ^{1}H dan ^{13}C NMR yang diperoleh pada prediksi senyawa **2** memiliki kemiripan dengan data senyawa 2-metil-3-sikloheksenol (Y. Senda, *et. al.,* 1974) yang ditunjukkan oleh Gambar 4.12 dan Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Perbandingan parsial data ^{1}H dan ^{13}C NMR prediksi senyawa **2** dengan 2-metil-2-sikloheksenol (Y. Senda, *et. al.,* 1974)

Karbon Posisi	**^{13}C-NMR**		**^{1}H-NMR**	
	Senyawa 2	**2-meti-2-sikloheksenol**	**Senyawa 2**	**2-meti-2-sikloheksenol**
1	79,1	71,5	3,20	4,12
2	121,7	124,1	5,16	5,47
3	145,2	136,6	-	-
4	27,2	34,9	1,66	1,75
5	37,2	43,6	1,23	
6	23,6	27,1	1,66	



Prediksi senyawa 2



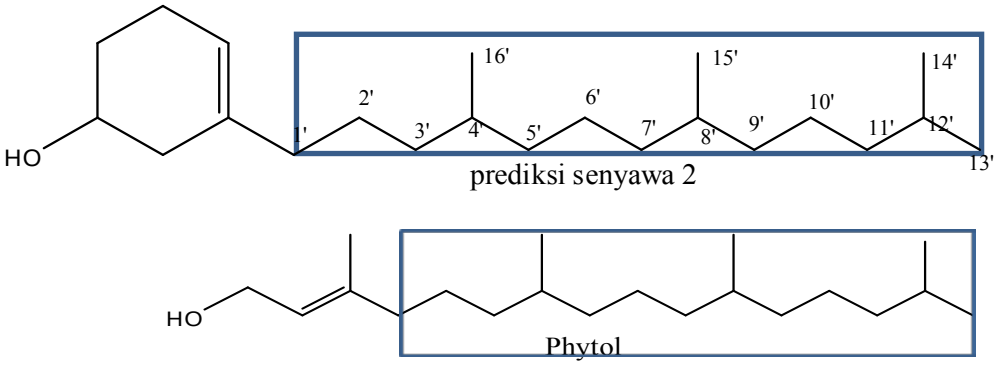
2-metil-2-sikloheksenol

Gambar 4. 12 Perbandingan struktur prediksi senyawa **2** dengan 2-metil-2-sikloheksenol (Y. Senda, *et. al.*, 1974)

Data ^{1}H dan ^{13}C-NMR yang diperoleh pada prediksi senyawa 2 memiliki kemiripan pada senyawa phytol (Gunawan, *et. al.*, 2013) yang ditunjukkan oleh Gambar 4.13 dan Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Perbandingan parsial data ^{1}H dan ^{13}C NMR prediksi senyawa **2** dengan Phytol (Gunawan, *et. al.*, 2013)

Karbon Posisi	**^{13}C-NMR**		**^{1}H-NMR**	
	Senyawa 2	**Phytol**	**Senyawa 2**	**Phytol**
1'	18,4	39,8	1,66	1,97
2'	34,8	25,1	1,37	1,36
3'	37,2	37,4	1,23	1,24
4'	27,5	32,6	1,57	1,35
5'	37,2	37,4	1,23	1,23
6'	29,9	24,4	1,23	1,29
7'	29,9	37,4	1,23	1,23
8'	27,5	32,7	1,57	1,35
9'	37,2	37,2	1,23	1,23
10'	34,8	24,8	1,23	1,25
11'	29,9	39,3	1,23	1,11
12'	27,5	27,9	1,57	1,50
13'	15,6	22,6	0,80	0,84
14'	15,6	22,6	0,80	0.84
15'	23,6	19,7	0,85	0,83
16'	15,6	19,7	0,93	0,82



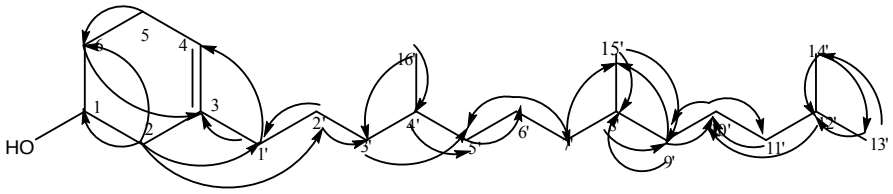
Gambar 4. 13 Perbandingan struktur prediksi senyawa **2** dengan Phytol (Gunawan, *et. al*., 2013)

Tabel 4.9 Data korelasi HMBC dan HMQC prediksi senyawa **2**

Karbon Posisi	**^{13}C-NMR**		**^{1}H (δ_H ppm)**	**Korelasi HMBC**
	(HMQC)	**DEPT**		
1	79,1	CH	3,20	
2	27,2	CH_2	1,66	79,1; 18,4; 34,8
3	145,2	C	-	
4	121,7	CH	5,16	
5	37,2	CH_2	1,23	23,6
6	23,6	CH_2	1,85	121,7; 145,2
1'	18,4	CH_2	1,66	145,2; 121,7
2'	34,8	CH_2	1,37	
3'	37,2	CH_2	1,23	34,8; 37,2
4'	27,5	CH	1,57	37,2
5'	37,2	CH_2	1,23	29,9
6'	29,9	CH_2	1,23	37,2; 29,9
7'	29,9	CH_2	1,23	37,2; 29,9
8'	27,5	CH	1,57	37,6
9'	37,2	CH_2	1,23	37,2; 34,8; 29,9
10'	34,8	CH_2	1,23	37,2; 34,8; 29,9
11'	29,9	CH_2	1,23	37,2; 34,8; 29,9
12'	27,5	CH	1,57	34,8
13'	15,6	CH_3	0,80	15,6; 27,5
14'	15,6	CH_3	0,80	15,6; 27,5
15'	23,6	CH_3	0,85	37,6; 27,5
16'	15,6	CH_3	0,93	37,2; 27,5

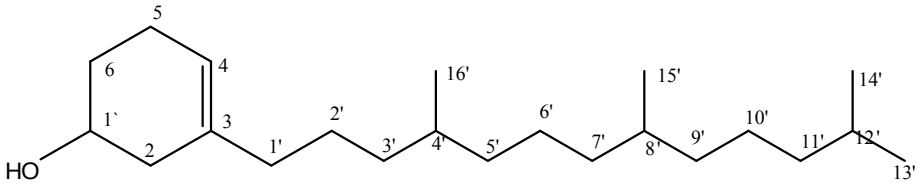
Substituen rantai panjang prediksi senyawa 2 diduga sama dengan substituent yang ada pada terpen. Untuk membuktikan hal tersebut, maka dilakukan analisis lebih lanjut pengukuran NMR dua dimensi yaitu HMBC dan HMQC yang ditunjukkan pada tabel 4.9.

Korelasi HMBC untuk mengetahui korelasi jarak jauh antara proton dan karbon tetangga sedangkan pengukuran korelasi HMQC digunakan untuk mengetahui korelasi dari pergeseran kimia karbon dengan pergeseran kimia proton, yang menunjukkan dimana posisi proton tersebut terikat langsung pada karbon. Berdasarkan data HMBC diperoleh korelasi jarak jauh antara proton dengan karbon-karbon tetangga sebagaimana dalam Tabel 4.9 dan Gambar 4.14.



Gambar 4.14 HMBC prediksi senyawa **2**

Hal ini juga sesuai dengan korelasi HMQC bahwa terdapat 42 proton yang terikat langsung dengan karbon dari kerangka prediksi senyawa **2**. Berdasarkan data korelasi HMBC dan HMQC yang yang diperoleh, maka prediksi senyawa **2** adalah : 3-(4',8',12'- trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol struktur pada Gambar 4.15.



3-(4',8',12'-trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol

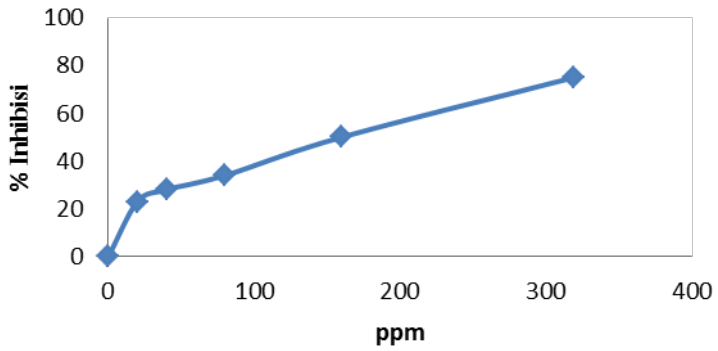
Gambar 4.15 Prediksi senyawa **2**

4.5 Aktivitas Antioksidan senyawa 1 dan senyawa 2

Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada penelitian ini adalah metode radikal bebas 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH). Pada proses pengujian, zat uji akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH sehingga DPPH tereduksi menjadi senyawa bukan radikal yaitu 1,1-difenil-2-pikril-hidrazin yang stabil. Hal tersebut ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat atau tidak berwarna (Molyneux, 2004).

Aktivitas antioksidan sampel diukur melalui pengukuran intensitas serapan dari s etiap sampel setelah ditambahkan DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang tertentu. Berdasarkan hal tersebut, sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan terlebih dahulu penentuan panjang gelombang maksimum larutan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil. Hasil percobaan menunjukkan serapan maksimum DPPH 515 nm. Hal ini menunjukkan bahwa pengukuran serapan atas seluruh larutan uji terhadap radikal bebas DPPH dilakukan pada panjang gelombang tersebut.

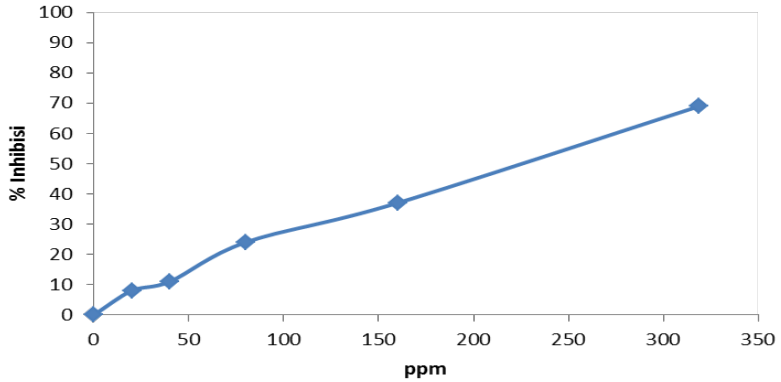
Secara kuantitatif, kemampuan suatu senyawa dalam radikal DPPH ditunjukkan dengan penurunan absorbansi larutan uji yang dihitung terhadap larutan blanko. Semakin kecil nilai absorbansinya maka semakin kuat senyawa tersebut dalam radikal DPPH. Pada penelitian ini dilakukan uji terhadap ekstrak metanol, senyawa **1** dan senyawa **2**. Hasil uji DPPH pada ekstrak metanol menunjukkan data absorbansi terhadap DPPH dengan variasi konsentrasi yang diperoleh kemudian dihitung persen inhibisinya.



Gambar 4.16 Aktivitas Penghambatan DPPH Ekstrak metanol *C. cajan*

Persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi yang diperoleh dari persamaan y = Ax + B diperoleh nilai IC_{50} ekstrak metanol kacang kayu 140,28 µg/mL seperti pada Gambar 4.16. Hal ini menunjukan ekstrak metanol memiliki aktivitas yang lemah.

Senyawa **1** diketahui memiliki data absorbansi pada konsentrasi 319 µg/mL terdapat selisih nilai absorbansi besar dan mendekati nilai absorbansi blanko. Nilai % inhibisi senyawa **1** pada larutan dengan konsentrasi 319 µg/mL rendah, yang menunjukkan senyawa tersebut tidak aktif sebagai antioksidan.



Gambar 4.17 Aktivitas Penghambatan DPPH senyawa **2**

Pada senyawa **2** persentase inhibisi dari persamaan y = Ax + B diperoleh nilai IC_{50} = 223,32 µg/mL seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.17. Hal ini menunjukan ekstrak metanol memiliki aktivitas yang lemah.

Ekstrak metanol *C. cajan* dari Pulau Poteran memiliki aktivitas penghambatan DPPH IC_{50} 140,28 µg/mL, sedangkan ekstrak etanol *C. cajan* dari Hainan Cina (Nan Wu, *et. al*., 2009) memiliki IC_{50} 242,01 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan antioksidan dari Pulau Poteran lebih baik dibandingkan dengan penghambatan antioksidan dari Hainan Cina.

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Ekstrak metanol tumbuhan kacang kayu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) dari Pulau Poteran-Madura menghasilkan senyawa asam lemak yaitu 2-Hidroksi asam icosan**,** senyawa diterpen yaitu 3-(4',8',12'- trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol. Hasil pengujian antioksidan menggunakan radikal 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) yang telah dilakukan diketahui bahwa aktivitas antioksidan 3-(4',8',12'-trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol **(**IC_{50} 271,53 μg/mL) lemah, sedangkan pada 3,5,7,11,15-Pentametil hexa-2-en-1-ol aktivitas antioksidannya tidak aktif, karena nilai absorbansi yaitu 2-Hidroksi asam icosan tidak jauh berbeda dengan absorbansi blanko. Aktivitas antioksidan 3-(4',8',12'- trimetiltridesil) sikloheksena-1-ol tersebut bersifat lemah bila dibandingkan dengan asam trolox dengan IC_{50} 39,4 μg/mL.

5.2. Saran

Dari penelitian ini masih terdapat beberapa komponen potensial yang berpeluang untuk didapatkan senyawa-senyawa metabolit sekunder dari fraksi-fraksi (F-J) yang belum dilanjutkan.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Ajaiyeoba, E.O., Ogbole, O.O., Abiodun, O.O., Ashidi, J.S., Houghton, P.J., Wright, C.W. (2005). In vitro antiplasmodial and Cytotoxicity Activities of 6 Plants from the Southwest Nigerian Ethnomedicine. *J Nat Rem* **5(1),** 1-6.

Anderson, R. J., Bendell, D., & Groundwater, P. (2004). *Organic Spectroscopic Analysis.* Sunderland: The Royal Society of Chemistry.

Awouafack Maurice D, Tane Pierre dan Eloff Jacobus N. (2012). Two new antioxidant flavones from the twigs of Eriosema robustum *(Fabaceae)*. *Journal of Phytochemical Society of Europe.* In Press.

Asish K Battachaya and Kalpesh Bumar C Rana. (2013). *Antimycobacterial agent, (E)- Phytol andLauric Amide from Plant Canggascea mollis*. India Journal Of Chemistry.

Belsare, D. P.,Pal, S. C.,Kazi, A. A.,Kankate, R. S danVanjari, S. S. (2010). Evaluation of Antioxidant Activity of Chalcones and Flavonoids. *International Journal of ChemTech Research* Vol.2, No.2, pp 1080-1089.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E. dan Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activit, *Lebensmittel-Wissenschaftund Technologie/Food Science and Technology*, 28:25-30.

Bondet V., Brand-Williams W dan Berset C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method*, Academic Press Limited.*

Dewick, M., (2002), *Medicinal Natural Products, Second Edition*, John Wiley & Sons. School of Pharmaceutical Sciences University of Nottingham.

Field, L. D., Sternhell, S., & Kalman, J. (2007). *Organic Structures from Spectra Fourth Edition.* New york: John Wiley and Sons Ltd.

Gritter, R. J., Bobbitt, J., & Schwarting, A. (1991). *Pengantar Kromatografi (Terjemahan Kosasih Padmawinata).* Bandung: Penerbit ITB.

Gunawan, Cordeno Arlene, Arnamy Paano. (2013*). Structure elucidation of two new phytol derivatives, A new phenolic compound and other metabolites of Avverhoa Bilimbi*. Presented at the research congress 2013. De la sale University Manila.

Harborne, J. B. (1996). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung: ITB.

Harborner,J.B dan Simmonds,N.W. (1964). *The natural distribution of the phenolic agrycones. In biochemistry of phenolic compounds*. (Harbone,J.B., ed), pp, 77-128. London : Academic Press.

Herbert, R.B., (1995), *Biosynthesis of Secondary Metabolites, 2nd edition*, Chapman and Hall, New York

Heyne, K. (1987). Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan 1387–1388.

Hostettmann, K., Hostettmann, M., & Marston, A. (1995). *Cara Kromatografi Preparatif. Penggunaan Pada Isolasi Senyawa Alam. Penerjemah: Kosasih Padmawinata.* Bandung: Penerbit ITB.

Jati, S.H. (2008). *Efek Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Daun Salam (Syzygium polyanthum [Wight.] Walp.) Pada Hati Tikus Putih Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Karbon tetraklorida (CCl4).* Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

Jimenez, M., & Garcia-Carmona, F. (1999). Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79,** 1993-2000.

Jose. (2009). Cajanus cajan (L.) Millsp. Pigeonpea.Diakses 8 September 2009.

Kahl, R. (1984). Synthetic antioxidants: Biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens . *Toxicology* **33**, 185-228.

Kochar, S.P., & Rosell, B. (1990). Detection Estimetionand Evaluation of Antioxidant in Food System. In Food Antoxidant. Hudson, B.J.F. (Ed). London : Elvisier Applied Science.

Kosela, Soleh. (2010). Cara mudah dan sederhana Penentuan Struktur Molekul berdasarkan spectra data (NMR, Mass, IR, UV). Depok : Lembaga Penerbit FE UI.

Li, S., Li, S. K., Li, H. B., Xu, X. R., Deng, G. F., & Xu, D. P. (2014). Antioxidant Capacities of Herbal Infusions. Dalam S. Li, S.-K. Li, H.-B. Li, X.-R. Xu, G.-F. Deng, & D.-P. Xu, *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* (p. 41-50). Guangzhou, China: Academic Press.

Linn Thein Zaw, Suresh Awale, Yasuhiro Tezuka, Arjun H. Banskota, Surya K. Kalauni, Faisal Attamimi, Jun-ya Ueda, Puji Budi Setia Asih, Din Syafruddin, Ken Tanaka, dan Shigetoshi Kadota. (2005). *Cassane- and Norcassane-Type Diterpenes from Caesalpinia crista of Indonesia and Their Antimalarial Activity against the Growth of Plasmodium falciparum*. J. Nat. Prod. 2005, 68, 706-710.

Mohanty, P., Chourasia, N., Kumar , N. B., & Jaliwala, Y. (2011). Preliminary Phytochemical Screening of Cajanus cajan Linn. *Asian J. Pharm. Tech* **1(2)**, 49-52.

Molyneux, P..(2004). *The Use of the Stable Frree Radical Diphenylpicryl hidrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. Songklanakarin J. Sci. technol.* 26 (2) 211-219.

Nan Wu, Kuang Fu, Yu-Jie Fu, Yuan-Gang Zu, Fang-Rong Chang, Yung-Musan Chen, Xiao-Lie Liu, Yu Kong, Wei Liu dan Cheng-Bo Gu. (2009). *Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millsp) leaves*. Molecules. ISSN 1420-3049.

Pande, S., Sharma, M., Mangla, U. N., Ghosh, R., & Sundaresan, G. (2011). *Phytophthora blight of Pigeonpea [Cajanus cajan (L.) Millsp.]: An updating review of biology, pathogenicity and disease management*. *Crop Protection* **30**, 951-957.

Pavia, D. L., Lampman, G., & Knitz, G. (1990). *Introduction to Organic Laboratory Techniques a Conteporery Approach Second Edition.* Sainders: Thomson Learning.

Pinder, A.R.(1960). *The Chemistry of Terpenes*. London: Chapmann and Hall Ltd

Poole, C. F., & Salwa, K. (1991). *Chromatography Today.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher.

Pratt, D.E. & Hudson, B.J.F. (1990). *Natural Antioxidants not Exploited Comercially. In Food Antioxidants*. Hudson B. J. F. (Ed). London: Elsevier Applied Science.

Rensisca, D Acta. (2008). Kacang gudhe sebagai pangan alternative. Universitas airlangga : Surabaya.

Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Balasubramanian, M. P., & Nishigaki, I. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of D-pinitol against 7,12 di methylbenz(a) anthracene induced breast cancer in

sprague dawley rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4 (5)**, 384-390.

Silverstein, R. M., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds Seventh Edition.* Newyork: John Wiley and Sons, Inc.

Singh, P. R., Gupta , D., & Bajpaj, K. (1990). *Experimental Organic Chemistry.* New Delhi: Mac Graw Hill Publishing Co. Ltd.

Tapan, E. (2005). *Kanker, Antioksidan & Terapi Komplementer.* Jakarta: PT Elex Media Komputindo.

Tringali C,. (2001). *Bioactive Compounds from Natural Sources. Taylor and francis*. Universita di Catania. Italy

Thomas L. Payne. (1975). *Bark beetle olfaction. III. Antennal olfactory responsiveness of Dendroctonus frontalis Zimmerman andD. Brevicomis Le Conte (Coleoptera: Scolytidae) to aggregation pheromones and host tree terpene hydrocarbons.* Journal of Chemical Ecology 1975, Volume 1, Issue 2, pp 233-242.

Toshihiro Akihisa, Yutaka, Naomi Nakamura, Karabi Roy, Parthara Ghosh, Swapnadip Thakur Dan Toshitake Tamura. (1992). *Sterol Of Cajanus cajan And Three Other Leguminosae Seeds*. Phytochemistry, vol. 31, no. 5, pp. 1765-1768,1992

Winarno, F.G. (1991). *Kimia Pangan dan Gizi*. PT.Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

Wink, M. (2013). *Evolution of Secondary Metabolites in Legumes (Fabacea). South African Journal of Botany 00956*, 12.

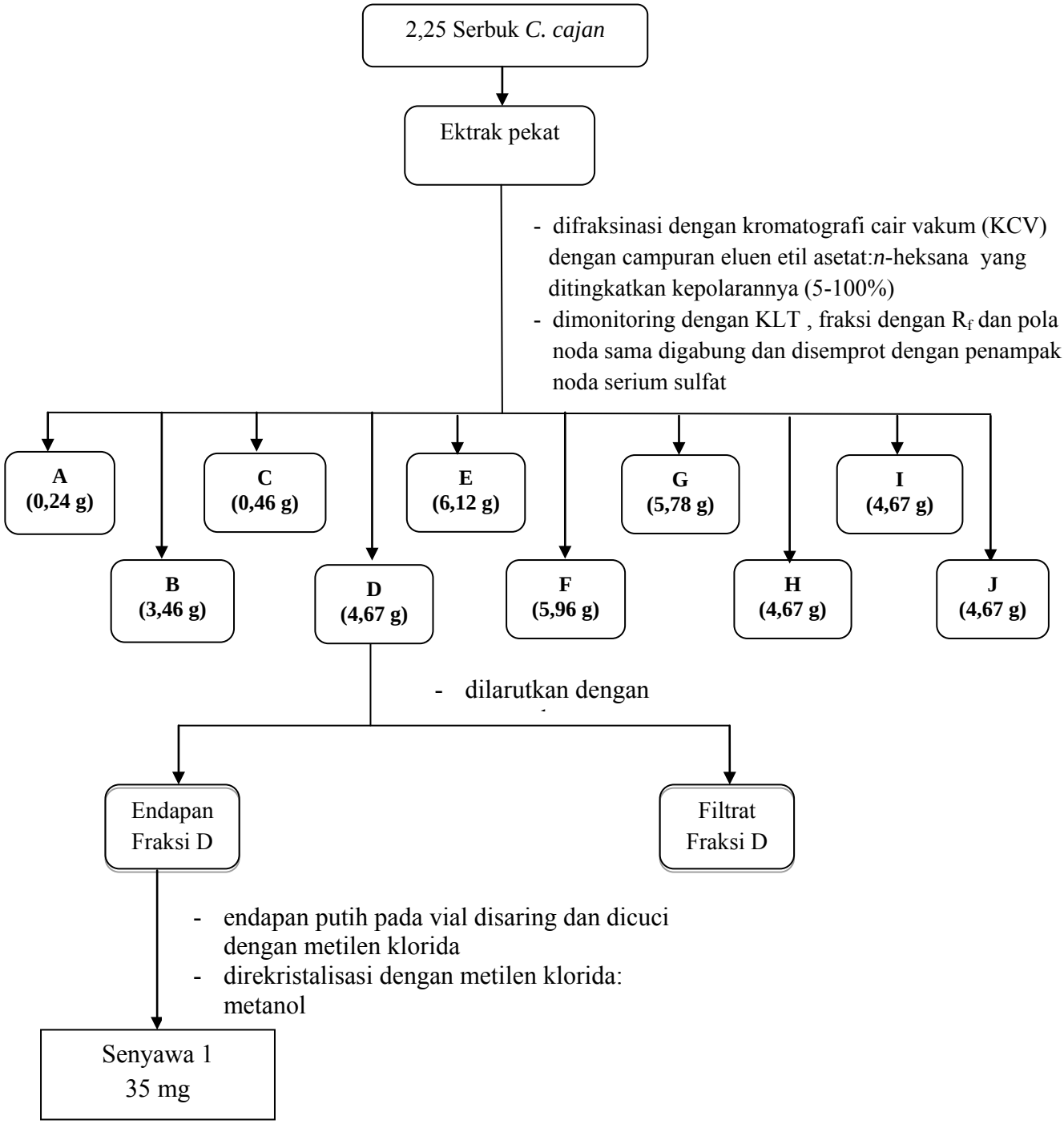
Y. Senda, S. Imaizum, S. Ochiai, K.Fujita. (1974). *Tetrahedron. Vol. 30, pp. 539 to 541. Pergamon Press.*

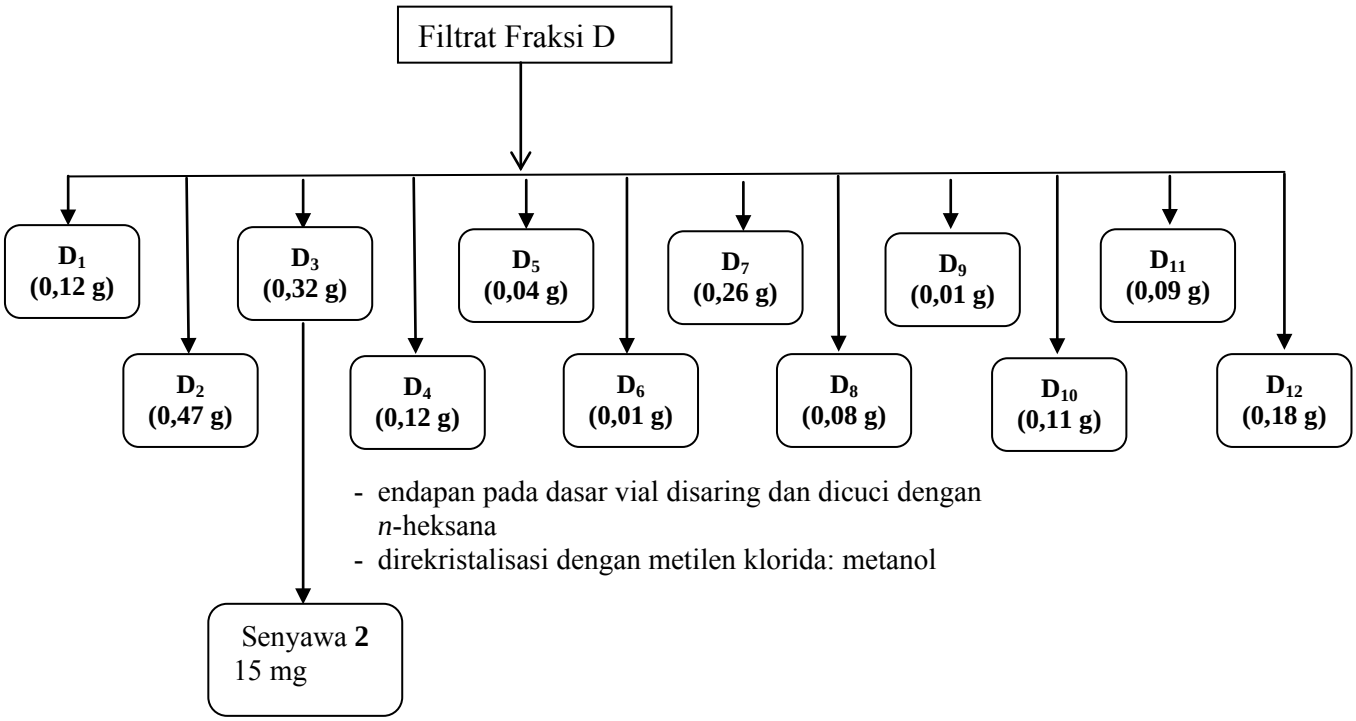
Xiao Yan-hua, Caoh ui, Zhang Guo-in. (2008). *Chem ICAL Constituents of Debregeasia Orientalis*. China: Academic Journal elctronic Publishing Huouse.

LAMPIRAN

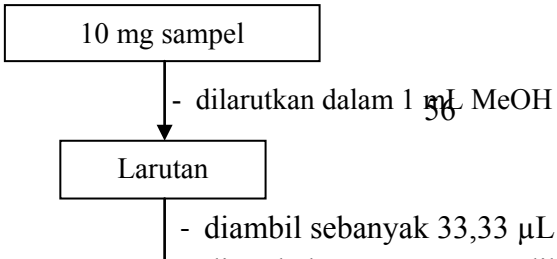
A. Skema Kerja

Skema kerja pemisahan dan pemurnian



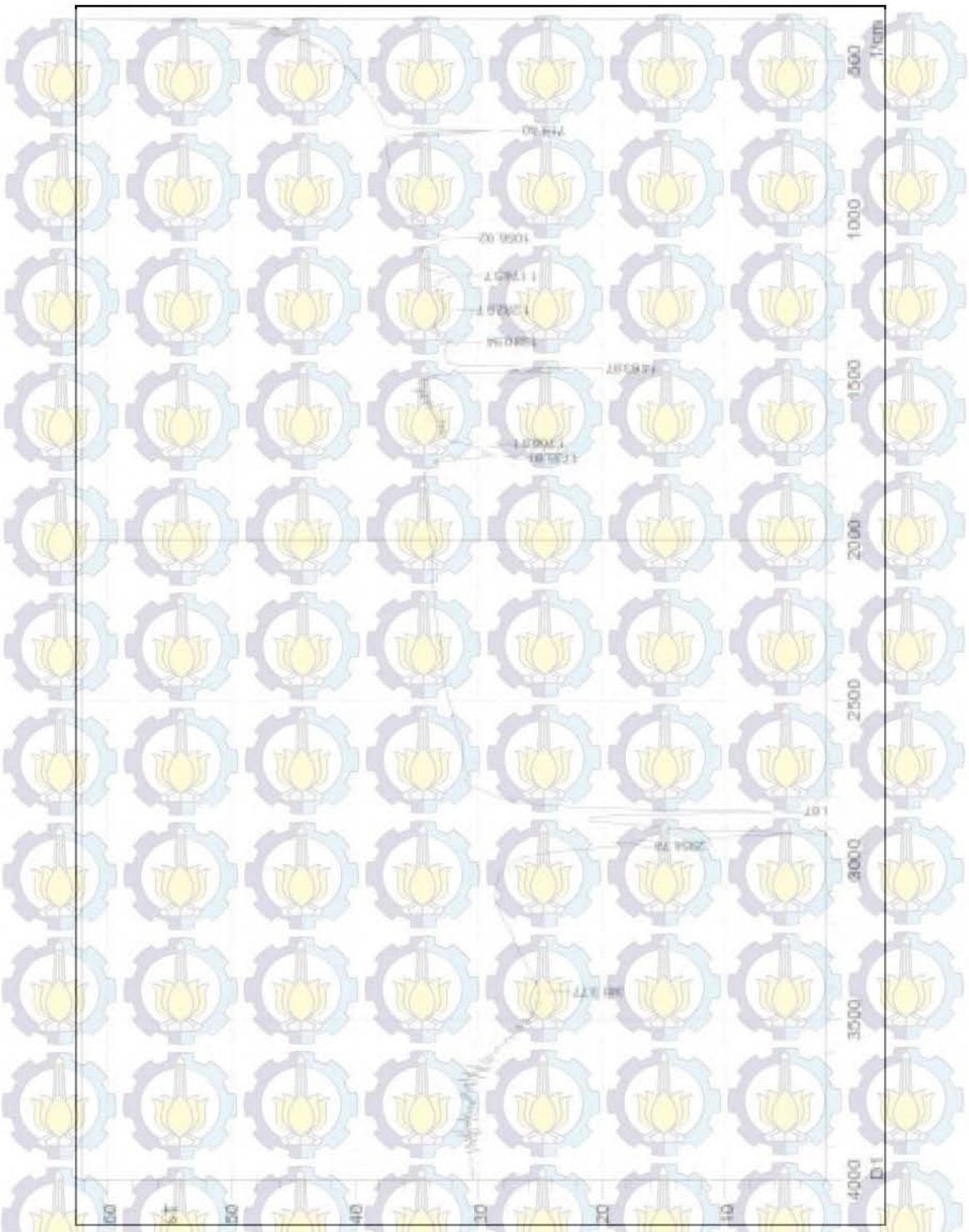


Uji DPPH (Dudonn'e, dkk. (Brand-Williams, dkk., 1995) (Dudonn'e, S., dkk., 2009)

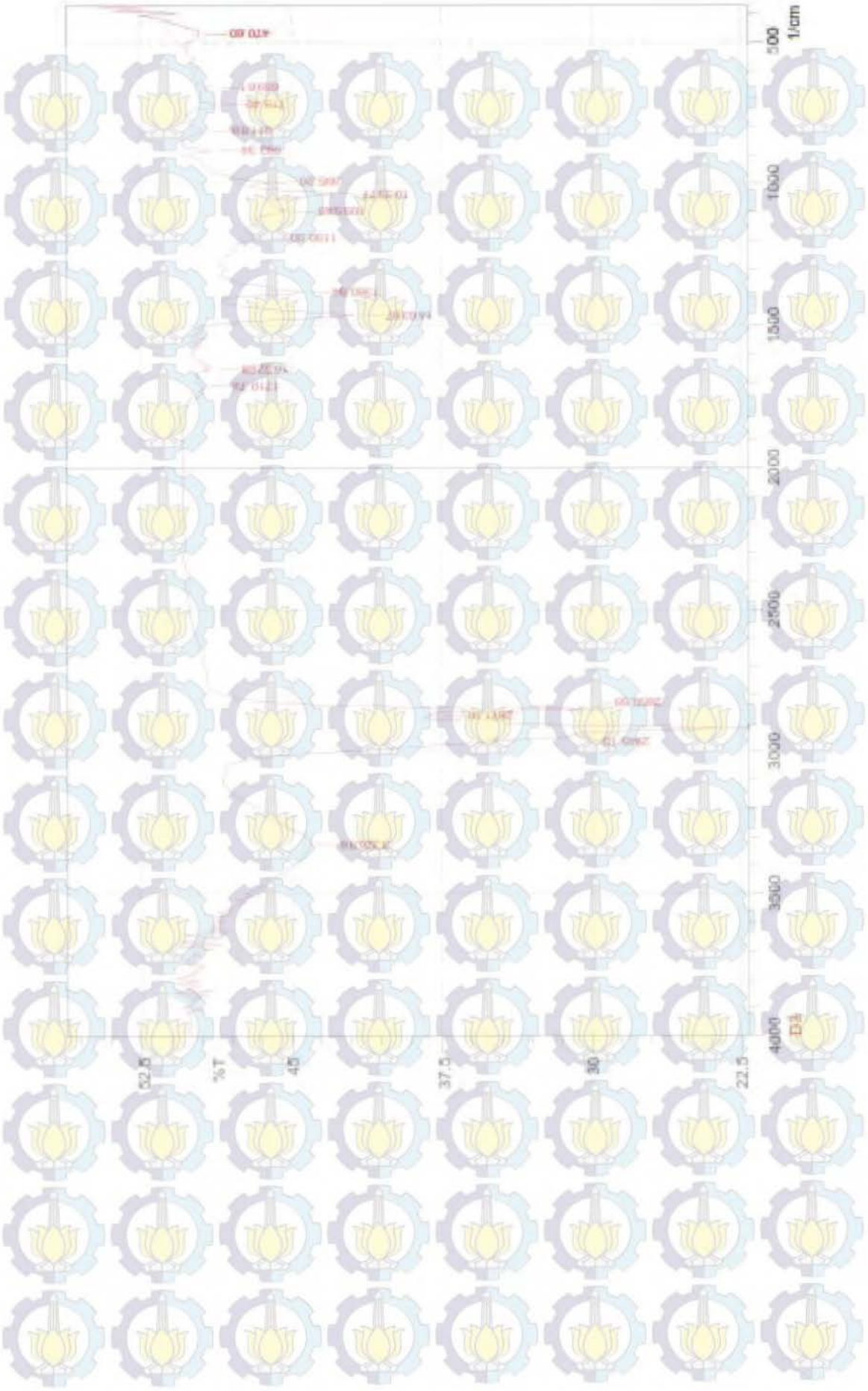


B. Spektrum IR

Spektrum IR Senyawa 1 dalam KBr



Spektrum IR Senyawa Prediksi 2 dalam KBr


500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
1/cm
%T
52.5
45
37.5
30
22.5

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BIOGRAFI PENULIS

Penulis memiliki nama lengkap **DEBORA ARIYANI** terlahir di Tarakan pada tanggal 10 Mei 1988, s ebagai anak ke 3 dari 4 bersaudara dari pasangan S.Panjaitan dan D.Gultom. Penulis telah menyelesaikan pendidikan di TK Kristen Tunas Kasih Tarakan (1994), SD Katolik Yos Sudarso Balikpapan (2000), SMP Patra Dharma 1 Balikpapan (2003), SMA N 6 B alikpapan (2006) dan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman Samarinda (2010). Penulis melanjutkan program studi Magister dan diterima sebagai mahasia S2 kimia hayati di FMIPA-ITS pada semester ganjil 2012/2013 dengan beasiswa unggulan Dikti. Penulis mengambil bidang minat Kimia Organik Bahan Alam dan bergabung dalam kelompok penelitian aktivitas kimiawi tumbuhan ITS (PAKTI) (paktichem@gmail.com) di bawah bimbingan Prof.Taslim Ersam. Penulis sempat menempuh kerja praktek di PT. PERTAMINA, Balikpapan dan bekerja di SMA Kristen Tunas Kasih Tarakan. Penulis dapat dihubungi melalui email debora.ariyani88@gmail.com.