



LAPORAN HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE BATCH III



**HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR SENYAWA FENOLIK
DARI TUMBUHAN *SENNA MULTIJUGA* DENGAN
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SERTA TOKSISITAS**

Oleh :
Nanik Siti Aminah
Alfinda Novi Kristanti
Mulyadi Tanjung

007807141
PROGRAM STUDI KIMIA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
DESEMBER, 2004

Hubungan Antara Struktur Senyawa Fenolik dari Tumbuhan *Senna Multijuga* Dengan Aktivitas Antioksidan Serta Toksisitas

Laporan Penelitian



Nanik Siti Aminah

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian dengan tujuan untuk melakukan isolasi dan pemurnian senyawa fenolik dari tumbuhan *Senna multijuga* yang besifat antioksidan dan toksisitasnya terhadap benur udang *Artemia salina* dan mengetahui hubungan antara struktur senyawa yang diperoleh dengan aktivitasnya

Bahan dasar penelitian ini meliputi preparasi bahan ekstrak (aseton), hasil fraksinasi, dan senyawa murni dengan panduan aktivitas skrining antioksidan dengan panduan TLC-autografi. Untuk mengisolasi dan menentukan struktur kimia senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dianalisis dengan metode spektroskopi seperti UV, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$. Selanjutnya senyawa murni yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode spektrometri ditentukan IC_{50} berdasarkan prinsip bahwa senyawa aktif dapat meredakan puncak absorbansi radikal DPPH. Uji toksitas menggunakan Brine shrimp lethality test (BSLT) juga dilakukan untuk mengetahui toksitas senyawa yang diperoleh. Berdasarkan hasil uji aktivitas senyawa yang telah diisolasi, disarankan hubungan antara struktur dan aktivitas senyawanya.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap kulit batang *Senna multijuga*, didapatkan empat senyawa golongan antrakuinon, yaitu emodin, 7,7'-bifisicion atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fisicion-7'-il)-9,10-antrakuinon, 1,6'-dihidroksi-3'-metil-8'-metoksi-7'(fisicion-7'-il)-9,10'-antrakuinon, serta 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fisicion-7'-il)-1,4-antrakuinon. Dua senyawa hasil isolasi menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu emodin ($\text{IC}_{50} = 200 \text{ ppm}$) dan 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fisicion-7'-il)-1,4-antrakuinon ($\text{IC}_{50} = 915 \text{ ppm}$). Dua senyawa hasil isolasi menunjukkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina*, yaitu emodin ($\text{LC}_{50} = 192,82 \text{ ppm}$) dan 7,7'-bifisicion atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fisicion-7'-il)-9,10-antrakuinon ($\text{LC}_{50} = 294,23 \text{ ppm}$). **Monomer**

Hubungan Antara Struktur Senyawa Fenolik Dari Tumbuh.An *Senna Multijuga* Dengan Aktivitas Antioksidan Serta Toksisitas

antrakuinon hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang jauh lebih tinggi dibanding bentuk dimernya. Sedangkan jumlah gugus hidroksil bebas pada dimer antrakuinon diduga merupakan faktor penentu dari tingginya aktivitas antioksidan dari dimer antrakuinon hasil isolasi. Perbedaan posisi gugus hidroksil dan metoksi pada dimer antrakuinon hasil isolasi, menentukan toksisitasnya terhadap benur udang *Artemia salina*.

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
LEMBAR PENGESAHAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Masalah	4
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	5
2.1 Tujuan Penelitian	5
2.2 Manfaat Penelitian	5
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	6
3.1 Leguminosae	6
3.1.1 Kandungan kimia Leguminosae	6
3.2. <i>Senna/Cassia</i>	7
3.2.1 Kandungan kimia <i>Senna/Cassia</i>	8
3.2.2 Senyawa antrakuinon pada <i>Senna/Cassia</i>	10
3.3. <i>Senna multijuga</i>	13
3.3.1 Kandungan kimia <i>Senna Cassia multijuga</i>	14
3.4. Ekstraksi dan Isolasi senyawa antrakuinon	15
3.4.1 Bahan tumbuhan	15
3.4.2 Ekstraksi	15
3.5 Kromatografi	16
3.5.1 Kromatografi lapis tipis (KLT)	16

3.5.2	Kromatografi kolom gravitasi (KKG)	17
3.5.3	Kromatografi cair vakum (KCV)	18
3.5.4	Kromatografi kolom cepat (KKC)	19
3.6	Analisis spektroskopik senyawa antrakuinon	20
3.6.1	Spektroskopi UV-VIS	20
3.6.2	Spektroskopi resonansi magnet inti proton	22
3.6.3	Spektroskopi resonansi magnet inti karbon	23
3.7	Antioksidan dan Senyawa Antioksidan Reaktif	25
3.8	<i>Artemia salina</i> L.	29
3.8.1	Morfologi <i>Artemia salina</i> L.	29
3.8.2	Siklus hidup <i>Artemia salina</i>	29
3.8.3	<i>Artemia salina</i> L. sebagai bioindikator	30
BAB IV	METODE PENELITIAN	32
4.1	Waktu dan Tempat Penelitian	32
4.2	Bahan dan Alat Penelitian	32
4.2.1	Bahan penelitian	32
4.2.2	Bahan Kimia	32
4.2.3	Alat-alat penelitian	33
4.3	Prosedur Kerja	33
4.3.1	Penyediaan bahan penelitian	33
4.3.2	Ekstraksi dan isolasi senyawa fenolik	33
4.3.3	Pemisahan dan pemurnian senyawa fenolik	34
4.4	Identifikasi Senyawa fenolik	35
4.4.1	Uji sifat fisika senyawa fenolik	35
4.4.2	Analisis spektroskopik senyawa fenolik	35
4.4.2.1	Spektroskopi UV – VIS	35

4.4.2.2	Spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$)	36
4.4.2.3	Spektroskopi resonansi magnet inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$)	36
4.5	Uji Antioksidan (TLC-Autografi dan Spektrometri)	36
4.6	Uji toksisitas dengan uji <i>Bone Marrow Lethality Test</i> (BSLT)	37
4.6.1	Penetasan telur <i>Artemia salina</i> L.	38
4.6.2	Uji toksisitas	38
4.6.3	Penentuan LC50	39
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	40
5.1	Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa	40
5.2	Pemisahan, pemurnian dan identifikasi masing-masing senyawa	42
5.2.1	Senyawa emodin (senyawa I)	42
5.2.1.1	Pemisahan dan pemurnian	42
5.2.1.2	Analisis spektroskopi	43
5.2.2	Senyawa 7,7'-bifisicron atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6- metoksi-7(fisicron-7'-il)-9,10-antrakumon (Senyawa II)	48
5.2.2.1	Pemisahan dan pemurnian	48
5.2.2.2	Analisis Spektroskopi	49
5.2.3	Senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fisicron-7'-il)- 9,10-antrakumon (Senyawa III)	54
5.2.3.1	Pemisahan dan Pemurnian	54
5.2.3.2	Analisis spektroskopi	55
5.2.4	Senyawa 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fisicron-7'-il)-1,4-antraquinon (Senyawa IV)	57
5.2.4.1	Pemisahan dan Pemurnian	57
5.2.4.2	Analisis Spektroskopi	58
5.3.1	Uji aktivitas Antioksidan	59
5.3.1	Uji toksisitas dengan benur udang <i>Artemia salina</i> (BSLT)	60

BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	65
	Kesimpulan	65
	Saran	66
DAFTAR PUSTAKA		67

DAFTAR TABEL.

		Halaman
Tabel 1	Hubungan antara diameter kolom dengan ukuran cuplikan	19
Tabel 2	Spektrum UV Vrs beberapa senyawa antrakuinon	20
Tabel 3	Pergeseran kimia ^{13}C -RMI untuk senyawa krisofanol	24
Tabel 4	Hubungan antara proton dan karbon pada spektrum ^1H - ^1H COSY	45
Tabel 5.	Perbandingan harga geseran kimia spektrum ^1H -NMR senyawa I dengan emodin yang telah dilaporkan oleh Meselhy	46
Tabel 6	Perbandingan harga geseran kimia spektrum ^{13}C -NMR senyawa I dengan emodin yang telah dilaporkan oleh Meselhy	47
Tabel 7	Uji kemurnian senyawa II	48
Tabel 8	Korelasi karbon-proton senyawa dimer antrakuinon hasil isolasi berdasarkan data analisis spektrum 2D ^{13}C - ^1H COSY	52
Tabel 9.	Perbandingan harga geseran kimia senyawa II dan senyawa III	56

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Alat Kromatografi Kolumn	17
Gambar 2. Alat Kromatografi Cair Vakum	18
Gambar 3. Alat kromatografi kolom cepat	19
Gambar 4. Spektrum 2D ^1H - ^1H COSY	45
Gambar 5. Geseran kimia proton pada senyawa emodin hasil isolasi	47
Gambar 6. Geseran kimia karbon pada senyawa emodin hasil isolasi	48
Gambar 7. Spektrum 2D ^{13}C - ^1H COSY	51
Gambar 9. Saran struktur senyawa II	52
Gambar 10. Aktualisasi posisi proton senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fision-7'-il)	53
Gambar 11. Aktualisasi posisi karbon senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fision-7'-il)	54
Gambar 12. Struktur senyawa II dan III	55
Gambar 13. Struktur senyawa III dengan harga geseran kimia ^1H -NMR	57
Gambar 14. Unit monomer pertama dari senyawa IV	59
Gambar 15. Unit monomer kedua dari senyawa IV	59
Gambar 16. Struktur senyawa dan harga geseran kimia ^1H -NMR senyawa IV	60
Gambar 17. Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi	61
Gambar 18. Hasil uji toksisitas senyawa hasil isolasi terhadap benur udang <i>Artemia salina</i>	63

**LEMBAR PENGESAHAN
HIBAH PENELITIAN PROYEK DI E- LIKE BATCH III
Periode Anggaran 2003/2004**

Judul : HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR SENYAWA
FENOLIK DARI TUMBUHAN *SENNA MULTIJUGA*
DENGAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SERTA
TOKSISITAS.

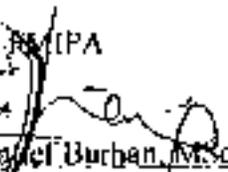
Ketua Peneliti : Nama : Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat dan Golongan : Penata/ III-C
NIP : 131932689
Jabatan : Lektor
Fakultas/Program studi : MIPA/KIMIA

Perguruan tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

Jangka Waktu : 6 (enam) bulan

Biaya yang diajukan: Rp. 30.000.000,- (Tiga puluh juta rupiah)

Surabaya, Desember 2004

Mengesahkan Fakultas
Dekan FMIPA

Drs. Latief Burhan, M.Sc.
NIP. 131 286 709

Ketua Peneliti,

Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.
NIP. 131932689

Menyetujui

Ljigit Srie Mahjandane, Ph.D.
NIP. 131 801 627

BAB I PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang Permasalahan

Akhir-akhir ini, perhatian dunia kesehatan tentang radikal bebas semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan sel yang mendasari timbulnya berbagai macam penyakit, seperti kanker, jantung koroner, rematik aritis, penyakit respiratorik, katarak, penyakit hati serta ditengarai ikut berperan pada proses penuaan dini (Haraguchi, 1996). Disamping antioksidan sintetis juga telah dikenal antioksidan alami (*natural antioxidants*). Bahan antioksidan alami yang dapat digunakan untuk mencegah reaksi oksidasi oleh radikal bebas adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karoten, senyawa flavonoid (flavanon, flavonol, katecin dan epikatecin), senyawa polifenol seperti lignin serta asam nordihydroguaiaretat (NDGA) (Cuendet, 1997). Pemanfaatan antioksidan alami dalam bidang kesehatan dan pengawetan bahan pangan tentunya relatif lebih aman dibandingkan antioksidan sintetis yang ternyata banyak menimbulkan efek samping yang merugikan bagi kehidupan manusia. Oleh karena itu upaya penemuan bahan-bahan antioksidan alami sangat penting dilakukan.

Leguminosae merupakan salah satu famili tumbuhan yang sangat besar dan banyak tumbuh di Indonesia. Famili tumbuhan ini telah dilaporkan merupakan salah satu famili tumbuhan penghasil senyawa fenolik yang kaya akan gugus hidroksil khususnya golongan oligostilbenoid. Senyawa ini dilaporkan terdapat pada lima famili tumbuhan, yaitu Leguminosae, Dipterocarpaceae, Vitaceae, Gnetaceae, dan Cyperaceae (Sutteswaran, 1993, Hakim, 2002). Senyawa oligostilbenoid murni hasil isolasi tersebut

telah dilaporkan mempunyai beberapa aktivitas biologi yang sangat menarik, seperti antioksidan (Tanaka, 2000), anti-HIV (Dai, 1998), antibakteri (Sultana, 1987; Geewananda, 1986), antifungal (Pryce, 1977; Bokel, 1988), antihepatotoksik (Oshima, 1993), antiinflamasi (Kitanaka, 1990), sitotoksik (Dai, 1998; Ito, 2001) inhibitor enzim 5 α -reduktase (Hirano, 2001), dan enzim asetilkolinesterase (Sung, 2002). Namun selain senyawa oligostilbenoid tersebut juga dilaporkan adanya senyawa fenolik seperti flavonoid dan antrakuinon yang tidak kalah menariknya baik dari segi struktur kimia maupun khasiatnya.

Senna/Cassia merupakan salah satu genus dari famili Leguminosae yang mempunyai banyak keanekaragaman, baik dari morfologi, taksonomi maupun kandungan kimianya. Beberapa senyawa yang telah berhasil diisolasi dari genus *Cassia/Senna* adalah senyawa golongan stilbenoid dari tumbuhan *Cassia garethana*, antrakuinon dari tumbuhan *Senna shopera*, dan *Senna didymobotrya*, dan flavonoid dari tumbuhan *Cassia torosa* (Sotheeswaran, 1993; Hakim, 2000; Kang, 2000; Ohyama, 1995; Almayehu, 1998). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaporkan memperlihatkan bahwa senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari beberapa spesies dari genus *Senna/Cassia* mempunyai beberapa aktivitas biologis yang menarik.

Senna/Cassia multijuga merupakan salah satu spesies dari genus *Senna/Cassia* yang telah diteliti sebagian. Biji dari tumbuhan ini dilaporkan menghasilkan senyawa monomer dalam bentuk hidroksi maupun glikosida dari senyawa golongan antrakuinon (Singh, 1981). Namun bagian kulit batang dari tanaman ini belum pernah diteliti sebelumnya. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan isolasi, identifikasi, uji aktivitas antioksidan dan toksisitasnya pada benur udang *Artemia Salina* terhadap

kulit batang *Senna Cassia multijuga*, serta melihat hubungan antara struktur dan aktivitas senyawa hasil isolasi yang diperoleh dengan aktivitas antioksidan dan toksisitasnya.

Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan rujukan untuk memanfaatkan senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada *Senna Cassia multijuga*, agar dapat diaplikasikan sebagai bahan antioksidan yang berasal dari tanaman Indonesia, tentunya setelah dilakukan uji-uji lebih lanjut. Selanjutnya senyawa tersebut akan dapat dijadikan sebagai model untuk mensintesis bahan antioksidan mengingat persediaan bahan alam sangat terbatas. Selain dari hasil penelitian, manfaat lain dari aspek pendidikan dapat menumbuhkan budaya meneliti pada mahasiswa dan staf pengajar. Di samping itu, penelitian ini dapat membantu melatih mahasiswa agar mampu menganalisis dan mengidentifikasi serta mengembangkan pemecahan berbagai masalah yang berkaitan dengan analisis kimia. Selain itu mahasiswa mampu mengimplementasikan instrumen kimia dalam berbagai analisis kimia sebagai skill memasuki dunia kerja.

Bahan dasar penelitian ini meliputi preparasi bahan ekstrak (aseton), hasil fraksinasi, dan senyawa murni dengan panduan aktivitas skrining antioksidan. Untuk mengisolasi dan menentukan struktur kimia senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dianalisis dengan metode spektroskopi seperti UV, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$. Penentuan aktivitas antioksidan dengan panduan TLC-autografi merupakan metode yang efektif dan cepat untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas dalam bahan ekstrak. Interaksi antara senyawa aktif dengan pereaksi radikal DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) akan memberikan warna kuning. Selanjutnya senyawa murni yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode spektrometri ditentukan IC_{50} , berdasarkan prinsip bahwa senyawa aktif dapat meredam puncak absorbansi radikal

DPPH. Penelitian senyawa anti radikal bebas merupakan penelitian pendahuluan yang selanjutnya akan diaplikasikan dalam terapi kanker dan atherosclerosis. Uji toksitas menggunakan *Bute shrimp lethality test (BSLT)* juga dilakukan untuk mengetahui toksitas senyawa yang diperoleh.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian tersebut diatas, maka masalah penelitian yang timbul adalah sebagai berikut,

1. bagaimanakah struktur molekul senyawa fenolik yang terdapat pada ekstrak aseton kulit batang *Senna multijuga*?
2. apakah senyawa tersebut mempunyai aktivitas antioksidan?
3. apakah senyawa tersebut mempunyai toksitas terhadap larva *Artemia salina* Leach ?
4. bagaimanakah hubungan antara struktur senyawa tersebut dengan aktivitas antioksidan dan toksitasnya?

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

1. melakukan isolasi dan purifikasi senyawa fenolik dari tumbuhan *Senna multijuga* yang bersifat antioksidan dengan panduan TLC-autografi,
2. menentukan struktur kimia senyawa fenolik tersebut dengan metode spektrometri meliputi spektroskopi UV, IR, dan NMR,
3. menguji daya redam senyawa antioksidan terhadap radikal DPPH secara spektrometri,
4. menguji toksisitas senyawa yang tersebut dengan uji Brine shrimp lethality test (BSLT) dengan menggunakan benur udang *Artemia salina*

2.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk memberikan konfirmasi senyawa fenolik yang terdapat pada kulit batang *Senna multijuga* yang mempunyai aktivitas antioksidan dan toksisitasnya terhadap benur udang *Artemia salina*, serta melihat hubungan antara struktur senyawa-senyawa tersebut dengan aktivitas antioksidan dan toksisitasnya sehingga dapat dilanjutkan ke uji yang lebih spesifik.

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

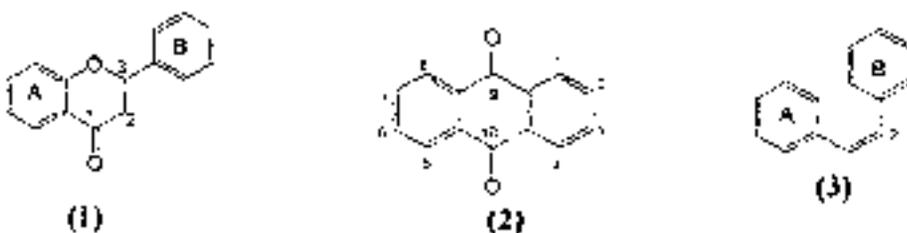
3.1 Leguminosae

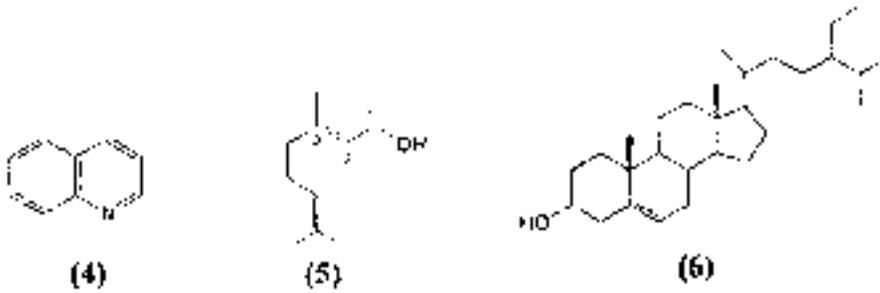
Leguminosae merupakan famili terbesar dan tumbuhan biju-bijuan di Indonesia. Famili tumbuhan ini memiliki sekitar 91 genus dan masing-masing terdiri dari beberapa spesies. Genus dan tumbuhan ini yang memiliki spesies-spesies cukup besar yaitu *Cassia*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Cratularia*, *Indigofera*, dan *Desmodium*. Tumbuhan ini memiliki ketinggian 0,3 sampai 35 meter dan dapat tumbuh baik di dataran rendah dan pada ketinggian hingga 1800 meter diatas permukaan laut. Ditibat dari manfaatnya tumbuhan ini memiliki banyak kegunaan diantaranya digunakan sebagai bahan makanan, obat-obatan, perekat, bahan penyamak, dan pewarna (Heyne, 1987).

3.1.1 Kandungan kimia Leguminosae

Kandungan kimia yang terdapat pada tumbuhan famili Leguminosae sebagian besar adalah senyawa fenolik dan yang telah berhasil di isolasi diantaranya senyawa golongan flavenoid (1) (Suri, 1978; Bezuidenhout, 1987), aurakunon (2), stilbenoid (3), alkaloid (4) (Masood, 1980; Murakoshi, 1981) dan beberapa senyawa metabolit sekunder non fenolik seperti terpenoid (5), dan steroid (6) (Heyne, 1987).

Struktur golongan senyawa dalam Leguminosae :





3.2 *Senna/Cassia*

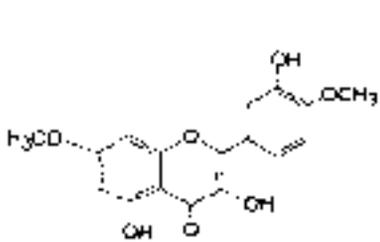
Senna Cassia merupakan salah satu genus Leguminosae yang dominan dan memiliki tinggi 6 sampai 50 meter serta memiliki bunga dengan warna bermacam-macam. Tumbuhan ini dapat tumbuh baik pada daerah dengan ketinggian, tanah, temperatur dan curah hujan sedang. Beberapa spesies *Senna/Cassia* terkenal oleh kecantikan bunganya, dengan berbagai variasi warna sehingga banyak ditanam sebagai tanaman hias dan pohon pelindung. Dilihat dari pemanfaatannya *Senna/Cassia* ini banyak digunakan dalam bidang obat-obatan. Misalnya beberapa jenis *Senna/Cassia* digunakan sebagai anti diabetes, daun *Cassia alata* untuk obat sakit herpes dan kudis, daun *Cassia angustifolia* untuk obat urus-urus, kayu *Cassia singuena* untuk obat sakit perut, dan gigitan ulat, dan *Cassia occidentalis* untuk obat sakit gigi (Heyne, 1987).

Hasil isolasi dari *Senna/Cassia* mempunyai beberapa aktivitas seperti antioksidan (Tanaka, 2000, Panichayupakaranani, 2004), anti HIV (Dai, 1998), antibakteri (Sutubawa, 1987; Geewanada, 1986), antifungal (Pryce, 1977; Bokel, 1988; Phangpaichit, 2004), antilepatotoksik (Oshima, 1993), dan antinflamatory (Moriyama, 2003).

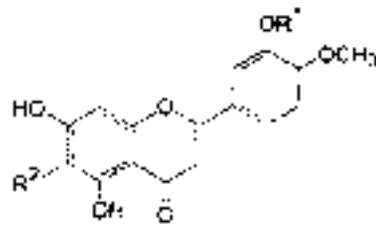
3.2.1 Kandungan kimia *Senna/Cassia*

Senna/Cassia dikenal banyak mengandung antrakuinon, flavonoid, stilbenoid, alkaloid dan senyawa metabolit sekunder lain. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang telah berhasil diisolasi dari genus *Cassia* antara lain adalah dari golongan flavonoid, yaitu kuersetin-7,4'-dimetil eter (ombuin) (7) dari akar *Cassia toevigata* (Singh, 1980), diosmetin-3'-O- β -D-glukopiranosida (8) dan torosafflavon B-3'-O- β -D-glukopiranosida (9) dari daun *Cassia torosa* (Kitanaka, 1992), kaempferol-3-O-gentiobiosida (10) dari daun *Cassia alata* (Moriyama, 2003). Senyawa golongan stilbenoid diantaranya adalah 3',4,5'-tetrahidroksstilben (11), kasigarol A (12), kasigarol B (13), kasigarol C (14) dan kasigarol D (15) dari tumbuhan *Cassia garrettiana* yang memiliki aktivitas antifungal dan anti hipertensi (Inamori, 1991; Baba, 1992). Sebagai contoh senyawa golongan alkaloid adalah cassadinin (16) dari *Cassia siamea* (Biswas, 1986). Adapun senyawa golongan lakton diantaranya quinguangulit (17) dan rubrofusarin (18) dari akar *Cassia rugosa* (Barbosa, 2004), isotalakton (19), cassialakton (20) (Kitanaka, 1981). Senyawa golongan steroid yang telah dilaporkan adalah β -sitosterol (21) dari akar *Cassia javanica* (Iwari, 1979), β -sitosterol-O-glukosida (22), dan stigmasterol (23) dari tumbuhan *Cassia fistula* L. (Lee, 2001). Senyawa golongan terpenoid adalah terpenoid-3 β ,16 β ,22-trihidroksi isolohan (24) dari biji *Cassia hirsuta* (Singh, 1986). Sedangkan untuk senyawa golongan antrakuinon akan dibahas tersendiri pada sub bab 3.2.2.

Berikut ini adalah struktur beberapa senyawa pada *Cassia* yang telah disebutkan diatas:

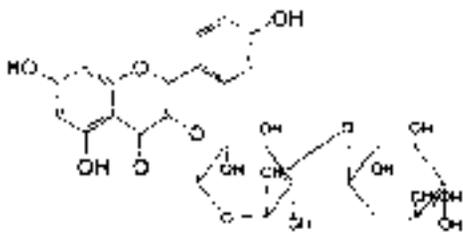


(7)

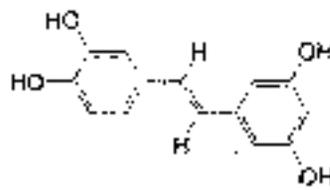


(8) $R^1 = \beta\text{-D-glukosif}$, $R^2 = \text{H}$

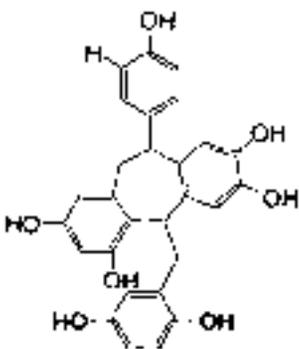
(9) $R^1 = \beta\text{-D-glukosil}$, $R^2 = \beta\text{-D-glukosil}$



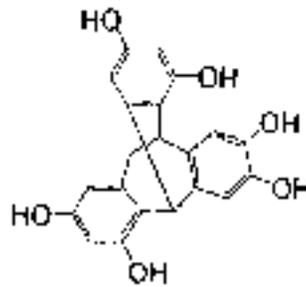
(10)



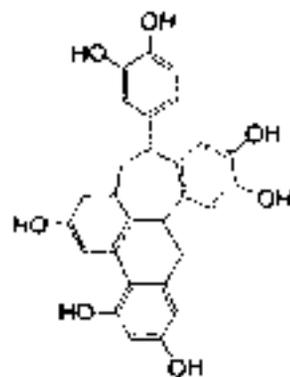
(11)



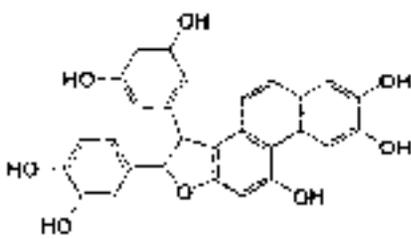
(12)



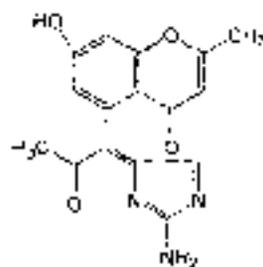
(13)



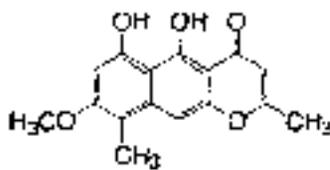
(14)



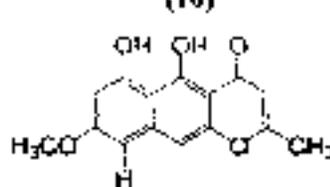
(15)



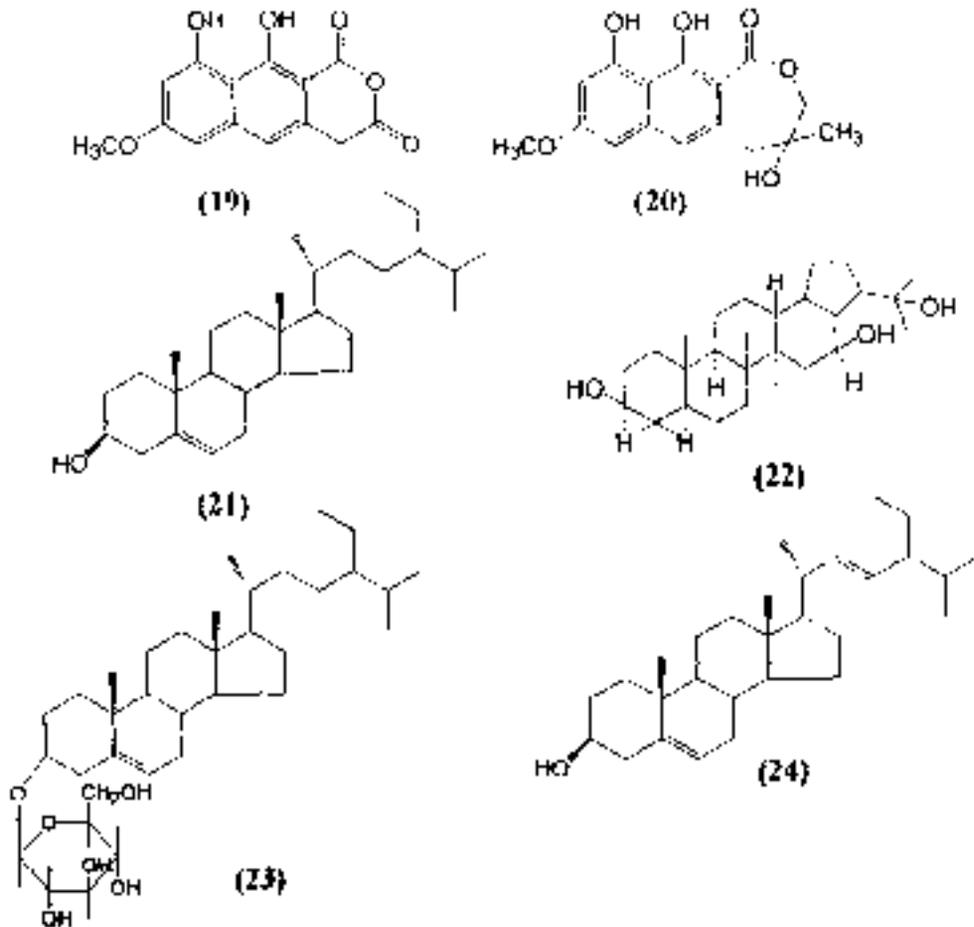
(16)



(17)



(18)

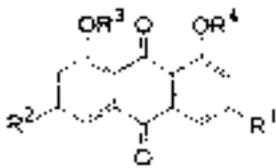


3.2.2 Senyawa antrakuinon pada *Senna/Cassia*

Senyawa antrakuinon yang telah berhasil diisolasi dari tumbuhan *Cassia* adalah emodin (25) (Lee, 2001), krisofanol (26) (Barbosa, 2004), fisicin (27) (Barbosa, 2004), rhein (28), aloin emodin (29), antrakuinon glikosida (Maryama, 2003), rein metil ester (30), citreosein (31), ziganein (32), 1,4,5-trihidroksi antrakuinon (33) (Lee, 2001), 1,3-dihidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil antrakuinon-3-O-ramnosil-1,6-glukopiranosida (34) dan 1,3,5,8-tetrahidroksi-2-metil antrakuinon-3-O-glukosida (35) (Singh, 1987), 4,4'-bis-1,3,8-trihidroksi-2-metil-6-metoksi antrakuinon (36) (Singh, 1986), knipolon (37),

(fiscion-7'-O)-1,4-antrakuinon (39) (Alemayehu, 1996), floribundone-I (40), isosengulone (41), sengulone (42), presengulon (43), anhidroflignanin-9,10-quinon A₂-B₂ (44) (Alemayehu, 1998), krisofanol biantron (45), krisofanol-fiscion biantron (46), krisofanol-isofiscion biantron (47), isofiscion biantron (48) (Alemayehu, 1993).

Struktur beberapa senyawa antrakuinon dari *Senna alata* :



(25) R¹ = CH₃, R² = OH, R³ = R⁴ = H

(26) R¹ = CH₃, R² = R³ = R⁴ = H

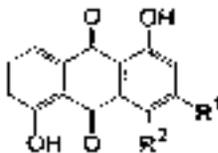
(27) R¹ = CH₃, R² = OCH₃, R³ = R⁴ = H

(28) R¹ = COOH, R² = R³ = R⁴ = H

(29) R¹ = CH₂OH, R² = R³ = R⁴ = H

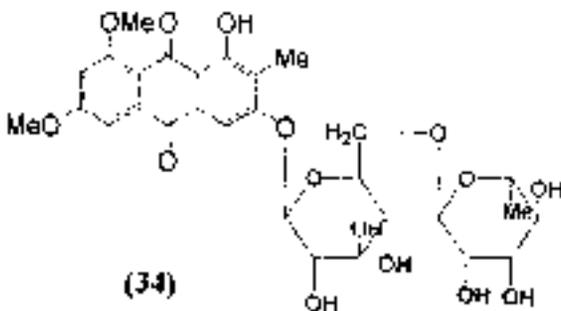
(30) R¹ = COOCH₃, R² = R³ = R⁴ = H

(31) R¹ = CH₂OH, R² = CH₃, R³ = R⁴ = H

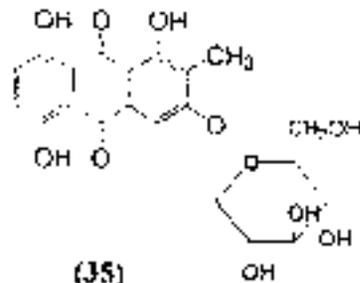


(32) R¹ = CH₃, R² = H

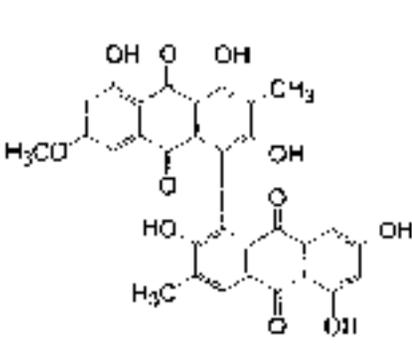
(33) R¹ = H, R² = OH



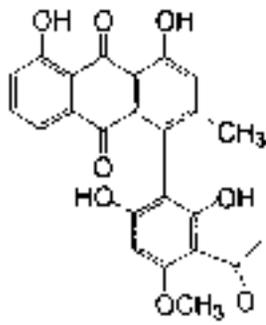
(34)



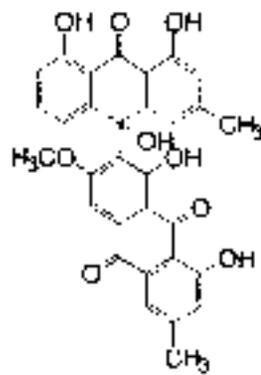
(35)



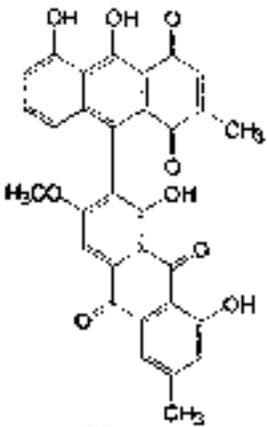
(36)



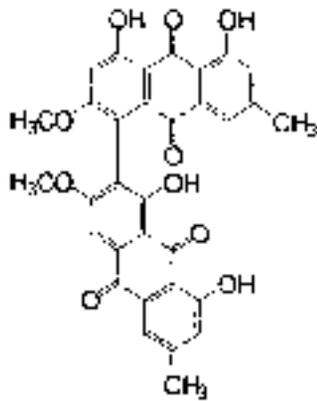
(37)



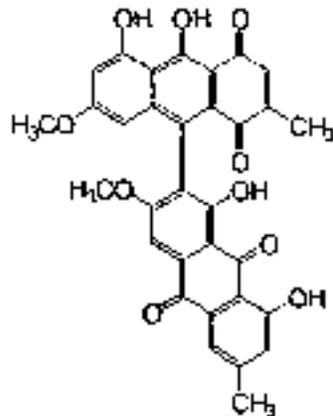
(38)



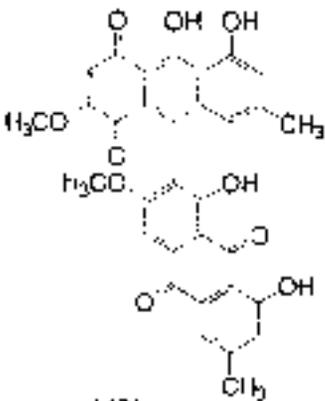
(39)



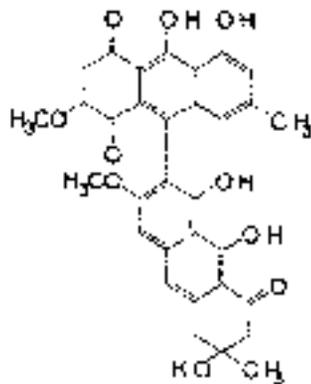
(40)



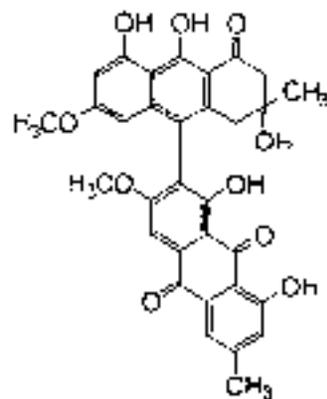
(41)



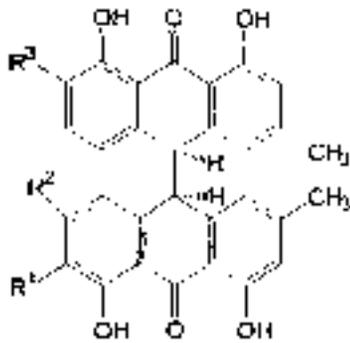
(42)



(43)



(44)

(45) $R^1 R^2 R^3 = H$ (46) $R^1 = OCH_3, R^2 = R^3 = H$ (47) $R^1 = R^3 = H, R^2 = OCH_3$ (48) $R^1 = H, R^2 = R^3 = OCH_3$

3.3 *Senna multijuga*

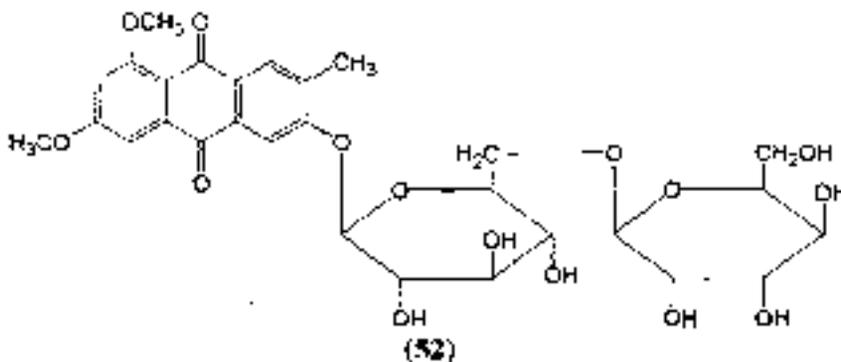
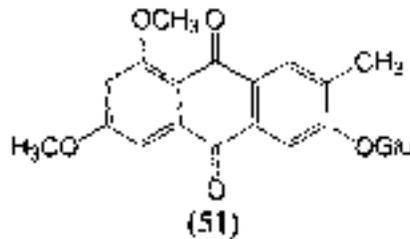
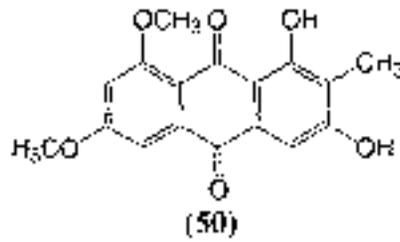
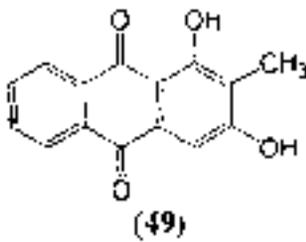
Senna multijuga merupakan salah satu spesies dari genus *Senna* *Cassia* yang mempunyai tinggi sekitar 4 sampai 20 m (Steenis, 2002). Tumbuhan ini mempunyai daun majemuk dan berbunga hermaphrodit (Ribeiro, 2004). *Senna multijuga* berasal dari Amerika Selatan yang memiliki nama daerah *Canafistula* atau *pan-cigarra*. Tumbuhan ini tumbuh sangat baik di wilayah Indonesia dan termasuk dalam famili Leguminosae berukuran sedang dan banyak terdapat di hutan Atlantik, Brazil. Masyarakat menggunakan tumbuhan ini sebagai obat tradisional (Ribeiro, 2004).

Menurut Tjitrosopornus kedudukan *Senna multijuga* dalam taksonomi tumbuhan sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisio	:	Spermatophyta
Sub divisio	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Rosales
Famili	:	Leguminosae
Sub famili	:	Caesalpinioideae
Genus	:	<i>Senna</i> <i>Cassia</i>
Spesies	:	<i>Senna multijuga</i> Rich.

3.3.1. Kandungan kimia *Senna/Cassia multijuga*

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang telah dilaporkan berasal dari biji tumbuhan *Senna Cassia multijuga*. Berdasarkan studi literatur diketahui bahwa pada biji tumbuhan ini diketahui mengandung senyawa golongan antrakuinon yaitu 1,3-dihidroksi-2-metil antrakuinon (49) 1,3-dihidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil antrakuinon (50), 3-hidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil-1-O- β -D-(+)-glukopiranosida (51), 3-hidroksi-6,8-dimetoksi-2-metil-1-O-ramnosil-(1-6)-glukopiranosida (52) (Singh, 1981).



3.4 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Antrakuinon

3.4.1 Bahan tumbuhan

Bahan yang ideal digunakan untuk mengisolasi senyawa kimia berupa jaringan segar pada bagian kulit, akar, batang, daun, bunga dan buah. Bagian tumbuhan yang telah dikeringkan juga memberikan hasil memuaskan untuk analisis. Pengeringan dilakukan dalam keadaan terawasi untuk mencegah tumbuhnya jamur dan perubahan kimia yang terlalu banyak. Bahan dikeringkan secepat-cepatnya, tanpa menggunakan suhu tinggi, lebih baik dengan aliran udara yang baik (Harborne, 1987)

3.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat sangat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi (Harborne, 1987).

Untuk mengekstrak senyawa antrakuinon sebaiknya dilakukan pada suhu kamar. Metode ekstraksi yang cocok yaitu maserasi. Sedangkan pelarut yang digunakan pelarut polar seperti metanol, etanol atau pelarut semipolar seperti aseton. Pada umumnya senyawa fenolik dapat terekstrak dalam pelarut polar ataupun semi polar. Selanjutnya ekstrak kasar dipartisi dengan pelarut nonpolar untuk memisahkan lemak atau senyawa nonpolar dari ekstrak kasar tersebut. Jika senyawa nonpolar sudah terekstraksi keseluruhan, partisi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut semipolar seperti

kloroform atau etil asetat sehingga didapatkan ekstrak semi polar. Senyawa antrakuinon terdapat pada ekstrak semi polar ini.

3.5 Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu campuran zat-zat kimia berdasarkan distribusinya dalam fasa gerak dan fasa diam. Dengan kromatografi, hampir setiap campuran kimia, mulai dari senyawa dengan berat molekul rendah sampai tinggi, dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya. Metode kromatografi yang sering digunakan dalam pemisahan antara lain kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi cair vakum, dan kromatografi kolom cepat. Pemisahan dan pemurnian kandungan senyawa dalam tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu atau gabungan dari metode tersebut.

3.5.1 Kromatografi lapis tipis (KLT)

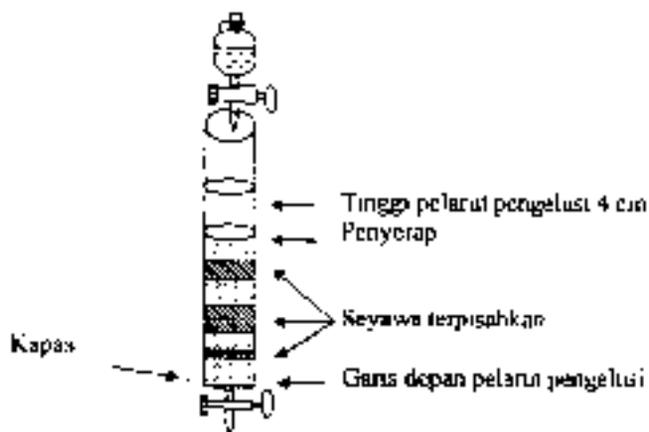
Kromatografi lapis tipis merupakan jenis kromatografi cair-cair yang digunakan untuk memisahkan senyawa kimia berdasarkan perbedaan adsorpsi atau partisi zat antara fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam adalah bahan berupa lapisan tipis yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, pelat polimer atau logam. Bahan padat sebagai penyerap dan yang biasanya digunakan adalah silika gel, alumina, tanah diatomite dan selulosa. Fasa gerak berupa pelarut atau campuran pelarut.

Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan pada pelat TLC dengan pipa kapiler dan diekusi dengan pelarut yang sesuai. Kromatogram dilihat di sinar UV dan direaksikan dengan pereaksi warna Cerium Sulfat. Dari kromatogram tersebut terlihat noda dengan harga Rf (Retardation factor) yang besarnya karakteristik untuk masing-masing senyawa. (Gritter, 1991)

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

3.5.2 Kromatografi kolom gravitasi (KKG)

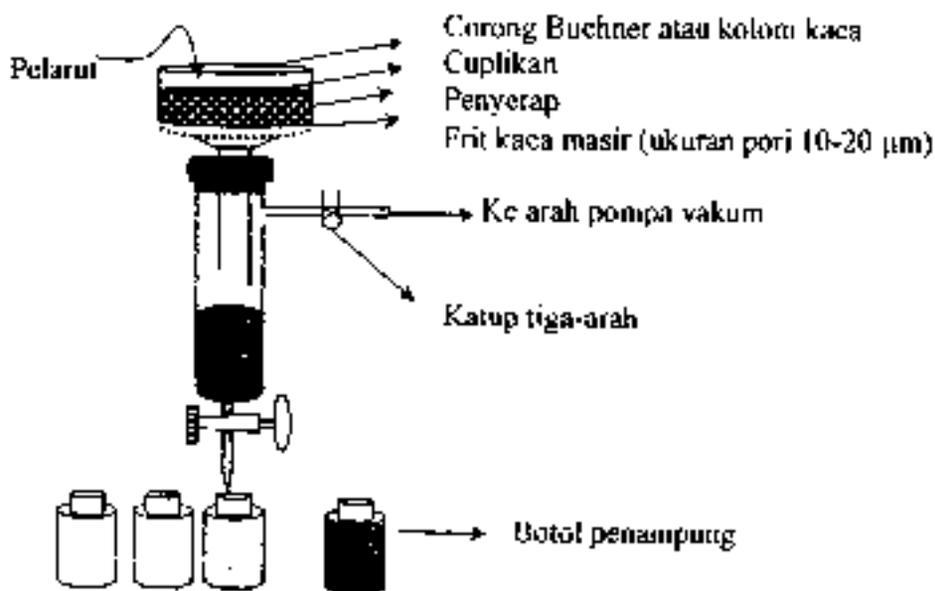
Kromatografi kolom gravitasi merupakan metode pemisahan campuran dalam jumlah besar. Pada kromatografi ini campuran dipisahkan diatas kolom yang berisi adsorben. Fasa gerak (pelarut) dimasukkan dan dibiarkan mengalir melalui kolom. Pita senyawa akan bergerak turun melalui kolom dengan laju berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom. Adsorben yang digunakan adalah silika gel, alumina, arang, selulosa, poliamida dan polistirena. Kelemahan dari kromatografi ini membutuhkan waktu yang lama dan pelarut yang banyak sehingga tidak efektif digunakan dalam proses pemisahan (Gritter, 1991).



Gambar 1. Alat Kromatografi Kolom

3.5.3 Kromatografi cair vakum (KCV)

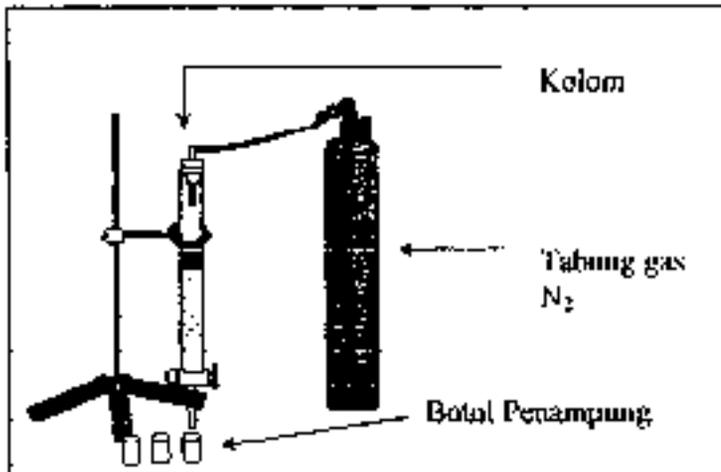
Kromatografi cair vakum hampir sama dengan kromatografi kolom. Pada kromatografi ini laju aliran fasa gerak ditingkatkan dengan tekanan rendah (Hostettman, 1995). Dengan kromatografi ini waktu yang dibutuhkan relatif cepat. Kromatografi ini menggunakan corong buchner yang dilengkapi dengan kaca masir dalam keadaan kering dan vakum. Ketika vakum dihentikan, pelarut yang kepolarannya rendah dimasukkan ke permukaan penyerap dan divakumkan lagi lalu dihisap dengan pompa hisap sampai kering dan siap dipakai untuk kromatografi cair vakum. Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dan dimasukkan pada bagian atas kolom. Kemudian kolom dihisap perlahan ke dalam kemasan dengan cara memvakumnya. Kolom dielus dengan pelarut yang sesuai dengan kepolaran rendah lalu ditingkatkan kepolarannya dan kolom dihisap sampai eluen dan senyawa yang dibawa tertampung pada setiap fraksi (Hostettman, 1995).



Gambar 2. Alat Kromatografi Cair Vakum

3.5.4 Kromatografi kolom cepat (KKC)

Kromatografi ini sangat sederhana yaitu pemisahan preparatif menggunakan kromatografi kolom biasa yang dimodifikasi dengan bantuan tekanan gas nitrogen 2 bar/30psi lalu aliran eluen dalam kromatografi ini 50-60 ml/menit. Keuntungannya dibanding kromatografi biasa adalah waktu yang diperlukan relatif lebih singkat. Pemilihan kolom disesuaikan dengan jumlah cuplikan yang akan dipisahkan. Banyak cuplikan berbanding lurus dengan luas penampang kolom (Tabel 1). Berbagai penyerap yang sering dipakai silika gel (d_p 63-200 μm) (Hostettman, 1995).



Gambar 3. Alat kromatografi kolom cepat

Tabel 1. Hubungan antara diameter kolom dengan ukuran cuplikan (tinggi lapisan penyerap 15 cm), (Still dalam Hostettmann, 1995).

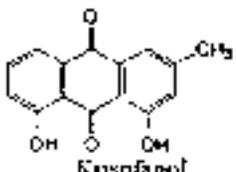
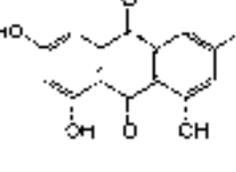
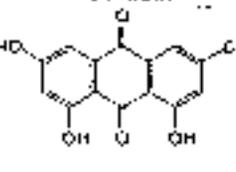
Diameter kolom (mm)	Volume pengelusi (ml)	Desar cuplikan (mg)		Volume fraksi (ml)
		$\Delta Rf \geq 0,2$	$\Delta Rf \geq 0,1$	
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
30	400	900	360	20
40	600	1600	600	30
50	1000	2500	1000	50

3.6 Analisis Spektroskopi Senyawa Antrakuinon

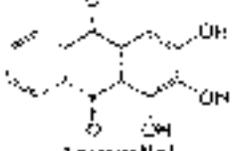
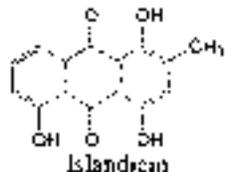
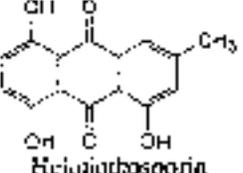
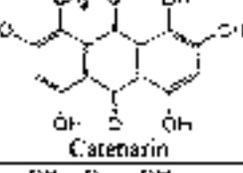
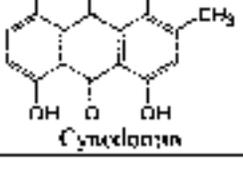
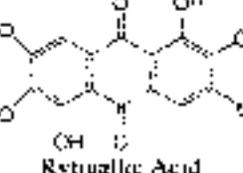
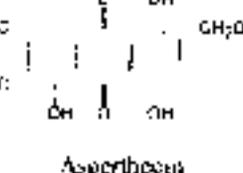
3.6.1 Spektroskopi UV-Vis

Spektroskopi UV-Vis merupakan salah satu cara yang sangat penting dalam menganalisis dan mengidentifikasi struktur suatu senyawa antrakuinon. Spektrum UV-Vis senyawa antrakuinon mempunyai serapan sistem konjugasi silang asetofenon - benzokuinon yang mempunyai λ_{max} 243, 252, 263, 272, 325 dan 405 nm. Dimana pada λ 252 nm dan λ 325 merupakan pita serapan asetofenon sedangkan λ 272 nm dan 405 nm merupakan pita serapan benzokuinon. Absorpsi quinonoid pada 405 nm akan bergeser kearah panjang gelombang yang lebih panjang, jika semakin banyak substituen yang terikat pada inti antrakuinon. Spektrum beberapa senyawa antrakuinon dapat dilihat pada tabel 2 (Scott, 1964).

Tabel 2 Spektrum UV-Vis beberapa senyawa antrakuinon (Scott, 1964)

Senyawa	Pita 1	Pita 2	Pita 3	Pita 4	Pita 5	Pita 6	Pita 7
 Karyofanol	225	225	277,5	287,5	430	-	-
 Emodin	222	252	265	289	417	-	521-30
 6-hidroksi emodin	222,5	250,5	266	289,5	436	-	510-28

Tabel 2 Spektrum UV-Vis beberapa senyawa antrakuinon (Scott, 1964) (Lanjutan)

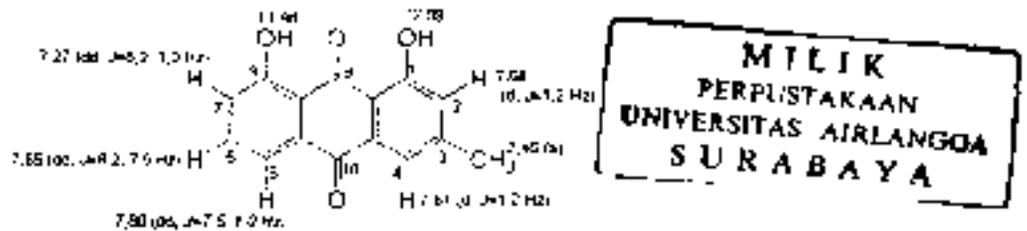
Senyawa	Pita 1	Pita 2	Pita 3	Pita 4	Pita 5	Pita 6	Pita 7
 Antraquinol	213	241 245	-	287	414	-	-
 Islandicin	232	252,5	-	289	190-402 466-70	492 513	527
 Helianthosporin	234	255	-	289	405-15	480 490 510	52
 Carthagenin	244	255	280	298	-	488,5 508	515- 255
 Cynodanin	221 247,5	-	-	296	-	518	545 558
 Retigalic Acid	21,3222	258	-	295	3-19 4-18	-	-
 Asperthecin	237,5	262,5	-	286,5	318	484 510	515- 55

3.6.2 Spektroskopi resonansi magnet inti proton (^1H -RMI)

Spektroskopi ^1H -RMI didasarkan pada pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik pada daerah frekuensi radio 4-6000 MHz atau panjang gelombang 75-0,5 m oleh partikel (inti atom) yang berputar didalam medan magnet. Identifikasi dengan menggunakan spektroskopi ^1H -RMI sangat berguna untuk menentukan struktur senyawa organik, karena spektrum yang dihasilkan berupa puncak-puncak yang menunjukkan letak dan jumlah proton. Pelarut yang dipakai untuk melarutkan cuplikan harus dipilih pelarut yang tidak mempunyai proton. Beberapa pelarut yang tidak mengandung proton seperti: CS_2 , CD_3Cl , CCl_4 , CD_3COCD_3 (Hendrayana, 1994). Sebagai standar adalah sinyal residu proton untuk ^1H -RMI dan pelarut terdeuterasi untuk ^{13}C -RMI. Pada spektrum ^1H -RMI, garis vertikal menunjukkan absorbansi sedang garis horizontal disebut chemical shift atau dalam satuan ppm. Biasanya ditandai dari 0 sampai 10 (dari kanan ke kiri) (Hendrayana, 1994).

Pergeseran kimia spektroskopi ^1H RMI untuk senyawa antrakunon pada umumnya terdapat proton aromatis yang saling berkopling orto pada pergeseran kimia 7,65 - 7,9 ppm ($J = 7 - 9$ Hz). Selain itu juga ditemukan proton yang saling berkopling meta dengan pergeseran kimia 6,4 - 7,9 ppm ($J = 1 - 3$ Hz). Jika digunakan pelarut kloroform maka akan diperoleh proton dari pelarut dengan pergeseran kimia 7,25 ppm. Disamping itu juga terdapat proton alifatik dari substituen metil dengan pergeseran kimia 2,10 - 2,47 ppm dan kadang juga terdapat proton dari substituen metoksi dengan pergeseran kimia 3,70 - 4,07 ppm (Lee, 2001; Uno, 2001, Meselhy, 2003).

Berikut ini adalah contoh harga pergeseran kimia untuk senyawa krisofanol (Lee, 2001)



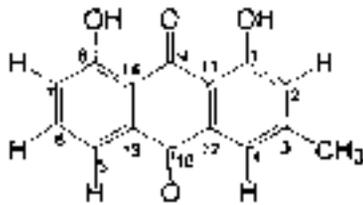
Pada senyawa krisofanol dengan struktur terlihat diatas menunjukkan signal $^1\text{H-NMR}$. Untuk H-2 menunjukkan signal dengan pergeseran kimia 7,08 ppm ($J=1,2$ Hz) saling berkopling meta dengan H-4 dengan pergeseran kimia 7,61 ppm ($J=1,2$ Hz) H-5, H-6 dan H-7 saling mengadakan kopling dalam sistem benzena sehingga signal yang muncul doublet doublet. H-5 dan H-6 saling berkopling orto, H-5 dan H-7 saling berkopling meta sedangkan H-6 dan H-7 saling berkopling orto. Pergeseran kimia H-5 7,80 ppm ($J=7,5$ dan 1,0 Hz), H-6 7,65 ppm ($J=8,2$ dan 7,5 Hz), H-6 7,27 ppm ($J=8,2$ dan 1,0 Hz) H-5 lebih deshielding dari pada H-6 dan H-7 karena H-5 lebih dekat dengan gugus karbonil. Signal yang muncul untuk substituen metil adalah singlet karena tidak memiliki proton tetangga, dengan pergeseran kimia 2,45 ppm. Sedangkan substituen OH muncul pada pergeseran kimia 12,09 ppm dan 11,98 ppm.

3.6.3 Spektroskopi resonansi magnet inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$)

Spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ sebagai pelengkap spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, yang dapat memberikan keterangan langsung mengenai jumlah atom karbon dan sifat kerangka karbon molekul tersebut. Pelarut yang digunakan serupa pada $^1\text{H-NMR}$, tetapi jangkauan resonansi $^{13}\text{C-NMR}$ jauh lebih besar, yaitu 0 - 200 ppm, sedangkan pada $^1\text{H-NMR}$ 0 - 10

ppm. Spektrum ^{13}C -RMI jauh lebih teresolusi dan umumnya setiap karbon dalam molekul dapat ditetapkan sinyalnya (Harbome, 1987).

Atom karbon yang terdapat pada senyawa antrakuinon biasanya C tersier dan C kuartener. Contoh pergeseran kimia ^{13}C -RMI senyawa krisofanol (Nagem, 1997).



Karbon yang terikat pada nomor 1, 3, 6, 8, 9, dan 10 merupakan karbon kuartener karena tidak mengikat atom hidrogen. Sedangkan karbon yang terikat pada nomor 2, 4,

5, dan 7 merupakan karbon tersier karena hanya mengikat satu atom hidrogen. Pergeseran kimia ^{13}C -RMI senyawa emodin dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3 Pergeseran kimia ^{13}C -RMI untuk senyawa krisofanol (Nagem, 1997)

Nomor atom C	Pergeseran kimia δ (ppm)
C-1	161,6
C-2	123,6
C-3	147,5
C-4	120,3
C-5	108,7
C-6	165,6
C-7	107,6
C-8	164,7
C-9	189,8
C-10	181,9
C-11	134,8
C-12	109,0
C-13	113,1
C-14	132,7
-CH ₃	20,9

3.7 Antioksidan dan Senyawa Oksigen Reaktif

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Oleh karena itu, radikal bebas mempunyai sifat tidak stabil, paramagnetik dan sangat reaktif. Sifat radikal bebas mirip oksidan yang mempunyai kecenderungan untuk menarik elektron. Jadi radikal bebas adalah oksidan tetapi tidak semua oksidan adalah radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya daripada oksidan yang bukan radikal karena radikal bebas dapat membentuk radikal bebas baru dan membentuk reaksi berantai (Joyeux, 1995). Radikal bebas ini berbahaya karena amat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas ini dapat berasal dari dalam tubuh maupun dari luar tubuh. Jika radikal bebas ini sudah terbentuk dalam tubuh maka akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas baru yang akhirnya jumlahnya terus bertambah. Selanjutnya akan menyerang sel-sel tubuh, sehingga terjadi kerusakan jaringan yang akan mempercepat proses penuaan bahkan dapat menyebabkan berbagai penyakit yang berbahaya seperti kanker, arterosklerosis, inflamasi, asam urat, jantung koroner, katarak dan diabetes mellitus (Miller, 1996, Haraguchi, 1996, Cuendet, 1997).

Radikal bebas dihasilkan karena adanya proses metabolisme dan kehidupan. Radikal dapat dengan mudah terbentuk oleh senyawa yang siap memberikan elektron tunggal, contoh asam lemak takjenuh. Radikal juga dihasilkan oleh proses lain seperti radiasi ionisasi, asap dan polutan, herbisida dan pestisida, dan dalam makanan dengan kadar lemak tinggi.

Radikal bebas merusak molekul makro pembentuk sel, yaitu protein, karbohidrat, lemak dan asam deoksiribonukleat (DNA). Akibatnya sel menjadi rusak, mati atau bermutasi. Peristiwa ini menjadi salah satu penyebab berbagai penyakit degeneratif

seperti kanker dan penuaan sel. Pada sel kulit, radikal bebas akan merusak senyawa lemak pada membran sel, sehingga kulit kehilangan ketegangannya dan muncullah keriput. Jenis senyawa oksigen reaktif diantaranya adalah radikal superoksida ($O_2^{\bullet-}$), $^{\bullet}OOH$, radikal hidroksi (OH^{\bullet}), radikal peroksida (ROO^{\bullet}), hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen diatomik (O_2), ozon (O_3). Radikal yang paling berbahaya adalah radikal hidroksi

Kerusakan yang disebabkan radikal hidroksi dan spesies oksigen reaktif (ROS) dapat terjadi pada protein dan asam nukleat khususnya DNA. Protein sangat mudah mengalami kerusakan oksidatif, khususnya pada daerah dimana sulfur yang mengandung asam amino. DNA dapat mengalami kerusakan oksidatif pada kedua basa nukleat (pembawa kode genetik) dan pada gula yang terikat pada basa. Kerusakan oksidatif dari DNA dalam degradasi basa, pemutusan ikatan DNA oleh oksidasi dari ikatan gula, atau cross-link dari DNA ke protein. Kerusakan itu dapat menyebabkan mutasi atau kematian sel.

Semua sel dalam tubuh, mempunyai enzim yang dapat menangkai serangan radikal bebas yaitu superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GSH Px), katalase, serta non enzim yaitu senyawa protein kecil glutathion. Seiring dengan bertambahnya usia produksi enzim ini akan makin berkurang, sehingga tidak dapat menangkai radikal yang ada didalam tubuh. Untuk itu diperlukan antioksidan tambahan.

Antioksidan adalah suatu zat yang mudah teroksidasi dan mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi substrat serta dapat bersifat sebagai penangkai radikal bebas, atau penghambat elektron (Cuendet, 1997). Antioksidan ada dua jenis yaitu antioksidan alami dan sintetik. Antioksidan alami misalnya likopene, lutein, vitamin C, vitamin E, β karoten, flavonoid, terpen lakton dan antrakuinon (Gonda, 2000):

Panichayupakaranant, 2004). Sedangkan antioksidan sintetik misalnya asam trobarbiturat (TBA), butil hidroksitoluen (BHT), butil hidroksi anisol (BHA), dan t-butilhidrokinon (TBHQ) (Haraguchi, 1996; Panichayupakaranant, 2004).

Antraquinon merupakan senyawa bahan alam yang mempunyai aktivitas biologis sebagai antiradikal bebas yang dapat menangkap senyawa oksigen reaktif. Aktivitas antiradikal bebas akan menurun atau tidak aktif sama sekali bila gugus hidroksi disubstitusi oleh gugus metil, metoksi maupun gugus lain. Semakin banyak gugus hidroksi maka semakin meningkat aktivitas antiradikal bebasnya (Cos, 1998).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan senyawa antraquinon dengan mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). DPPH (53) merupakan radikal bebas yang stabil dengan delokalisasi elektron yang berlebih. Delokalisasi ini meningkatkan warna violet dan absorbansi dalam etanol sekitar 517 nm. Ketika DPPH bersama dengan senyawa lain yang siap memberikan atom hidrogen, maka akan terbentuk DPPH non radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) (54), ditandai dengan hilangnya warna violet menjadi kuning pucat dari pikril yang masih ada (Molyneux, 2001).

Reaksi antara DPPH radikal (Z^*) dengan senyawa pendonor hidrogen (AH) :



DPPH radikal (Z^*) bereaksi dengan senyawa pendonor hidrogen menghasilkan DPPH non radikal (ZH) dan terbentuk radikal bebas baru (A^*). Radikal ini akan mengalami reaksi lebih lanjut dan mengendalikan keseluruhan stoikiometri. Radikal A^* akan mengalami reaksi berantai dan akan membentuk senyawa A-A.

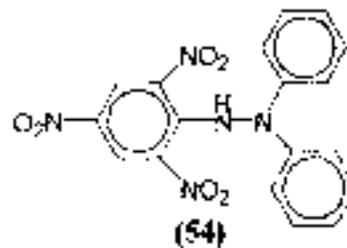
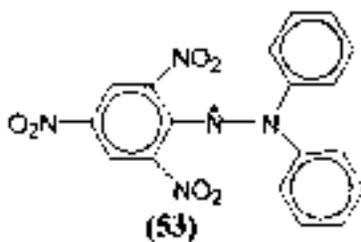
Parameter yang digunakan untuk uji ini yaitu IC_{50} (Inhibitor Concentration yang memberi efek 50%). Absorbansinya diukur pada tiga panjang gelombang yaitu 497 nm, 517 nm dan 537 nm. Aktivitas antioksidan senyawa antrakuinon terhadap pereaksi DPPH dapat dihitung absorbansinya sebagai berikut :

$$\text{Absorbansi hitung } \lambda_{517 \text{ nm}} = A_{517} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$

Perhitungan kapasitas antioksidan sebagai persen peredaman absorbans menggunakan rumus sebagai berikut

$$\% \text{ Peredaman DPPH} = \left[1 - \frac{\text{Absorbansi hitung bahan uji}}{\text{Absorbansi hitung DPPH (standar)}} \right]$$

Analisis data daya hambat IC_{50} (Inhibitor Concentration 50%) ditentukan berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa. Jika $IC_{50} < 1000$ ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Cos, 1998). Struktur DPPH adalah sebagai berikut :



3.8 *Artemia salina* L.

Artemia salina merupakan Crustacea dengan ukuran yang kecil. Hewan ini ditemukan pertama kali oleh Scholseer pada tahun 1755 di danau dengan salinitas yang tinggi dan diberi nama *Artemia* sp. Oleh Linnaeus, nama *Artemia* dilengkapi menjadi *Artemia salina* karena mempunyai daya toleransi yang tinggi terhadap salinitas.

3.8.1. Morfologi *Artemia salina* L.

Telur *Artemia salina* atau disebut *Artemia* saja berbentuk hufat dengan berat hanya 3,6 µg dan diameternya sekitar 300 µm. Saat menetas, beratnya bertambah menjadi 15 µg dengan panjang 0,4 mm. *Artemia* pada stadium awal ini disebut naupli instar I. Pada stadium II panjangnya mencapai 0,6 mm dan pada stadium III bertambah menjadi 0,7 mm. *Artemia* yang sudah dewasa panjang tubuhnya berkisar 1-2 cm dengan berat 10 mg. *Artemia* disebut filter feeder karena cara makannya dengan menyaring bahan apa saja yang ada di sekitarnya. Ukuran makanan yang dapat dimakan harus lebih kecil dari 600 µm (Elarefa, F., 1997).

3.8.2. Siklus Hidup *Artemia salina* L.

Dalam siklus hidupnya, proses reproduksi dilakukan secara generatif. Dalam proses generatif dihasilkan telur yang berbentuk butiran halus. Apabila berada di tempat yang kering atau di air yang salinitasnya tinggi, telur ini tetap berada dalam keadaan kista (tidur). Apabila kista tersebut direndam dalam air dengan salinitas 30-35 maka akan terjadi hidrasi. Setelah 24 jam, membran luar akan pecah dan kista menetas menjadi

embrio. Beberapa jam kemudian embrio berkembang menjadi naupli instar I dan dapat berenang bebas.

Instar I ini akan berganti kulit menjadi instar II, demikian seterusnya sampai 15 kali. Selanjutnya akan berkembang menjadi individu dewasa. Perkembangan *Artemia* mulai dari proses penetasan sampai menjadi dewasa membutuhkan waktu sekitar 7-10 hari. Perkembangan *Artemia* sangat dipengaruhi oleh suhu, pH dan salinitas. Suhu optimum untuk pertumbuhan sekitar 23-30^o C dan pH optimumnya 8-8,5. Pada saat menetas, salinitas optimumnya 35 dan setelah menetas dinaikkan menjadi 80 (Harefa, F., 1997).

3.8.3 *Artemia salina* L. Sebagai Bioindikator

Prinsip penggunaan *Artemia* sebagai bioindikator dari suatu efek biologis didasarkan bahwa suatu senyawa aktif akan toksik dalam sel hidup apabila konsentrasinya tinggi dan akan berkehasrat sebagai obat dalam dosis yang sesuai. Pengujian dengan menggunakan *Artemia* hanya merupakan uji pendahuluan dan dikenal dengan sebutan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Bila dalam uji ini, suatu senyawa menunjukkan aktivitas biologi maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut.

Pemanfaatan *Artemia* sebagai bioindikator dilakukan pertama kali oleh Meyer dan Ferrigni di institut kanker Amerika pada tahun 1982. Penelitian dilakukan pada 41 spesies dari famili Euphorbiaceae. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 18 tanaman mempunyai aktivitas biologi (Meyer, 1982).

Metode BSLT sering digunakan untuk uji biologi karena prosedurnya mudah, cepat dan ekonomis, tidak membutuhkan laboratorium khusus, pemakaian sampel sedikit

dan bersifat umum. Penggunaan metode BSLT tidak hanya terbatas sebagai uji pendahuluan farmakologi ekstrak tanaman, tetapi juga dapat digunakan sebagai uji untuk logam berat, racun sianobakteri, pestisida dan bahan kedokteran gigi (Carballo, 2002).

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Desember 2004 di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya.

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan berupa serbuk kulit batang tumbuhan *Senna multijuga* yang diperoleh dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur

4.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, aseton, n-heksana, kloroform, etil asetat, benzena, eter, magnesium sulfat anhidrat, akuades, pelat silika gel GF₂₅₄, silika gel GF₆₀, silika gel GF₂₅₄, pereaksi cerium sulfat, pereaksi DPPH, dan sea salt (garam laut). Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk keperluan ekstraksi adalah yang berkualitas teknis dan sudah didestilasi sedangkan untuk keperluan analisis dan pemurnian digunakan bahan yang berkualitas pro analisis (p.a).

4.2.3 Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat kromatografi kolom cair vacuum, seperangkat alat kromatografi kolom cepat, seperangkat alat destilasi, seperangkat alat penguap putar, bejana kromatografi lapis tipis, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Alat-alat yang digunakan untuk identifikasi senyawa yang telah dipisahkan dan dimurnikan adalah Fisher Johns melting point apparatus, spektrofotometer UV-VIS Beckman DU 7500, spektrofotometer FTIR 5300, ¹H-NMR Bruker AM 300, dan ¹³C-NMR Bruker AM 400.

4.3 Prosedur Kerja

4.3.1 Penyediaan bahan penelitian

Sampel tanaman yang berupa kulit batang *Cassia multijuga* dibersihkan dari pengotor-pengotornya, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari. Setelah itu dipotong-potong dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk.

4.3.2 Ekstraksi dan isolasi senyawa fenolik

Serbuk kulit batang *cassia multijuga* sebanyak 4 kg dimaserasi menggunakan pelarut aseton selama 3 x 24 jam sebanyak tiga kali pada suhu kamar. Kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya. Penggunaan pelarut aseton dalam maserasi bertujuan untuk mengurangi adanya resin-resin yang dapat mengganggu dalam isolasi dan pemurnian senyawa antrakuinon. Ekstrak aseton disaring dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh ekstrak kental

dan ditambahkan air sebanyak 10% dari volume semula. Kemudian diekstraksi dengan n-heksan sebanyak tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa antrakuinon dan senyawa semi polar lainnya. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dikeringkan menggunakan magnesium anhidrat selama 24 jam kemudian disaring dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh ekstrak etil asetat kental.

4.3.3 Pemisahan dan pemurnian senyawa fenolik

Jumlah komponen senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etil asetat ditentukan dengan kromatografi lapis tipis dengan berbagai macam eluen. Eluen yang menghasilkan komponen terbanyak serta memberikan jarak antar noda yang baik menunjukkan pemisahan terbaik. Untuk penampakan noda digunakan lampu UV dan pereaksi $CeSO_4$. Berdasarkan kromatografi lapis tipis didapat pelarut yang sesuai untuk pemisahan komponen senyawa kimia pada ekstrak etil asetat. Selanjutnya, pada ekstrak etil asetat dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom cair vacum. Ekstrak kental etil asetat dilarutkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian diserapkan pada silika gel G₆₀. Silika gel yang mengandung senyawa tersebut dimasukkan kedalam kolom yang terisi silika gel GF₂₅₄. Elusi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan ditingkatkan gradien kepolarannya. Pada proses pemisahan ini akan diperoleh beberapa fraksi dan masing-masing fraksi yang ditampung dilakukan uji KLT. Fraksi-fraksi yang menghasilkan noda dengan R_f sama digabung. Kemudian pelarut diuapkan

menggunakan rotary vacuum evaporator. Jika belum diperoleh senyawa murni maka dilakukan pemisahan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom cepat atau metode kromatografi lainnya yang sesuai. Proses pemisahan dengan kromatografi diatas dilakukan berulang kali sampai diperoleh satu noda pada plat K.F. Fraksi dengan satu noda yang diperoleh dari proses pemisahan, selanjutnya dimurnikan melalui proses rekristalisasi. Kemudian dilanjutkan dengan uji K.F. dengan tiga macam eluen yang berbeda, uji titik leleh dan analisis spektroskopi. Skema kerja dapat dilihat pada gambar 4

4.4. Identifikasi Senyawa fenolik

4.4.1 Uji sifat fisika senyawa fenolik

Senyawa yang diperoleh ditentukan titik lelehnya dengan menggunakan *melting points fisher Johns apparatus* dan diukur suhunya pada saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan.

4.4.2 Analisis spektroskopi senyawa fenolik

4.4.2.1 Spektroskopi UV - VIS

Senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 mg dilarutkan dalam metanol sampai volume 10 mL. Kemudian diukur panjang gelombang maksimum (λ maks) menggunakan spektroskopi UV - VIS. Efek batokromik diamati dengan penambahan NaOH (Harborne, 1987).

4.4.2.2 Spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-RMI}$)

Senyawa hasil isolasi dalam jumlah tertentu dilarutkan dalam pelarut terdeuterasi yang sesuai. Analisis proton RMI diukur pada pergeseran δ - 14 ppm (Markham, 1988).

4.4.2.3 Spektroskopi resonansi magnet inti karbon ($^{13}\text{C-RMI}$)

Pada $^{13}\text{C-RMI}$ senyawa hasil isolasi sebanyak 10 - 50 mg dilarutkan dalam dalam pelarut terdeuterasi yang sesuai. Selanjutnya ditentukan jumlah dan lingkungan karbon pada δ - 200 ppm (Markham, 1988).

4.5 Uji Antioksidan (TLC-Autografi dan Spektrometri)

Senyawa murni hasil isolasi dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dan dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil KLT autograf radikal bebas (kromatogram) diberi pereaksi DPPH 0,004% dalam etanol agar noda hasil KLT nampak. Uji positif ditandai adanya warna kuning. Penentuan IC_{50} aktivitas antioksidan dengan membuat larutan senyawa antrakuinon murni dalam berbagai konsentrasi yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, yang kemudian ditambahkan pereaksi DPPH 0,004% dalam pelarut etanol (Jojoux, 1995).

Larutan DPPH sebanyak 3,9 mL ditambahkan etanol 0,1 mL dicatat absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 497nm, 517 nm dan 537 nm (sebagai larutan standar). Senyawa antrakuinon dengan berbagai konsenuasi juga ditentukan absorbansinya.

Observasi aktivitas antioksidan senyawa terhadap pereaksi DPPH dapat dihitung absorbansinya sebagai berikut

$$\text{Absorbansi hitung } \lambda_{517 \text{ nm}} = A_{517} - \frac{A_{627} + A_{517}}{2}$$

Perhitungan kapasitas antioksidan sebagai persen peredaman absorbans menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Peredaman DPPH} = \left[1 - \frac{\text{Absorban hitung bukan uji}}{\text{Absorban hitung DPPH (standar)}} \right]$$

Analisis data daya hambat IC_{50} (Inhibitor Concentration 50%) ditentukan berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa. Jika $IC_{50} < 100$ ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Cos, 1998).

4.6. Uji toksisitas dengan uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

4.6.1 Penetasan telur *Artemia salina* L.

Telur *Artemia salina* Ditempatkan pada wadah yang berisi air laut buatan (3,6 g garam laut/sea salt yang dilarutkan dalam 100 mL akuades). Telur ditempatkan pada bagian wadah yang terlindung dari cahaya sedangkan pada bagian lain dari wadah diberi cahaya. Setelah 48 jam, telur *Artemia salina* akan menetas membentuk naupli. Naupli ini selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas setelah dipisahkan dari cangkang dan pengotor lainnya dengan menggunakan pipet (Meyer, 1982)

4.6.2 Uji toksisitas

Uji BSL.1 ini dilakukan pada senyawa murni hasil isolasi. Sampel ditimbang sebanyak 1 mg, kemudian dilarutkan dalam 10 μ l. etanol dan 10 μ l. tween 80 karena sukar dalam larut air. Setelah itu ditambahkan 980 μ l. air laut dan diaduk hingga homogen sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1.000 ppm. Dari larutan induk 1.000 ppm ini dibuat larutan dengan konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, dan 31,25 pp masing-masing dibuat replikasi 3 kali.

Larutan kontrol merupakan semua bahan yang digunakan dalam larutan uji selain senyawa murni yang akan ditentukan toksisitasnya. Tujuan dari pembuatan larutan kontrol adalah untuk melihat pengaruh lain yang menyebabkan kematian *Artemia salina* selain senyawa yang diuji.

Selanjutnya ke dalam larutan sampel dan kontrol ditambahkan masing-masing 8-15 ekor benur udang *Artemia salina* hasil penetasan, kemudian dibiarkan kontak dengan larutan tersebut selama 24 jam. Jumlah benur udang yang mati dihitung dan dicatat untuk masing-masing konsentrasi larutan sampel dan kontrol. Data kontrol yang baik jika tidak ada benur udang yang mati. Data kematian benur udang pada masing-masing konsentrasi ini digunakan untuk analisis LC₅₀ dengan menggunakan program SPSS (Statistic Program for Social Science).

4.6.3. Penentuan LC50

Data yang diperoleh dari hasil uji bioaktivitas diproses dengan menggunakan program SPSS untuk menentukan harga LC₅₀. Harga LC₅₀ menyatakan besarnya konsentrasi larutan uji yang dapat mematikan 50% dan jumlah populasi dalam jangka waktu tertentu. Hasil uji yang diperoleh dapat memberikan informasi tentang adanya toksisitas senyawa. Senyawa dinyatakan toksik jika harga LC₅₀ < 1.000 µg/ml. (Meyer, 1982).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa

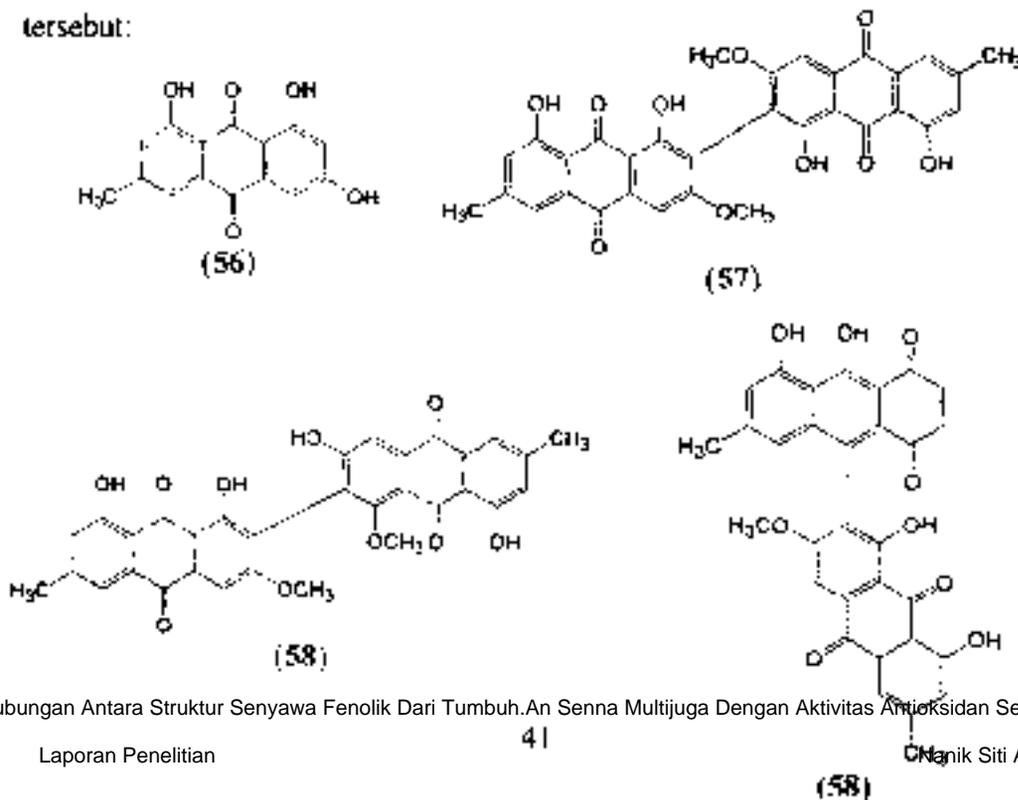
Serbuk kulit batang *Senna multijuga* sebanyak 4 Kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan aseton selama 3 X 24 jam sebanyak dua kali pada suhu kamar. Penggunaan pelarut aseton bertujuan untuk menghilangkan resin-resin yang terdapat dalam *Senna multijuga* yang dapat mengganggu dalam proses ekstraksi dan isolasi. Proses maserasi diulang dua kali dengan perkiraan sebagian besar komponen senyawa dapat terisolasi. Kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya.

Filtrat dipekatkan dengan penguap putar dan diperoleh ekstrak aseton. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam metanol-air 10 %. Larutan dipartisi dengan n-heksana sebanyak tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa nonpolar lainnya yang larut dalam n-heksan. Fraksi metanol-air sisa dipartisi lebih lanjut dengan etil asetat sebanyak tiga kali. Pada fraksi etil asetat inilah senyawa antrakuinon berhasil diisolasi. Fraksi etil asetat selanjutnya dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat selama 24 jam, disaring dan dipekatkan dengan penguap putar sehingga didapatkan fraksi etil asetat total sebanyak 163 g.

Fraksi etil asetat ini selanjutnya diidentifikasi jumlah komponen senyawa yang terdapat di dalamnya dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Hasil uji KLT memperlihatkan bahwa terdapat sekitar delapan spot yang

berpendar dibawah lampu UV dan setelah disemprot dengan penampak noda CeSO_4 . Berdasarkan panduan hasil TLC ini, komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat dipisahkan dan dimurnikan dengan berbagai teknik kromatografi, meliputi kromatografi cair vakum (KCV), kromatografi kolom gravitasi (KKG), dan kromatografi kolom cepat (KKC). Senyawa murni dengan noda tunggal hasil proses tersebut, dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. Berdasarkan serangkaian proses yang telah dilakukan pada fraksi etil asetat tersebut berhasil diperoleh empat senyawa fenolik golongan antrakuinon. Keempat senyawa tersebut terdiri atas satu monomer antrakuinon yang dikenal dengan nama emodin (55) dan tiga dimer antrakuinon yaitu 7,7'-bisecison atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7'(fiscion-7'-il)-9,10-antrakuinon (56), 1',6'-dihidroksi-3'-metil-8'-metoksi-7'(fiscion-7'-il)-9',10'-antrakuinon (57), serta 5,10-dihidroksi-7-metil-9'(fiscion-7'-il)-1,4-antrakuinon (58). Berikut ini adalah struktur dan keempat senyawa tersebut:



5.2. Pemisahan, pemurnian dan identifikasi masing-masing senyawa

5.2.1. Senyawa emodin (senyawa I)

5.2.1.1 Pemisahan dan pemurnian

Fraksi etil asetat sebanyak 63 g dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Guna memudahkan proses selanjutnya, fraksi ini dibagi dua yaitu 43 g dipisahkan dengan KKG₁ dan sisanya (20 g) dengan KKG₂ dengan eluen n-heksan-aseton (9,5:0,5). Proses pemisahan ini menghasilkan 23 fraksi dari KKG₁ dan 14 fraksi dari KKG₂ dan masing-masing dikelompokkan menjadi 4 gabungan fraksi (A, B, C, dan D). Tiap-tiap fraksi diuji dengan KLT dan hasil uji menunjukkan bahwa fraksi A (400 mg) dari KKG₁ dan B (190 mg) dari KKG₂ memperlihatkan harga R_f yang sama. Fraksi A dan B digabung, kemudian dipisahkan lebih lanjut menggunakan 2 kali kromatografi kolom modifikasi dengan eluen n-heksan-aseton (9:1) dan n-heksan-kloroform (1:1) sehingga didapatkan 4 fraksi (E, F, G, dan H). Fraksi G (80 mg) dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen n-heksan-etil asetat (9:1) dan hasil uji KLT menunjukkan bahwa fraksi (6-19) mempunyai spot tunggal. Gabungan fraksi dengan spot tunggal ini selanjutnya diuji dengan KLT menggunakan tiga sistem eluen yang berbeda untuk menunjukkan kemurnian senyawa. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa senyawa I yang berhasil diisolasi adalah senyawa tunggal karena memberikan satu spot. Senyawa I yang diperoleh berupa serbuk berwarna kuning sebanyak 70 mg.

5.2.1.2 Analisis spektroskopi

Senyawa I berupa padatan berwarna kuning sebanyak 70 mg dengan t.l. 142 °C (terutar).

Spektrum UV-VIS memperlihatkan serapan maksimum pada λ_{maks} (Met H) 216, 282, dan 448 nm. Efek batokromik dengan penambahan NaOH memperlihatkan serapan maksimum pada λ_{maks} (Met H) 307, 401, dan 521 nm.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (aseton- d_6) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ (ppm) 2,43(3H, s), 6,62(1H, d, $J=1,5$ Hz), 7,08(1H, s), 7,19(1H, d, $J=1,5$ Hz), 7,50(1H, s), 9,74(1H, s), 12,02(1H, s), dan 12,14(1H, s). Sedangkan $^{13}\text{C-NMR}$ (aseton- d_6) memberikan harga pergeseran kimia pada δ (ppm) 21,8; 108,8; 108,8; 109,7; 121,4; 124,9; 134,2; 136,4; 136,9; 149,5; 163,2; 166,2; 166,4; 182,2, dan 191,7.

Spektrum UV-VIS memberikan serapan pada λ_{maks} yang khas untuk senyawa golongan antraquinon yaitu 3 atau 4 pita muncul pada λ_{maks} 215 dan 300 nm dan 1 pita lainnya pada λ_{maks} diatas 430 nm (Harborne, 1987). Adanya efek batokromik setelah penambahan NaOH (sekitar 25 nm) menunjukkan bahwa **senyawa I** mempunyai gugus hidroksi benzen (fenolik) (Harborne, 1987).

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ memperlihatkan adanya 12 sinyal yang mewakili 15 atom karbon. Lima belas atom karbon tersebut terdistribusi ke dalam 9 atom karbon aromatis (δ 108,8; 108,8; 109,7; 121,4; 124,9; 134,2; 136,4; 136,9, dan 149,5 ppm), 2 atom karbon karbonil (δ 182,2; dan 191,7 ppm), 3 atom karbon oksiaril (δ 163,2; 166,2; dan 166,4 ppm), dan 1 atom karbon metil (δ

21,8 ppm) Berdasarkan data tersebut, diduga bahwa senyawa I adalah suatu monomer antrakuonon yang mengikat 3 gugus hidroksil dan 1 gugus metil.

Dugaan tersebut diperkuat oleh data $^1\text{H-NMR}$ yang memperlihatkan adanya 4 sinyal proton aromatik pada pergeseran kimia (δ) 7,08(1H, s, H-2), 7,50(1H, s, H-4), 7,19(1H, d, $J=1,5$ Hz, H-5), dan 6,62(1H, d, $J=1,5$ Hz, H-7). Proton H-2 yang terletak diantara 2 gugus OH kurang deshielding dibanding proton H-4 yang terletak diantara karbon yang mengikat metil dan karbon kuartener. Adanya 2 sinyal proton masing-masing doublet pada δ 6,62 dan 7,19 ppm dengan $J=1,5$ Hz menunjukkan bahwa posisi proton aromatik tersebut pada posisi meta. Di samping itu juga terdapat 3 sinyal proton hidroksi pada δ 9,74(1H, s), 12,02(1H, s), dan δ 12,14(1H, s) serta satu sinyal proton singlet yang mewakili 3 proton dari substituen metil pada δ 2,43(3H, s).

Untuk memastikan adanya kopling meta dari dua sinyal proton aromatik yang ada dilakukan pengukuran spektrum 2D $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY seperti terlihat pada gambar 4. Sedangkan pengukuran spektrum 2D $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY digunakan untuk mengetahui hubungan antara proton dan karbon ikatan. Dari spektrum ini terlihat bahwa atom karbon pada δ 21,8 ppm (CH_3) berikatan dengan 3 atom H pada δ 2,43 ppm, atom karbon pada δ 124,9 ppm (C-4) berikatan dengan atom H pada δ 7,50 ppm, dan atom karbon pada δ 134,2 ppm (C-2) berikatan dengan atom H pada δ 7,08 ppm. Disamping itu juga diketahui bahwa atom C pada δ 108,8 ppm berikatan masing-masing dengan 1 atom H pada δ 7,19 ppm (H-5) dan atom H pada δ 6,62 ppm (H-7).

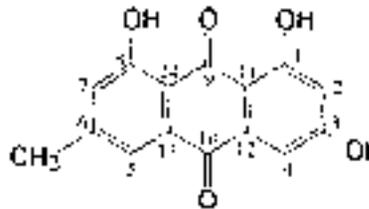
Gambar 4. Spektrum 2D ^1H - ^1H COSY

Hubungan antara proton dan karbon pada spektrum COSY terlihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hubungan antara proton dan karbon pada spektrum ^1H - ^1H COSY

No karbon	δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	^1H - ^1H COSY
1	163,7	12,02 (1H, s)	-
2	134,2	7,08 (1H, s)	-
3	149,5	-	-
4	124,9	7,50 (1H, s)	-
5	108,8	7,19 (1H, d, J = 1,5 Hz)	H-5/7
6	166,4	9,74 (1H, s)	-
7	108,8	6,62 (1H, d, J = 1,5 Hz)	H-7/5
8	166,2	12,14 (1H, s)	-
9	191,7	-	-
10	182,2	-	-
11	136,9	-	-
12	109,7	-	-
13	121,4	-	-
14	136,9	-	-
6- CH_3	21,8	2,43 (1H, s)	-

Berdasarkan data spektrum UV-VIS, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, ^1H - ^1H COSY, dan ^{13}C - ^1H COSY dapat disarankan bahwa **senyawa I** adalah suatu monomer antrakunon yang dikenal dengan nama emodin yang memiliki struktur seperti terlihat berikut ini :



Kesimpulan tersebut lebih diperkuat lagi dengan membandingkan harga geseran kimia ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR dari **senyawa I** hasil isolasi dengan emodin yang telah dilaporkan sebelumnya seperti terlihat pada tabel 5 dan tabel 6

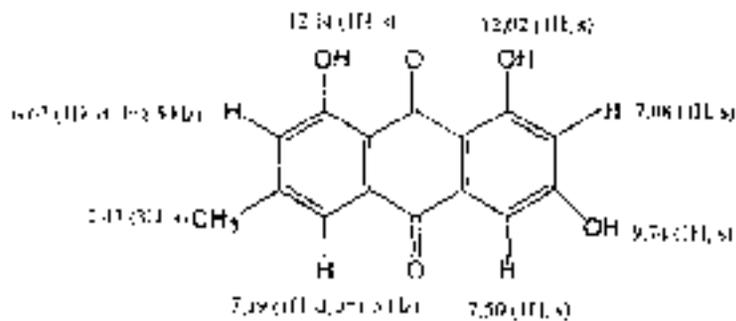
Tabel 5. Perbandingan harga geseran kimia spektrum ^1H -NMR **senyawa I** dengan emodin yang telah dilaporkan oleh Meselhy (2003) dan Lee (2001).

Nomor Proton	Senyawa A (aseton- d_6)	Emodin dalam $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH}-d_4$ (Meselhy, 2003)	Emodin dalam aseton- d_6 (Lee, 2001)
1	12,02 (1H, s)	-	12,09 (1H, s)
2	7,08 (1H, s)	7,06 (1H, s)	7,14 (1H, d, $J=1,9$)
3	9,74 (1H, s)	-	-
4	7,50 (1H, s)	7,56 (1H, br s)	7,57 (1H, d, $J=1,9$)
5	7,19 (1H, d, $J=1,5$)	7,21 (1H, d, $J=2,5$)	7,26 (1H, d, $J=2,5$)
7	6,62 (1H, d, $J=1,5$)	6,58 (1H, d, $J=2,5$)	6,66 (1H, d, $J=2,5$)
8	12,4 (1H, s)	-	12,21 (1H, s)
CH_3	2,43 (1H, s)	2,44 (1H, s)	2,47 (1H, s)

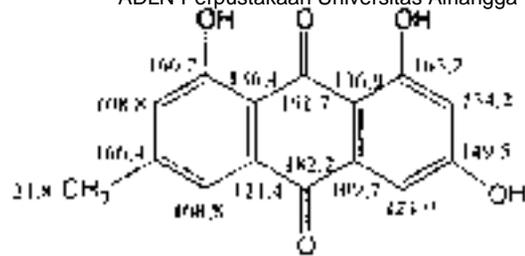
Tabel 6 Perbandingan harga geseran kimia spektrum ^{13}C -NMR senyawa **1** dengan emodin yang telah dilaporkan oleh Meselhy (2003).

Nomor Karbon	Senyawa A (aseton- d_6)	Emodin dalam $\text{CDCl}_3 + \text{MeOH-}d_4$ (Meselhy, 2003)
1	163,2	161,6
2	134,2	123,6
3	149,5	147,5
4	124,9	120,3
5	108,8	108,7
6	166,4	165,6
7	108,8	107,6
8	166,2	164,7
9	191,7	189,8
10	182,2	181,9
11	136,9	134,8
12	109,7	109,0
13	121,4	113,1
14	136,9	132,7
6- CH_3	21,8	20,9

Dari kedua tabel tersebut diatas, terlihat bahwa harga geseran kimia ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR dari senyawa **1** memiliki kemiripan yang signifikan dengan emodin. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa senyawa **1** hasil isolasi adalah emodin. Posisi-posisi proton dan karbon senyawa emodin hasil isolasi dapat diaktualisasikan pada gambar 5 dan gambar 6.



Gambar 5 Geseran kimia proton pada senyawa emodin hasil isolasi



Gambar 6. Geseran lima karbon pada senyawa emodin hasil isolasi

5.2.2. Senyawa 7,7'-bifision atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fision-7'-il)-9,10-antrakuinon (Senyawa II)

5.2.2.1 Pemisahan dan pemurnian

Sebanyak 100 g fraksi etil asetat sisa dipisahkan dengan KCV menggunakan eluen heksan:etil asetat dengan meningkatkan gradien kepolaran dan diperoleh 4 kelompok fraksi (A, B, C, dan D), Fraksi B (900) mg dipisahkan lebih lanjut dengan lima kali kromatografi kolom cepat menggunakan eluen berturut-turut n-heksan: aseton(9:1), n-heksan: etil asetat (9:1),n-heksan : aseton (95:5),n-heksan:kloroform (1:1), dan n-heksan-etil : asetat (9:1) menghasilkan senyawa II berupa serbuk berwarna orange sebanyak 32 mg

Uji kemurnian senyawa II menggunakan kromatografi lapis tipis dengan tiga sistem eluen yang berbeda Hasil uji KLT dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7 Uji kemurnian senyawa II

No .	Eluen	Jumlah noda	Rf
1	Heksan:aseton (8:2)	1	0,38
2	Heksan:kloroform (9:1)	1	0,38
3	Heksan:etilasetat (8:2)	1	0,27

Hasil uji KLT dengan tiga sistem eluen tersebut menunjukkan bahwa senyawa II merupakan senyawa tunggal dan sudah murni. Hal ini ditunjukkan dengan adanya noda tunggal pada hasil KLT.

5.2.2.2 Analisis Spektroskopi

Senyawa **II** berupa serbuk berwarna orange sebanyak 32 mg dengan titik leleh >300°C.

Spektrum UV-Vis memperlihatkan λ_{max} (MeOH) (nm) 208, 270, 351, 446, dan 516. Sedangkan λ_{max} (MeOH + NaOH) (nm) 211, 270, 390, 512, dan 520.

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ (ppm) 2,33(s, 3H), 2,45(s, 3H), 3,81(s, 3H), 3,86(s, 3H), 6,79(s, 1H), 7,02 (s, 1H), 7,06(s, 1H), 7,39(s, 1H), 7,52(s, 1H), 7,64(s, 1H), 12,04(s, 1H), 12,08(s, 1H), 12,25(s, 1H), dan 13,02(s, 1H). Sedangkan $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) memberikan harga pergeseran kimia pada δ (ppm) 22,1; 22,2; 56,5; 56,6; 103,6; 104,6; 110,5; 111,0; 113,5; 113,8; 117,4; 120,1; 121,2; 123,9; 124,4; 132,4; 133,3; 133,8; 134,2; 161,2; 162,1; 162,4; 163,3; 164,7; 166,1; 182,2; 182,6; 190,9; dan 191,3.

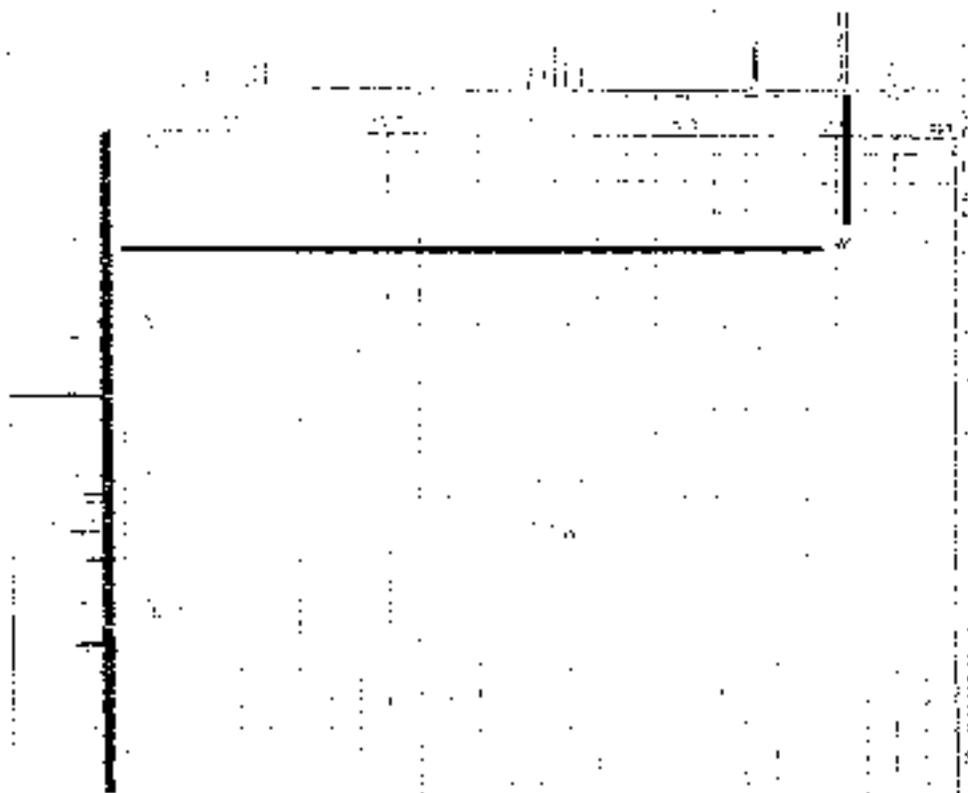
Analisis spektrum UV-Vis memberikan serapan λ_{max} yang merupakan karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antrakuinon. Karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antrakuinon dapat dibedakan dari kelas kuinon lainnya karena mempunyai empat atau lima pita serapan didaerah UV dan daerah tampak. Tiga dari pita serapan tersebut terletak antara 215 dan 300 nm, dan serapan yang satu lagi dialas 430 nm (Harborne, 1987). Sedangkan adanya pergeseran batokromik setelah penambahan NaOH sekitar 4-30 nm (λ_{max} 254, 255, 377, dan 517) menunjukkan bahwa senyawa **II** mempunyai gugus hidroksi fenolik.

Analisis spektroskopi karbon NMR ($^{13}\text{C-NMR}$) dalam pelarut CDCl_3

memperlihatkan adanya 31 sinyal yang mewakili 32 karbon menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan dimer antrakuinon. Sinyal-sinyal karbon tersebut terdistribusi sebagai empat sinyal karbon karbonyl pada δ 182,2, 182,6, 190,9; dan 191,3 ppm, dua sinyal karbon metoksi pada δ 56,5 dan 56,6 ppm, dan dua sinyal karbon dari gugus metil pada δ 22,1 dan 22,2 ppm, 23 sinyal karbon aromatis yang mewakili 24 karbon pada δ 103,6; 104,6; 110,5; 111,0; 113,5; 113,8; 117,4, 120,1; 121,2 (2C); 123,9; 124,4; 132,4; 133,3; 133,8; 134,2; 148,3; 148,4; 161,2; 162,1; 162,4; 163,3; 164,7; dan 166,1 ppm. Sinyal-sinyal karbon aromatis terdistribusi sebagai 6 sinyal karbon dari karbon oksiaril yaitu pada δ 161,2; 162,4; 162,1; 163,3; 166,1 dan 162,4 ppm, dan sisanya merupakan sinyal dari karbon tersier dan karbon kuartener. Berdasarkan data ^{13}C -NMR ini dapat diduga bahwa senyawa tersebut merupakan dimer antrakuinon yang masing-masing monomernya mengikat dua gugus hidroksi, satu gugus metil, dan satu gugus metoksi.

Dugaan tersebut didukung oleh data spektrum ^1H -NMR yang memperlihatkan adanya sinyal-sinyal proton dengan perincian : empat sinyal singlet proton hidroksi aromatis pada δ 12,04; 12,08; 12,25 dan 13,02 ppm, dua sinyal singlet proton metil yang mewakili 6 proton pada δ 2,33 (s, 3H) dan 2,45 ppm (s, 3H), dua sinyal singlet proton metoksi yang mewakili 6 proton pada δ 3,81 (s, 3H) dan 3,86 ppm (s, 3H); serta 6 sinyal singlet proton aromatik pada δ 6,79, 7,02, 7,06, 7,39, 7,52, 7,64 ppm. Analisis spektrum 2D ^{13}C - ^1H COSY (Gambar 7) digunakan untuk mengetahui korelasi antara proton dan karbon dalam senyawa dimer antrakuinon memperlihatkan bahwa karbon pada δ 22,1

ppm (CH_3) berkorelasi dengan 3 proton pada δ 2,33 ppm dan karbon pada δ 22,2 ppm (CH_3) dengan 3 proton δ 2,45 ppm, karbon pada δ 56,5 ppm (OCH_3) berkorelasi dengan 3 proton pada δ 3,86 ppm dan karbon pada δ 56,6 ppm (OCH_3) dengan 3 proton δ 3,81 ppm, karbon pada δ 103,6 ppm berkorelasi dengan proton pada δ 7,52 ppm (H-4), karbon pada δ 104,6 ppm berkorelasi dengan proton pada δ 6,79 ppm (H-5), karbon pada δ 121,2 ppm berkorelasi masing-masing dengan proton pada δ 7,39 (H-2') dan proton pada δ 7,64 (H-4'), karbon pada δ 124,4 ppm berkorelasi dengan proton pada δ 7,02 ppm (H-5'), karbon pada δ 123,9 ppm berkorelasi dengan proton pada δ 7,06 ppm (H-2). Korelasi antara karbon dan proton dapat dilihat pada tabel 8



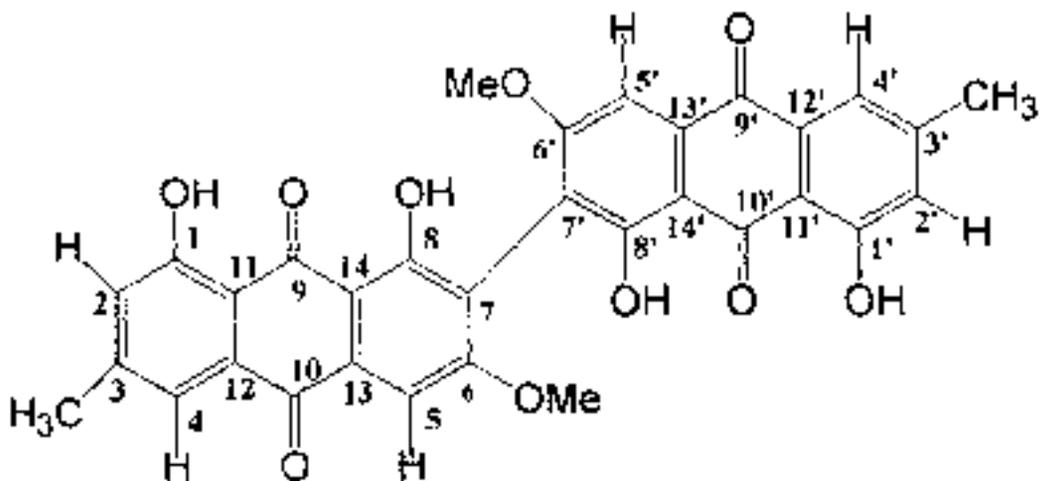
Gambar 7 Spektrum 2D ^{13}C - ^1H COSY

Tabel 8 Korelasi karbon-proton senyawa dimer antrakuinon hasil isolasi berdasarkan data analisis spektrum 2D ^{13}C - ^1H COSY

δ ^1H -NMR (ppm)	δ ^{13}C -NMR (ppm)
2,33	22,1
2,45	22,2
3,81	56,6
3,86	56,5
6,79	104,6
7,02	124,4
7,06	123,9
7,39	121,2
7,52	103,6
7,64	121,2

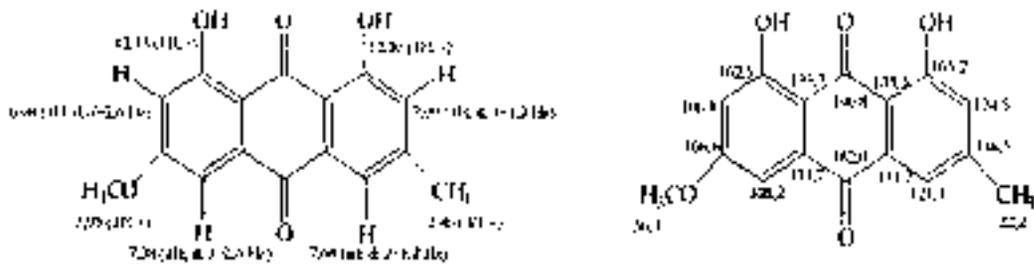
Penggabungan analisis spektrum ^{13}C -NMR, ^1H -NMR dan ^{13}C - ^1H COSY memperlihatkan bahwa dimer antrakuinon hasil isolasi terdiri dari 2 gugus metil, 2 gugus metoksi, 4 gugus karbonil, 4 gugus hidroksi, 6 karbon tersier dan 18 karbon kuartener.

Berdasarkan data spektrum UV-Vis, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR dan ^{13}C - ^1H COSY dapat disarankan bahwa senyawa II adalah 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fision-7'-il) dengan struktur seperti yang terlibat pada gambar 9.



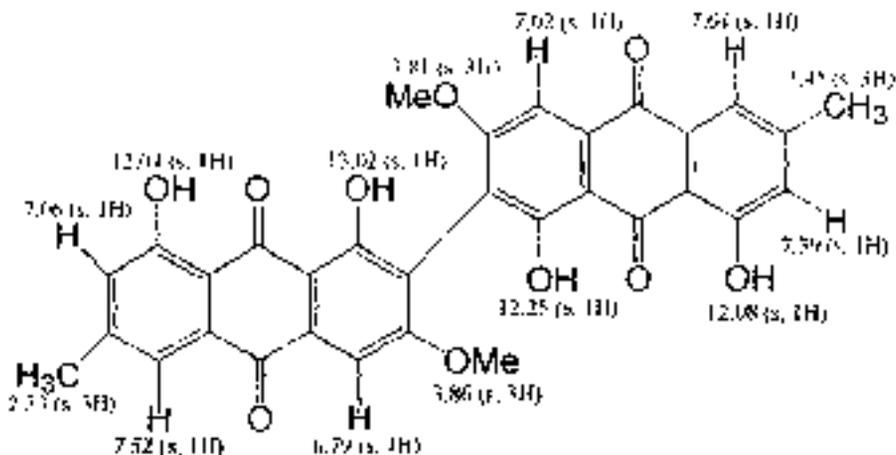
Gambar 9. Saran struktur senyawa II

Kesimpulan tersebut didukung dengan membandingkan harga geseran kimia ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR dari senyawa II hasil isolasi dengan monomer penyusunnya (fiscion) yang telah dilaporkan sebelumnya (Lee, 2001, Meselhy, 2003)



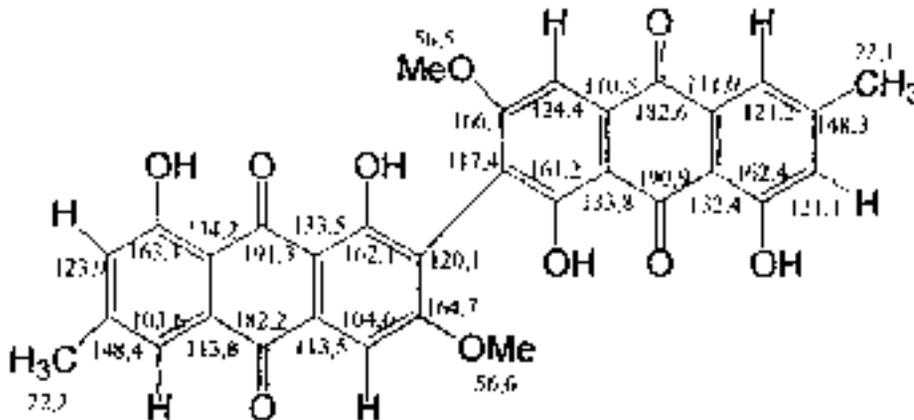
Dari gambar tersebut diatas diketahui bahwa geseran kimia ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR dari senyawa II memiliki kemiripan yang signifikan dengan fisicon sebagai monomer penyusunnya. Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa senyawa II hasil isolasi adalah bifiscion atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fiscion-7'-il)

Aktualisasi posisi proton dan karbon senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fiscion-7'-il) terlihat pada gambar 10 dan 11.



Gambar 10 Aktualisasi posisi proton senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fiscion-7'-il)

Hubungan Antara Struktur Senyawa Fenolik Dari Tumbuh.An Senna Multijuga Dengan Aktivitas Antioksidan Serta Toksisitas



Gambar 11. Aktualisasi posisi karbon senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7-(fiscion-7'-il)

5.2.3 Senyawa 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fiscion-7'-il)-9,10-antraquinon (Senyawa III)

5.2.3.1 Pemisahan dan Pemurnian

Sebanyak 100 g fraksi etil asetat sisa proses I dan II dipisahkan dengan KCV menggunakan eluen campuran n-heksan-etil asetat dengan meningkatkan gradien kepolaran. Fraksi 1-13 sebanyak 900 mg dari hasil KCV dipisahkan dengan lima kali kromatografi kolom cepat menggunakan eluen berturut-turut n-heksan:aseton (9:1), heksan:EA (9:1), heksan:aseton (9:5), heksan:CHCl₃ (1:1), dan heksan:EA (9:1) didapatkan senyawa III berupa serbuk berwarna orange sebanyak 24 mg.

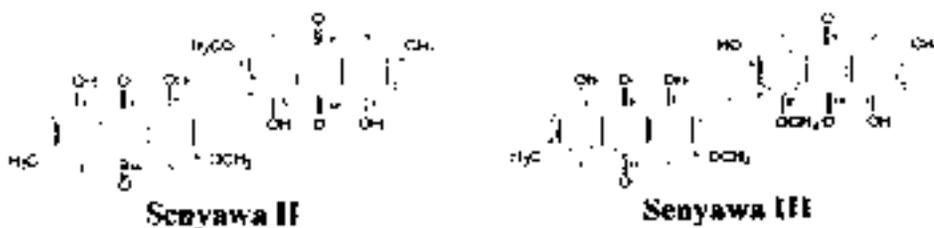
5.2.3.2 Analisis spektroskopi

Senyawa III berupa serbuk berwarna orange sebanyak 24 mg dengan titik leleh $>300^{\circ}\text{C}$

Spektrum ¹H-NMR (CDCl₃) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ Hubungan Antara Struktur Senyawa Fenolik Dari Tumbuh.An Senna Multijuga Dengan Aktivitas Antioksidan Serta Toksisitas

(ppm) 2,41(s, 3H), 2,29(s, 3H), 3,76(s, 3H), 3,81(s, 3H), 6,74(s, 1H), 6,97(s, 1H), 7,01(s, 1H), 7,34(s, 1H), 7,48(s, 1H), 7,60(s, 1H), 12,00(s, 1H), 12,04(s, 1H), 12,21(s, 1H), dan 12,98(s, 1H).

Pada **senyawa III** hanya dilakukan pengukuran $^1\text{H-NMR}$, sedangkan pengukuran $^{13}\text{C-NMR}$ tidak dilakukan. Namun demikian berdasarkan data $^1\text{H-NMR}$ ini dapat ditentukan bahwa **senyawa III** adalah suatu dimer antrakuinon. Hal ini terbukti dengan munculnya 2 sinyal proton alifatik yang mewakili 6 proton dari dua substituen metil pada δ (ppm) 2,41(s, 3H), 2,29(s, 3H); 2 buah sinyal yang mewakili 6 proton metoksi pada δ (ppm) 3,76(s, 3H), 3,81(s, 3H); enam sinyal proton aromatik pada δ (ppm) 6,74(s, 1H), 6,97(s, 1H), 7,01(s, 1H), 7,34(s, 1H), 7,48(s, 1H), 7,60(s, 1H); serta 4 sinyal proton hidroksil δ (ppm) 12,00(s, 1H), 12,04(s, 1H), 12,21(s, 1H), dan 12,98(s, 1H) seperti halnya pada **senyawa II**. Harga geseran kimia $^1\text{H-NMR}$ dari **senyawa III** dan **senyawa II** memiliki kemiripan yang cukup tinggi (Tabel 9). Oleh karena itu dapat disarankan bahwa **senyawa III** merupakan isomer dari **senyawa II**, perbedaan hanya terletak pada posisi substituen metoksi dan hidroksi dari monomernya, seperti terlihat pada gambar 12.

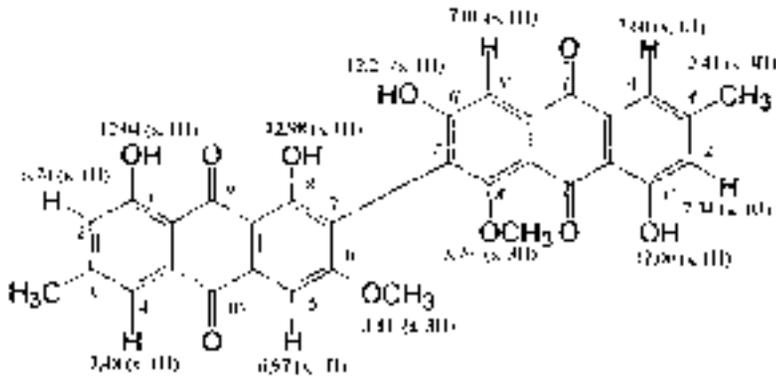


Gambar 12. Struktur **senyawa II** dan **III**

Tabel 9 Perbandingan harga geseran kimia **senyawa II** dan **senyawa III**

No karbon	¹ H-NMR senyawa II (CDCl ₃)	¹ H-NMR senyawa III (CDCl ₃)
1 (OH)	12,04 (s, 1H)	12,04 (s, 1H)
2	7,06 (s, 1H)	6,97 (s, 1H)
3 (CH ₃)	2,33 (s, 3H)	2,29 (s, 3H)
4	7,52 (s, 1H)	7,48 (s, 1H)
5	6,79 (s, 1H)	6,74 (s, 1H)
6 (OMe)	3,86 (s, 3H)	3,81 (s, 3H)
7	-	-
8 (OH)	13,02 (s, 1H)	12,98 (s, 1H)
9 (OH)	12,08 (s, 1H)	12,00 (s, 1H)
2'	7,39 (s, 1H)	7,01 (s, 1H)
3' (CH ₃)	2,45 (s, 3H)	2,41 (s, 3H)
4'	7,64 (s, 1H)	7,60 (s, 1H)
5'	7,02 (s, 1H)	7,34 (s, 1H)
6'	3,86 (s, 3H) (OMe)	12,00 (s, 1H) (OH)
7'	-	-
8'	12,25 (s, 1H) (OH)	3,76 (s, 1H) (OH)

Berdasarkan data tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa **senyawa III** adalah suatu dimer antrakuinon dengan nama 1',6'-dihidroksi-3'-metil-8'-metoksi-7'(fision-7-1)-9',10'-antrakuinon dengan struktur beserta harga geseran kimia dari proton-proton yang terlapat di dalamnya seperti terlihat pada gambar 13



Gambar 13. Struktur senyawa III dengan harga geseran kimia $^1\text{H-NMR}$

5.2.4 Senyawa 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fiscion-7'-il)-1,4-antrakuinon (Senyawa IV)

5.2.4.1 Pemisahan dan Pemurnian

Fraksi etil asetat sebanyak 63 g dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Guna memudahkan proses selanjutnya, fraksi ini dibagi dua yaitu 43 g dipisahkan dengan KKG₁ dan sisanya (20 g) dengan KKG₂ dengan eluen n-heksan-aseton (9,5:0,5). Proses pemisahan ini menghasilkan 23 fraksi dari KKG₁ dan 14 fraksi dari KKG₂ dan masing-masing dikelompokkan menjadi 4 gabungan fraksi (A, B, C, dan D). Tiap-tiap fraksi diuji dengan KLT dan hasil uji menunjukkan bahwa fraksi A (400 mg) dari KKG₁ dan B (190 mg) dari KKG₂ memperlihatkan harga R_f yang sama. Fraksi A dan B digabung, kemudian dipisahkan lebih lanjut menggunakan 2 kali kromatografi kolom modifikasi dengan eluen n-heksan-aseton (9,1) dan n-heksan-kloroform (1,1) sehingga didapatkan 4 fraksi (E, F, G, dan H). Fraksi F (74 mg) dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan dua kali kromatografi kolom cepat

menggunakan eluen heksan:aseton 9:1 dan heksan:CHCl₃ 1:1 diperoleh spot tunggal. Hasil uji KLF dengan 3 sistem eluen yang berbeda menunjukkan bahwa **senyawa IV** yang berhasil disofasi adalah senyawa tunggal karena memberikan satu spot. **Senyawa IV** yang diperoleh berupa serbuk berwarna orange sebanyak 23 mg.

5.2.4.2 Analisis Spektroskopi

Senyawa IV berupa serbuk berwarna orange sebanyak 23 mg dengan titik leleh >300°C.

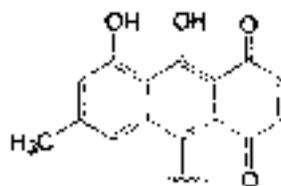
Spektrum UV-Vis memperlihatkan λ_{max} (MeOH) (nm) 487, 708, 777, 784, dan 793. Sedangkan λ_{max} (MeOH + NaOH) (nm) 504, 774, dan 791. Spektrum ¹H-NMR (CDCl₃) memperlihatkan pergeseran kimia pada δ (ppm) 2,19(s, 3H), 2,40(s, 3H), 3,71(s, 3H), 6,33(s, 1H), 6,34 (s, 1H), 6,44(s, 1H), 6,66(s, 2H), 7,06(s, 1H), 7,57(s, 1H), 11,81(s, 1H), 12,43(s, 1H), dan 12,79(s, 1H)

Analisis spektrum UV-Vis memberikan serapan λ_{max} yang merupakan karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antraquinon. Karakteristik spektrum UV-Vis untuk senyawa antraquinon dapat dibedakan dari kelas kuinon lainnya karena mempunyai empat atau lima pita serapan didaerah UV dan daerah tampak (Harborne, 1987). Sedangkan adanya pergeseran batokromik setelah penambahan NaOH sekitar 4-30 nm menunjukkan bahwa **senyawa IV** mempunyai gugus hidroksi fenolik.

Spektrum ¹H-NMR memperlihatkan adanya 12 sinyal yang mewakili 19 proton dengan perincian: tiga sinyal proton hidroksi pada δ (ppm) 11,81(s, 1H),

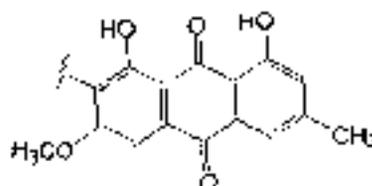
12,43(s,1H), dan 12,79(s, 1H). satu sinyal proton oksialkil yang mewakili 3 proton dari gugus metoksi pada δ (ppm) 3,71(s, 3H); dua sinyal proton alifatik yang mewakili 6 proton dari gugus metil pada δ (ppm) 2,19(s, 3H), 2,40(s, 3H); serta 6 sinyal yang mewakili 7 proton aromatik pada δ (ppm) 6,33(s, 1H), 6,34 (s, 1H), 6,44(s, 1H), 6,66(s, 2H), 7,06(s, 1H), 7,57(s, 1H); serta 3 sinyal proton hidroksi pada δ (ppm) 11,81(s, 1H), 12,43(s,1H), dan 12,79(s, 1H).

Data $^1\text{H-NMR}$ tersebut menunjukkan bahwa senyawa **IV** adalah suatu dimer antrakuinon yang disusun oleh dua unit monomer. Monomer pertama adalah suatu unit yang memiliki 2 proton yang identik terbukti dengan adanya sinyal proton dengan integrasi 2 kali dibanding proton yang lain pada δ (ppm) 6,66(s, 2H), satu gugus metil, dua gugus hidroksi pada δ (ppm) 12,79(s, 1H) dan sekitar 17,00-18,00 (tidak muncul), serta dua proton aromatik pada δ (ppm) 6,33(s, 1H), 6,34 (s, 1H) Berdasarkan data tersebut, dapat disarankan unit monomer pertama seperti terlihat pada gambar 14.



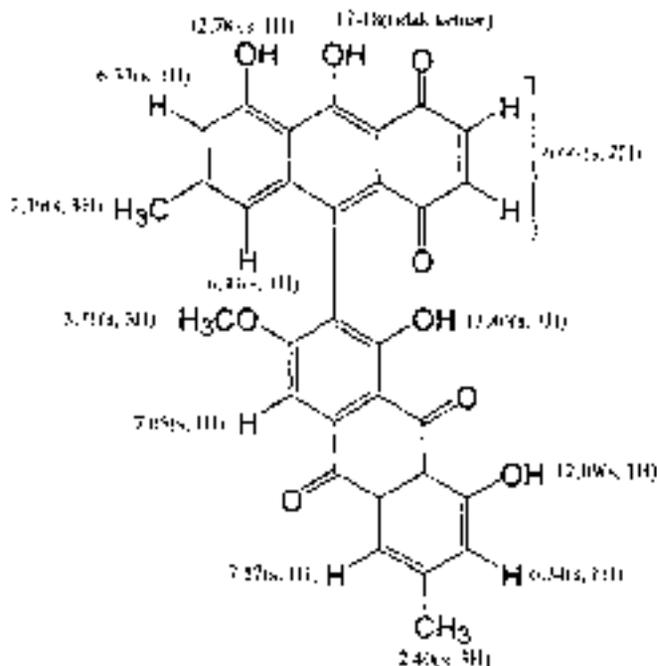
Gambar 14. Unit monomer pertama dari senyawa **IV**

Sedangkan unit monomer kedua adalah suatu monomer yang dikenal dengan nama fiscion, seperti yang terlihat pada gambar 15.



Gambar 15. Unit monomer kedua dari senyawa **IV**

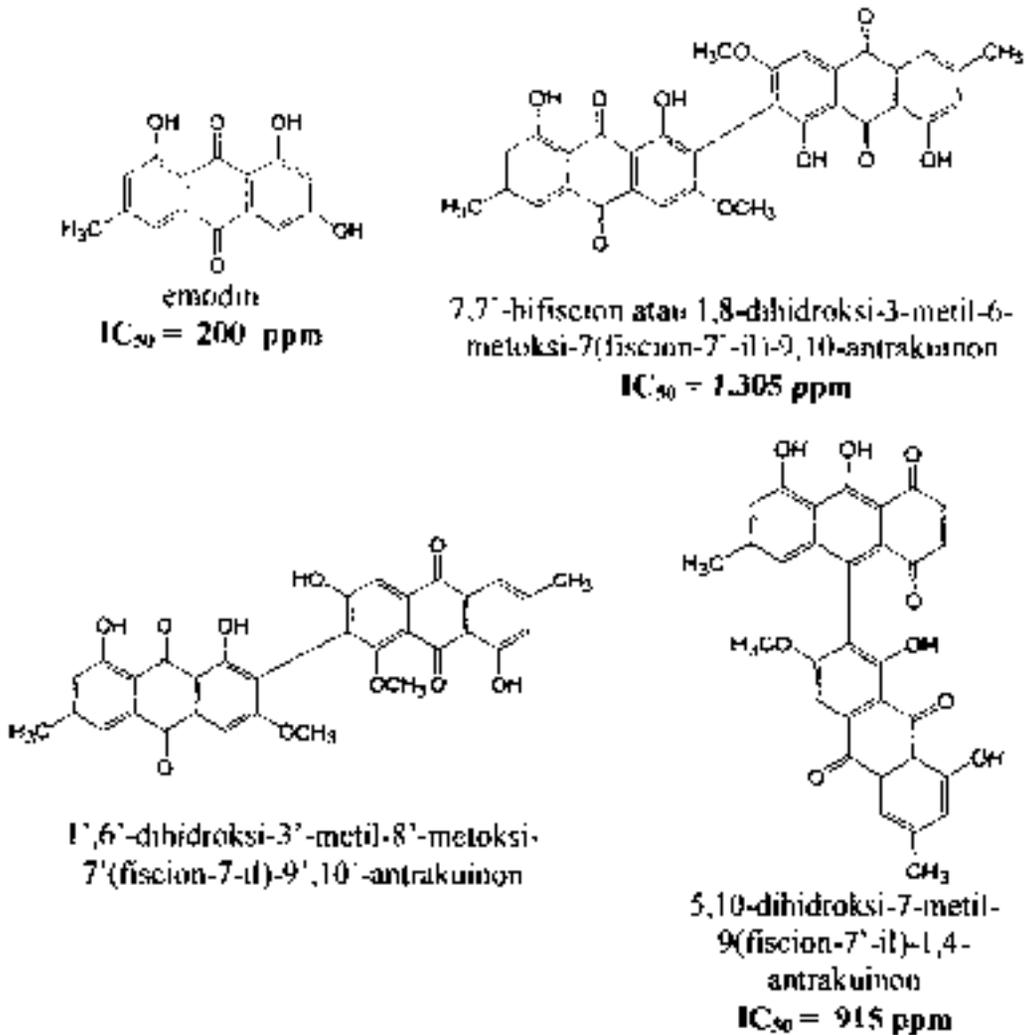
Berdasarkan data spektrum UV -Vis dan $^1\text{H-NMR}$, serta dengan mempelajari biogenesis senyawa-senyawa dari genus *Cassia* dapat disimpulkan bahwa struktur senyawa IV adalah 5,10-dihidroksi-7-metil-9(10-hidroksi-7'- H)-1,4-antrakuinon dan harga geseran kimia senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 16 Struktur senyawa dan harga geseran kimia $^1\text{H-NMR}$ senyawa IV

5.3.1. Uji aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH senyawa hasil isolasi dilakukan pada konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Pengukuran pada spektrofotometer UV-Vis dilakukan setelah 5 menit penambahan sampel. Hasil pengukuran dan penghitungan % peredaman DPPH senyawa antrakuinon hasil isolasi ditunjukkan pada gambar 17.



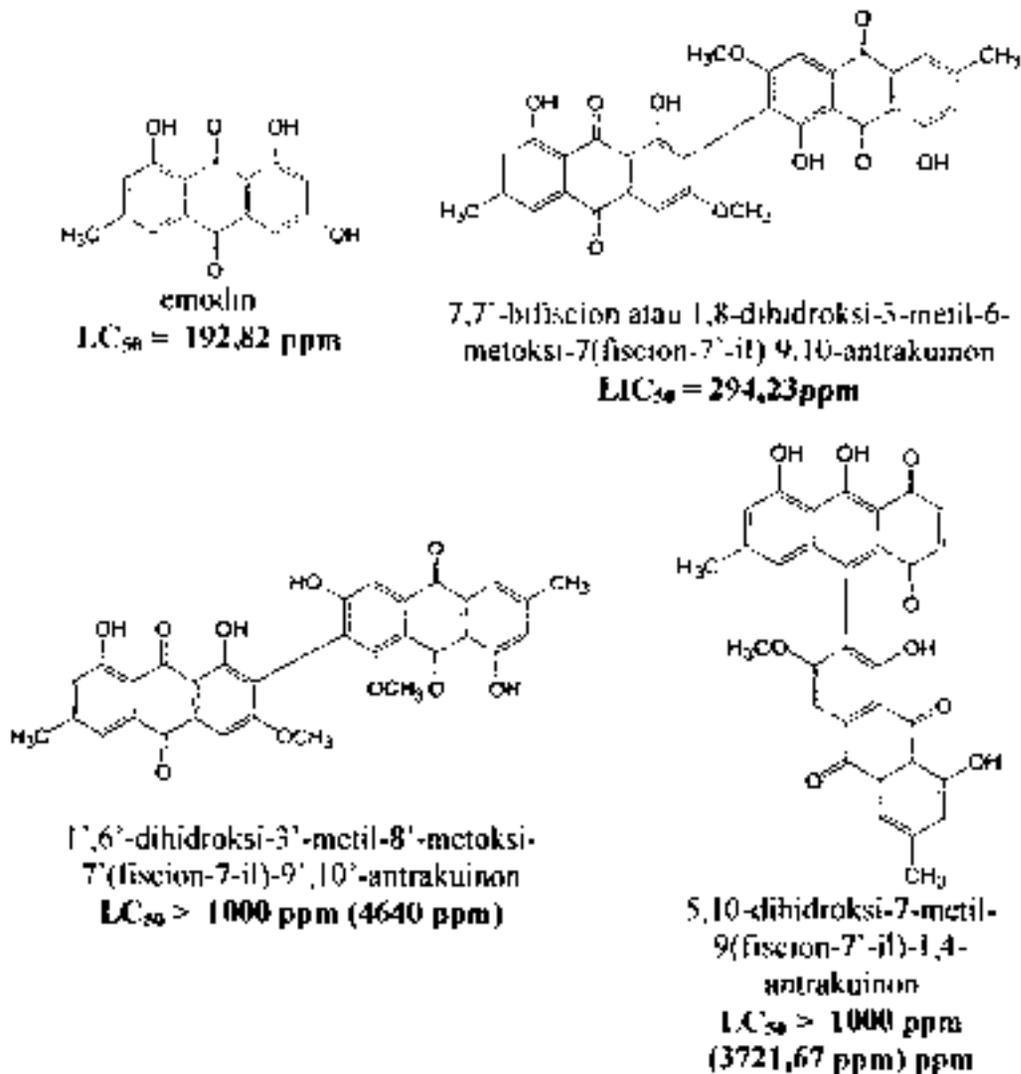
Gambar 17 Hasil uji aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi

Berdasarkan data tersebut diatas, terlihat bahwa monomer antrakuinon memiliki aktivitas antioksidan yang jauh lebih tinggi dibanding dimer antrakuinon. Jumlah gugus hidroksil bebas pada dimer antrakuinon diduga merupakan faktor penentu dari tingginya aktivitas antioksidan dan dimer antrakuinon hasil isolasi, terbukti senyawa 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fiscion-7'-il)-1,4-antrakuinon memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding dengan 2,2'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-6-metil-3-metoksi-2(fiscion-2'-il)-

9,10-antrakuino. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila harga $IC_{50} < 1000$ ppm.

5.3.1. Uji toksisitas dengan benur udang *Artemia salina* (BSLT)

Senyawa hasil isolasi dilakukan uji toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina*. Pada larutan sampel dibuat 4 macam variasi konsentrasi dan masing-masing konsentrasi dibuat 3 kali replikasi. Pembuatan larutan kontrol bertujuan untuk melihat pengaruh lain yang dapat menyebabkan kematian *Artemia salina* l. selama senyawa yang akan diuji. Setelah 24 jam, jumlah benur udang yang mati pada masing-masing konsentrasi larutan sampel dan larutan kontrol dihitung, dicatat, dan ditentukan % kematian. Data tersebut selanjutnya digunakan untuk menentukan LC_{50} dengan menggunakan analisis probit program SPSS (Statistic Program for Social Science). Suatu senyawa dikatakan memiliki toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina* apabila harga $LC_{50} < 1000$ ppm. Gambar 18 menunjukkan hasil uji toksisitas senyawa hasil isolasi terhadap benur udang *Artemia salina*.



Gambar 18. Hasil uji toksisitas senyawa hasil isolasi terhadap benur udang *Artemia salina*

Emodin yang merupakan satu-satunya monomer antrakuinon hasil isolasi dari *Senna multijuga* menunjukkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina*. Dua isomer antrakuinon yang berbeda letak posisi gugus hidroksil dan metoksi, ternyata memberikan hasil uji yang jauh berbeda satu

dengan yang lain. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh posisi metoksi yang berseberahan menyebabkan senyawa 1',6'-dihidroksi-3'-metil-8'-metoksi-7'(fiscion-7-(f)-9',10'-antrakuinon jauh kurang aktif dibanding senyawa 7,7'-bifiscion atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fiscion-7'-(f)-9,10-antrakuinon yang posisi gugus metoksi dan hidroksinya saling berseberangan. Namun untuk memastikan dugaan tersebut, masih diperlukan serangkaian percobaan lebih lanjut.

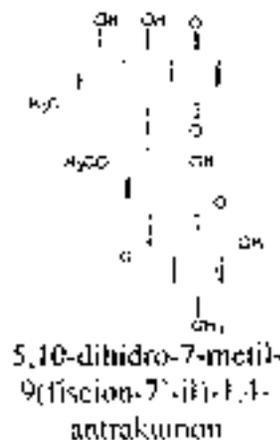
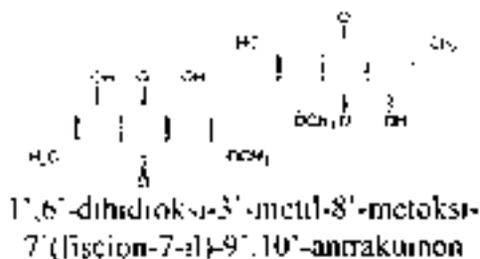
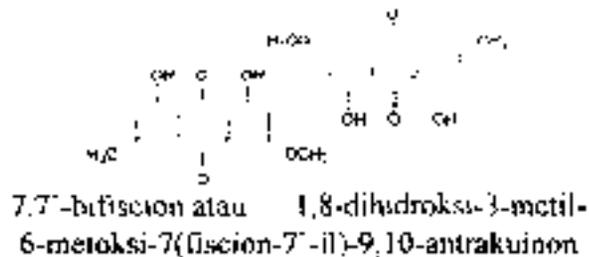
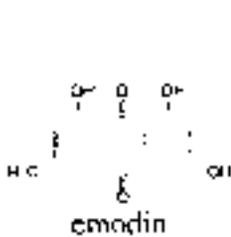
BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Empat senyawa golongan antrakuinon, yaitu emodin, 7,7'-bifiscion [1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fiscion-7'-il)-9,10-antrakuinon], 1',6'-dihidroksi-3'-metil-8'-metoksi-7'(fiscion-7-il)-9',10'-antrakuinon, dan 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fiscion-7'-il)-1,4-antrakuinon telah berhasil diisolasi dari kulit batang *Senna multijuga* dengan struktur sebagai berikut:



- Senyawa emodin memperlihatkan aktivitas antioksidan terhadap pereaksi DPPH dengan $IC_{50} = 200$ ppm, sedangkan 5,10-dihidroksi-7-metil-9(fiscion-7-il)-1,4-antrakuinon dengan $IC_{50} = 915$ ppm

3. Senyawa emodin memperlihatkan toksisitas terhadap benur udang *Artemia salina* dengan $LC_{50} = 192,82$ ppm, sedangkan 7,7'-bifisicin atau 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksi-7(fisicin-7'-il)-9,10-antrakuinon dengan $LC_{50} = 294,23$ ppm.
4. Monomer antrakuinon hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang jauh lebih tinggi dibanding bentuk dimernya. Untuk dimer antrakuinon, semakin banyak gugus hidroksil semakin aktif. Sedangkan toksisitas dimer antrakuinon hasil isolasi terhadap benur udang *Artemia salina* ditentukan oleh perbedaan posisi gugus hidroksil dan metoksinya.

SARAN

1. Melakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut terhadap kulit batang dan jaringan lain dari *Senna multijuga* secara tuntas sehingga dapat diketahui seluruh komponen metabolit sekunder yang dikandungnya.
2. Melakukan uji aktivitas dengan konsentrasi yang lebih tinggi.
3. Melakukan uji aktivitas lanjutan untuk dapat diaplikasikan pada masyarakat.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemayehu, G. B., Abegaz, W., Kraus (1998), A **1,4-anthraquinone-dihydroanthracenone dimer from *Senna sophera***, *Phytochemistry*, **48**(4), 699-702
- Alemayehu, Gizachew., Hailu, Ayele , Abegas, Berhanu M. 1996. **Bianthraquinones from *Senna Didymobotrya***. *Phytochemistry*. Vol 42. No 5 1423-1425
- Alemayehu, Gizachew., Abegas, Berhanu , Kraus, Wolfgang. 1998 A **1,4-Anthraquinone – Dihydroanthraquinone Dimer from *Senna sophera***. *Phytochemistry*. Vol 48. No 4. 699-702
- Baba, Kimiye., kido, Tadashi., Maeda, Kaoru , Taniguchi, Masahiko., Kozawa, Mitsugi. 1992 **Two Stilbenoids from *Cassia gurrettiana***. *Phytochemistry*. Vol 31. No 9. 3215-3218
- Barbosa, Francisco G., de Oliveira, Maria da Conceicao F., Braz-Filho, Raimundo , Silveira, Edilberto R. 2004. **Anthraquinones and Naphthopyrones from *Senna rugosa***. *Biochemical Systematics and Ecology*. **32**. 363-365
- Cuendet, Mirel . Hostettman, Kurt , Potterat, oliver 1997. **Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei***. *Helvetica Chimica Acta*. Vol 80
- Dai, J.R., Y.F. Hallock, J.H. Cardellina II, M.R., Boyd (1998), **HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopsea malibata***, *J. Nat. Prod.*, **61**. 351-353
- Geewananda, Y.A., P. Gunawardena, S. Sothiceswaran, M.U.S. Sultanbawa, S. Surendrakumar, P. Bladon (1986), **Another antibacterial polyphenol, coppaliferol B, from *Vateria copallifera* (Dipterocarpaceae)**, *Phytochemistry*, **25**, 1498-1500
- Godrana, Maria. 1995 **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Glikosida Antrakunon dan Daun *Cassia Fistula*, LINN**. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas MIPA. Unair. Surabaya
- Hakita, E.H. (2002), **Oligostilbenoid dari tumbuh-tumbuhan Dipterocarpaceae**, *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem.*, **2**, 1-9
- Haraguchi, H. et.al, 1996, **Antiperoxidative Components in *Thymus vulgaris***. *Planta Medica*, **62**, 217-21

Harborne, J. B. 1987. **Metode Fitokimia. Penentuan Cara Modern Menggunakan Tumbuhan Bandung** ITB

Hendrayana, Sumar., Kadarohman, Asep., Sumarna, A.A., Supriatna, Asep. 1994. **Kimia Analitik Instrumen edisi I.** IKIP Semarang Press

Heyne, K. 1987. **Tumbuhan Indonesia II** terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Jakarta: Sarana Wana Jaya

Inamori, Yoshitiko, Ogawa, Masatomi., Tsujibo, Hiroshi., Baba, Kimiye., Kozawa, Mitsugi., Nakamura, Hideo. 1991. **The Inhibitor Effect of 3,3',4,5' Tetrahydroxystilbene, A Constituent of *Cassia garrettiana*, on anti - IgE - induced Histamine Release from Human Basophils in Vitro.** *Hum. Pharm. Buf.* Vol 39, No 3 805-807

Joyeux, M., Labstein, A., Anton, R., Mortier, E. 1995. **Comparative Antilipoperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Terpenes and Biflavones from Ginkgo and some Flavonoids** *Planta Medica.* Vol 61 126-129

Lee, Chng-Kuo., Lee, Ping-Huang, Kuo, Yueh-Hsiung. 2001. **The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L.,** *Journal of the Chinese Chemical Society,* 48, 1053-1058

Meselhy, Meselhy R. 2003. **Constituents from Meghal, the Roots of *Glossostemon Bruguieri* (Desf.).** *Molecules,* 8, 614-621

Meyer, B. N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin (1982). **Brine shrimp : a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta medica,* 45, 31-34

Moriyama, Hiroyoshi., Iizuka, Toru., Nagai, Masahiro., Miyataka, Hideki., Satoh, Toshio. 2003. **Antiinflammatory Activity of Heat-treated *Cassia alata* Leaf**

Moriyama, Hiroyoshi., Iizuka, Toru., Nagai, Masahiro., Miyataka, Hideki., Satoh, Toshio. 2003. **Antiinflammatory Activity of Heat-treated *Cassia alata* Leaf Extract and Its Flavonoid Glycoside.** *The Pharmaceutical Society of Japan.* Vol 123, No 7, 607-611

Moriyama, Hiroyoshi., Iizuka, Toru., Nagai, Masahiro. 2001. **A Stabilized Flavonoid Glycoside in Heat-Treated *Cassia alata* Leaves and Its Structural Elucidation.** *The Pharmaceutical Society of Japan.* Vol 121, No 11, 817-820

Sastrohamidjojo, Hardjono. 1991. **Spektroskopi.** Yogyakarta: Liberty

Scott, A. I. 1964. **Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Product**. Pergamon Press Oxford. 286 - 292

Singh, J., Tiwari, A.R., Tiwari, R.D. 1980. **Anthraquinones and Flavonoids of *Cassia laevigata* Roots**. *Phytochemistry*. Vol 19. 1253-1254

Singh, Janhavi., Singh, J. 1987. **Two Anthraquinone Glycosides from *Cassia marginata* Roots**. *Phytochemistry*. Vol 26. No 2. 507-508

Singh, Janhavi., Singh, J. 1986. **A Bianthraquinone and A triterpenoid from the Seeds of *Cassia hirsuta***. *Phytochemistry*. Vol 25. No 8. 1985-1986

Steenis, Van C. G. J. 2002. *Flora*. Jakarta: PT Praditya Paramita

Sudjadi. 1983. **Penentuan Struktur Senyawa Organik**. Bandung: Ghalia Indonesia

Tiwari, R.D., Bajpai, Meena. 1977. **The Flavonoids of *Cassia reginera* Stem Bark**. *Phytochemistry*. Vol 16. 798-799

Uno, idetmista, Masumoto, Akane., Honda, Enna., Nagamachi, Yumi., Yamaoka, Youtaren., Cho, Noboru. 2001. **Intramolecular aldol-type condensation between side chains of naphthoquinones: biomimetic synthesis of 1,6- and 1,8-dihydroxyanthraquinones**. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*. 3189-3197