

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTI RADIKAL BEBAS
SENYAWA FENOLIK FRAKSI ETIL ASETAT DARI KULIT
BATANG *Cassia spectabilis* DC**

SKRIPSI

MPK 19/06

Roc
i

MASRIFAH YUNI ROCHMAWATI



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**

STAMP: 2006.06.19
MASRIFAH YUNI ROCHMAWATI
KIMIA
UNIVERSITAS AIRLANGGA

**ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTI RADIKAL BEBAS
SENYAWA FENOLIK FRAKSI ETIL ASETAT DARI KULIT
BATANG *Cassia spectabilis* DC**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Gelar Sarjana Sains Bidang
Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh :

MASRIFAH YUNI ROCHMAWATI
NIM. 080112415

Tanggal Lulus : 17 Pebruari 2006

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Drs. Mulyadi Tanjung, MS
NIP. 131 932 687

Pembimbing II,



Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si
NIP. 131 932 689

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTI RADIKAL BEBAS
SENYAWA FENOLIK FRAKSI ETIL ASETAT DARI KULIT
BATANG *Cassia spectabilis* DC

Penyusun : Masrifah Yuni Rochmawati

Nomor Induk : 080112415

Pembimbing I : Drs. Mulyadi Tanjung, MS

Pembimbing II : Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si

Tanggal Ujian : 17 Pebruari 2006

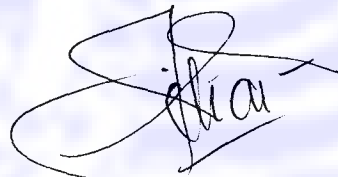
Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Drs. Mulyadi Tanjung, MS
NIP. 131 932 687

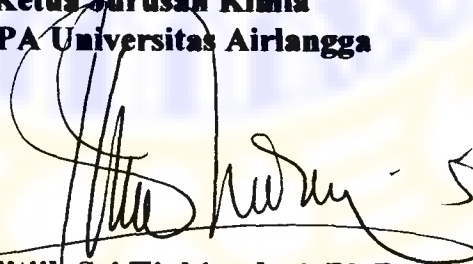
Pembimbing II,



Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si
NIP. 131 932 689

Mengetahui :

**Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Airlangga**



Dra. Tjitjik Sri Tjahjandari, Ph.D
NIP. 131 801 627

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi, tetapi pengutipan seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai dengan kebutuhan ilmiah.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga

*Kupersembahkan untuk keluargaku tercinta.....
Untuk ibu, bapak dan kedua adikku*

“Demi masa. Sesungguhnya setiap manusia berada dalam kerugian
Kecuali orang-orang yang beriman, beramal shalih, dan saling nasehat menasehati
di dalam kebenaran dan kesabaran.”

-QS : Al Ashr-

“Tiada yang mustahil di sisi Allah SWT untuk menjadikannya”
(sang Sufi)

"Siapa yang takut kepada Allah, nescaya semua makhluk takut kepadanya."
(sang Sufi)

"Manusia diuji oleh Allah berdasarkan keimanan yang mereka miliki."
(sang Sufi)

”pendidikan membuat orang mudah dibimbing
tapi sulit diatur
membuat orang mudah diarahkan
tapi tidak dikendalikan”
(sang Sufi)

"Do a little more each day than you think you possibly can."

"Manusia dapat menemukan 1000 alasan mengapa mereka gagal
tetapi sebenarnya hanya perlu 1 alasan yang membuat mereka kukuh untuk berjaya."
(sang Sufi)

“ dan aku berhenti mencari kebahagiaan,...
ketika aku sadar....bahwa kebahagiaan itu diciptakan
bagi siapa yang ingin memilikinya....”
-MYR-

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah S.W.T. karena dengan rahmat dan hidayah-Nyalah penyusun dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Isolasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa Fenolik Fraksi Etil Asetat dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC”.

Skripsi ini disusun sebagai tugas akhir yang harus diselesaikan dalam meraih gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga.

Pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada:

1. Drs. Mulyadi Tanjung, MS selaku dosen pembimbing I dan Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah sabar memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Alfinda Novi Kristanti yang telah banyak memberi masukan, saran-saran, dan nasehat dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
3. Ir. J.H. Lunardhi Inge Gunawan selaku dosen wali.
4. Dra. Tjitjik Srie Tj., Ph.D selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Airlangga dan seluruh staf jurusan kimia.
5. Dosen-dosen pengajar di FMIPA Universitas Airlangga yang telah memberikan bekal ilmu kepada penyusun.
6. Prof. Mary Garson, Ph.D. dan Rudyansyah SSI, MSi dari University of Queensland, St. Lucia 4067, Brisbane, Australia atas bantuan dalam mengidentifikasi senyawa hasil isolasi.

7. Drs. Wardaya dan Bapak Tugiyono dari LIPI UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan atas bantuan dalam penyediaan bahan tumbuhan penelitian.
8. Staf dan karyawan jurusan kimia FMIPA UNAIR yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas bantuan dan kebaikannya.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.

Penyusun menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penyusun harapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Pebruari 2006
Penulis

Masrifah Yuni R

“Terima kasih.....”

Alhamdulillah.....segala puji bagi Allah

Aku bersyukur untuk setiap hal yang kumiliki...juga untuk kehidupan yang nyaris sempurna

Untuk keluargaku, terutama untuk Mami dan bapak “ terima kasih untuk setiap do'a, kasih sayang dan kepercayaan. Mungkin aku tidak punya cukup banyak hal untuk dibanggakan, tapi menjadi anak kebanggaan kalian merupakan hal yang paling membanggakan....”

Sahabat-sahabat yang sudah menemani dan luar biasa mendukung....

*Canteq family : yenny sunengseh, CC andin, Ajenk-OH, Risty Gomu dan kakak Ika
“ thx buat semuanya prend, buat waktu, tenaga, pikiran, bahkan materi....terlebih lagi buat persahabatan yang tak ternilai ini...”*

Trisni “Vayangndos”: “suwun deh jadi sahabatku, selama 4 taon ini....Chayo tris, dunia luar sudah menunggumu”

Mila “honey”: “ salam perguruan...!!!hehehehe....semangat yo say....n thx a lot...”

Gun : ‘ Don't know what to say...thx.....it's nice”

Terima kasih juga buat.....

Teme-temen nge-Lab yang asik sekaligus banyak membantu: yus, Nani, Mbak Azizah, dan Mbak Dahlia “ don't forget that beautiful moment guys....”

Oeyoeng : “suwun jeh buat pinjaman flasdiks plus bantuan laennya”

Tintus : “thx buat supportnya pas maju sidang...tetep SEMANGAT ya.....!!!!!!”

Temen-temen 2001 dan adik-adik angkatan yang ga bisa disebutin satu persatu “ thx ya....”

Meme

Masrifah Y.R., 2006, Isolasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa Fenolik Fraksi Etil Asetat dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC. Skripsi ini di bawah bimbingan Drs. Mulyadi Tanjung, MS Dan Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Airlangga.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa fenolik fraksi etil asetat dari kulit batang *Cassia spectabilis* DC dari famili Leguminosae dan menguji aktivitas anti radikal bebasnya. Ekstraksi senyawa fenolik dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut aseton pada suhu kamar. Ekstrak aseton yang diperoleh selanjutnya diekstraksi berturut-turut dengan n-heksana dan etil asetat. Pemisahan ekstrak etil asetat dilakukan dengan berbagai metode kromatografi, yaitu kromatografi kolom cair vakum dan kromatografi kolom cepat menghasilkan satu senyawa fenolik. Pemurnian senyawa fenolik hasil isolasi dilakukan dengan rekristalisasi menghasilkan padatan berwarna putih kekuningan dengan titik leleh 238°C (dec). Penentuan struktur molekul senyawa fenolik dilakukan berdasarkan analisis spektroskopi UV-Vis, IR, ¹H-RMI, dan ¹³C-RMI. Hasil analisis menunjukkan bahwa senyawa fenolik dikenal sebagai *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat. Uji aktivitas senyawa *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat menunjukkan bahwa senyawa tersebut tidak memiliki aktivitas sebagai anti radikal bebas.

Kata kunci: *Cassia spectabilis* DC, Leguminosae, Fenolik, Kromatografi, *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat, Anti radikal bebas.

Masrifah Y.R., 2006, Isolation and Radical Scavenger Activity Test of Phenolic Compound Ethyl Acetate Fraction from *Cassia spectabilis* DC's Stem Bark. This study is under guidance of Drs. Mulyadi Tanjung, MS, and Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si Department of Chemistry, Mathematic and Natural Science Faculty, Airlangga University.

ABSTRACT

The purpose of this research is to isolate phenolic compound of ethyl acetate fraction and to determine its activity as a radical scavenger from *Cassia spectabilis* DC's stem bark. Extraction was done using maceration method with acetone at room temperature. The extract was then extracted with n-hexane and then with ethyl acetate. The extract obtained was separated using combination method of vacuum liquid column chromatography and flash column chromatography with suitable comparison mixed eluent, produced one phenolic compound. The product was purified by recrystallization and yielded yellow solid with melting point 238°C (dec). Determination of isolated compound's structure was done by UV-Vis, IR, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. The result of analysis showed that phenolic compound was known as *trans*-oktyl-4,5-dihydroxy-3-metoxy cinnamate. The test activity of *trans*-oktyl-4,5-dihydroxy-3-metoxy cinnamate showed that this compound does not have activity as a radical scavenger.

Key Word: *Cassia spectabilis* DC, Leguminosae, Phenolic, chromatography, *trans*-oktyl-4,5-dihydroxy-3-metoxy cinnamate, radical scavenger

DAFTAR ISI

Halaman Judul	
Lembar Pengesahan	
Kata Pengantar	iii
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xii
Daftar Lampiran	xiii
BAB I	PENDAHULUAN
	1
1.1	Latar Belakang Pemasalahan
	1
1.2	Rumusan Masalah
	4
1.3	Tujuan Penelitian
	4
1.4	Manfaat Penelitian
	5
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA
	6
2.1	Tinjauan Botani Leguminosae
	6
2.2	<i>Cassia</i>
	7
2.3	Senyawa Fenolik Dalam <i>Cassia</i>
	8
2.4	<i>Cassia spectabilis</i> DC
	10
2.5	Kandungan Kimia <i>Cassia spectabilis</i> DC
	12
2.6	Senyawa Fenilpropanoid.....
	12
2.7	Senyawa Turunan Sinamat
	13
2.8	Biosintesis Senyawa Fenolik
	15
2.9	Isolasi dan Ekstraksi Senyawa Fenolik
	16
2.10	Kromatografi
	17
2.10.1	Kromatografi lapis tipis
	17
2.10.2	Kromatografi kolom gravitasi
	19
2.10.3	Kromatografi cair vakum
	20
2.10.4	Kromatografi kolom cepat
	21
2.11	Uji Sifat Fisika
	22
2.12	Spektroskopi
	23
2.12.1	Spektroskopi ultraviolet-visibel
	23
2.12.2	Spektroskopi infra merah
	24
2.12.3	Spektroskopi resonansi magnet inti
	25
2.12.3.1	Spektroskopi resonansi magnet inti proton
	26
2.12.3.2	Spektroskopi resonansi magnet inti karbon
	27
2.13	Anti Radikal Bebas
	28
BAB III	METODE PENELITIAN
	32
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian
	32

3.2	Bahan dan Alat Penelitian	32
3.2.1	Bahan penelitian	32
3.2.2	Bahan kimia	32
3.2.3	Alat penelitian	33
3.3	Prosedur Kerja	33
3.3.1	Isolasi dan pemurnian senyawa anti radikal bebas	33
3.3.2	Uji sifat fisika senyawa hasil isolasi	36
3.3.3	Analisis spektroskopi senyawa hasil isolasi	36
3.3.3.1	Spektroskopi ultraviolet – visibel	36
3.3.3.2	Spektroskopi infra-merah	36
3.3.3.3	Spektroskopi resonansi magnet inti	37
3.3.4	Uji aktivitas anti radikal bebas	37
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1	Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Fenolik	40
4.1.1	Hasil ekstraksi	40
4.1.2	Hasil isolasi	41
4.2	Pembahasan Hasil Spektroskopi Senyawa Fenolik	43
4.3	Hasil Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa <i>trans</i> Oktil-4,5-Dihidroksi-3-Metoksi Sinamat	51
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1	Kesimpulan	52
5.2	Saran	52
	DAFTAR PUSTAKA	53
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
1.	Biosintesis senyawa fenolik	16
2.	Alat kromatografi kolom gravitasi	20
3.	Alat kromatografi kolom cair vakum	21
4.	Alat Kromatografi Kolom Cepat	22
5.	Skema kerja isolasi dan uji aktivitas anti radikal bebas senyawa fenolik fraksi etil asetat dari kulit batang tanaman <i>Cassia spectabilis</i> DC	39

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Hubungan antara diameter kolom dengan ukuran cuplikan	22
4.1	Hasil uji KLT senyawa fenolik hasil isolasi	43
4.2	Perbandingan harga pergeseran kimia ^{13}C -RMI senyawa hasil isolasi dengan senyawa turunan sinamat yang telah dilaporkan	47
4.3	Perbandingan harga pergeseran kimia ^1H -RMI senyawa hasil isolasi dengan senyawa turunan sinamat yang telah dilaporkan	48
4.4	Hasil pengukuran absorbansi senyawa <i>trans</i> oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat terhadap DPPH	51

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1.	Foto tumbuhan <i>Cassia spectabilis</i> DC
2.	Hasil KLT kromatografi kolom cair vakum
3.	Uji tiga sistem eluen senyawa fenolik hasil isolasi
4.	Kromatografi kolom cepat senyawa fenolik hasil isolasi
5.	Spektrum UV-Vis senyawa fenolik hasil isolasi dalam pelarut kloroform
6.	Spektrum IR senyawa fenolik hasil isolasi
7.	Spektrum ^{13}C -RMI senyawa fenolik hasil isolasi
8.	Spektrum ^1H -RMI senyawa fenolik hasil isolasi

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Permasalahan

Tumbuhan di daerah tropis seperti Indonesia, hidup dibawah kondisi lingkungan yang keras baik faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga, dan hama penyakit. Respon terhadap kondisi tersebut, tumbuhan mampu menghasilkan beraneka ragam senyawa kimia alami yang mempunyai bioaktivitas yang menarik. Senyawa-senyawa ini kemudian diketahui dapat bersifat sebagai insektisida, anti fungal, anti radikal bebas atau sitotoksik (Hakim, 2002).

Aktivitas biologis yang dimiliki suatu senyawa berhubungan dengan struktur molekulnya. Senyawa yang memiliki aktivitas sebagai anti radikal bebas pada umumnya memiliki struktur senyawa fenolik. Adanya gugus fenol yang mudah teroksidasi oleh radikal bebas akan membentuk suatu radikal bebas yang terstabilkan oleh delokalisasi elektron dan akan menangkap radikal bebas yang lain. Senyawa fenolik yang bersifat anti radikal bebas dapat dimanfaatkan sebagai bahan anti radikal bebas dalam tubuh untuk mencegah atau menghambat radikal bebas menyerang sel-sel tubuh dan mengakibatkan kerusakan jaringan. Aktivitas anti radikal bebas meningkat dengan bertambahnya gugus hidroksi yang tersubstitusi pada senyawa fenolik tersebut (Cos *et. al.*, 1998).

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan pada orbital luarnya sehingga bersifat tidak stabil dan sangat



reaktif. Molekul ini dapat menyebabkan kerusakan sel tubuh yang mengakibatkan timbulnya berbagai macam penyakit misalnya kanker, katarak dan penyakit lever serta ikut berperan dalam proses penuaan dini (Miller, 1996). Meskipun tubuh manusia dapat menghasilkan antioksidan endogen akan tetapi masih memerlukan antioksidan dari luar yang dapat diperoleh secara alami misalnya dari bahan makanan seperti buah dan sayuran, maupun dari senyawa hasil sintesis untuk meredam reaksi rantai radikal bebas dalam tubuh.

Antioksidan merupakan senyawa yang mudah teroksidasi dan mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi substrat serta dapat bersifat sebagai penangkal radikal bebas (Cuendet *et. al.*, 1997). Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol. Turunan asam sinamat yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan meliputi asam kafeat dan asam ferulat, sedangkan dari golongan flavonoid meliputi flavon, flavonol, dan isoflavon (Trilaksani, 2003).

Leguminosae merupakan salah satu famili tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia. Famili ini dilaporkan sebagai salah satu penghasil senyawa fenolik diantaranya adalah oligostilbenoid, flavonoid, dan antrakuinon. Senyawa hasil isolasi dari famili Leguminosae memperlihatkan beberapa aktivitas biologi yang sangat menarik (Sotheeswaran dan Pasupati, 1993).

Cassia, *Caragana* dan *Sophera* merupakan tiga genus famili Leguminosae yang dilaporkan mengandung senyawa flavonoid, oligostilbenoid dan antrakuinon (Kang *et. al.*, 2000; Ohyama *et. al.*, 1995). Beberapa senyawa flavonoid yang telah

berhasil diisolasi dari genus ini diantaranya berasal dari *Cassia alata* (Moriyama *et. al.*, 2003; Panichayupakaranant dan Kaewsuwan, 2004), dan *Cassia laevigata* (Tiwari dan Singh, 1979).

Cassia spectabilis merupakan salah satu spesies dari *Cassia*, berdasarkan penelusuran literatur diketahui bahwa dari daun dan kulit batang tanaman ini telah berhasil diisolasi senyawa golongan steroid, antrakuinon (Mulchandani dan Hassarajani, 1977) dan senyawa flavonoid (Andin, 2005), sedangkan pada bagian buah dan bunga tanaman ini juga dilaporkan adanya tiga piperidine alkaloid baru (Viegas *et. al.*, 2004). Berdasarkan penelusuran literatur sampai sekarang belum pernah dilaporkan adanya senyawa turunan sinamat yang merupakan golongan senyawa fenolik dari tumbuhan ini. Oleh karena itu tujuan dari penelitian ini adalah melakukan isolasi senyawa turunan sinamat dari kulit batang *Cassia spectabilis*, menentukan struktur sekaligus aktivitas anti radikal bebas senyawa hasil isolasi.

Pada awalnya, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid dan menentukan aktivitasnya sebagai anti radikal bebas, akan tetapi setelah dilakukan penelitian lebih lanjut ternyata didapatkan senyawa fenolik lain yaitu dari golongan turunan asam sinamat. Oleh karena itu, maka judul dari penelitian ini disesuaikan menjadi “Isolasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa Fenolik Fraksi Etil Asetat dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* Dc”.

Isolasi senyawa fenolik dilakukan dengan ekstraksi dan pemisahan melalui beberapa tahap fraksinasi, selanjutnya dilakukan pemilihan fraksi yang potensial dengan penentuan *assay* kromatografi lapis tipis. Struktur molekul senyawa

fenolik hasil isolasi ditentukan dengan metode spektroskopi ultraviolet, inframerah dan spektroskopi resonansi magnet inti. Skrining anti radikal bebas dilakukan pada masing-masing fraksi dengan metode *assay* autografi KLT menggunakan pereaksi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), senyawa yang memiliki aktivitas anti radikal bebas akan memberikan spot berwarna kuning.

Uji aktivitas anti radikal bebas dilakukan dengan mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Besarnya peredaman terhadap radikal DPPH dinyatakan dengan konsentrasi inhibitor IC_{50} yaitu besarnya konsentrasi larutan uji yang dapat menurunkan 50% absorbansi larutan DPPH dibandingkan dengan larutan blanko.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan dapat diambil suatu rumusan masalah sebagai berikut:

1. bagaimanakah struktur senyawa fenolik hasil isolasi dari kulit batang *Cassia spectabilis*?
2. apakah senyawa fenolik hasil isolasi tersebut mempunyai aktivitas sebagai anti radikal bebas?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. menentukan struktur senyawa fenolik hasil isolasi dari kulit batang tanaman *Cassia spectabilis*

2. menentukan aktivitas anti radikal bebas senyawa fenolik hasil isolasi tersebut

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dan wawasan tentang struktur kimia senyawa fenolik hasil isolasi dari kulit batang *Cassia spectabilis* dan aktivitasnya sebagai anti radikal bebas yang berguna sebagai tambahan informasi ilmiah bagi pengembangan bahan antioksidan alami dan perkembangan ilmu kimia bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Leguminosae

Leguminosae merupakan salah satu famili tumbuhan terbesar yang terdiri dari 16.400 spesies dan 657 genus terdistribusi didaerah tropis dan subtropis. Famili tumbuhan yang juga dikenal dengan nama Fabaceae ini dapat hidup hampir di tiap iklim dan lahan, terdapat dalam bentuk pohon, semak belukar, tumbuhan air dan tumbuhan pemanjat. Pada umumnya akar dari spesies famili ini dilengkapi dengan tuberkles (semacam kantung) yang mengandung bakteri kaya nitrogen dari genus rhizobium sehingga tumbuhan ini dapat mengambil lebih banyak nitrogen dari atmosfer (Harborne, 1971).

Famili ini dapat dibagi menjadi tiga subfamili yaitu Mimosoideae, Caesalpinioideae dan Papilionoideae. Mimosoideae dan Caesalpinioideae pada umumnya tumbuh didaerah tropis sedangkan Papilionoideae dapat tumbuh baik didaerah tropis dan hangat (Harborne, 1971). Genus dominan dari famili ini diantaranya adalah *Cassia*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Crotalaria*, *Indigofera*, dan *Desmodium*.

Di Indonesia famili tumbuhan yang juga dikenal sebagai polong-polongan ini memiliki banyak kegunaan, diantaranya sebagai bahan pangan, bahan obat-obatan, bahan pencahar, juga digunakan sebagai pewarna (Heyne, 1987).

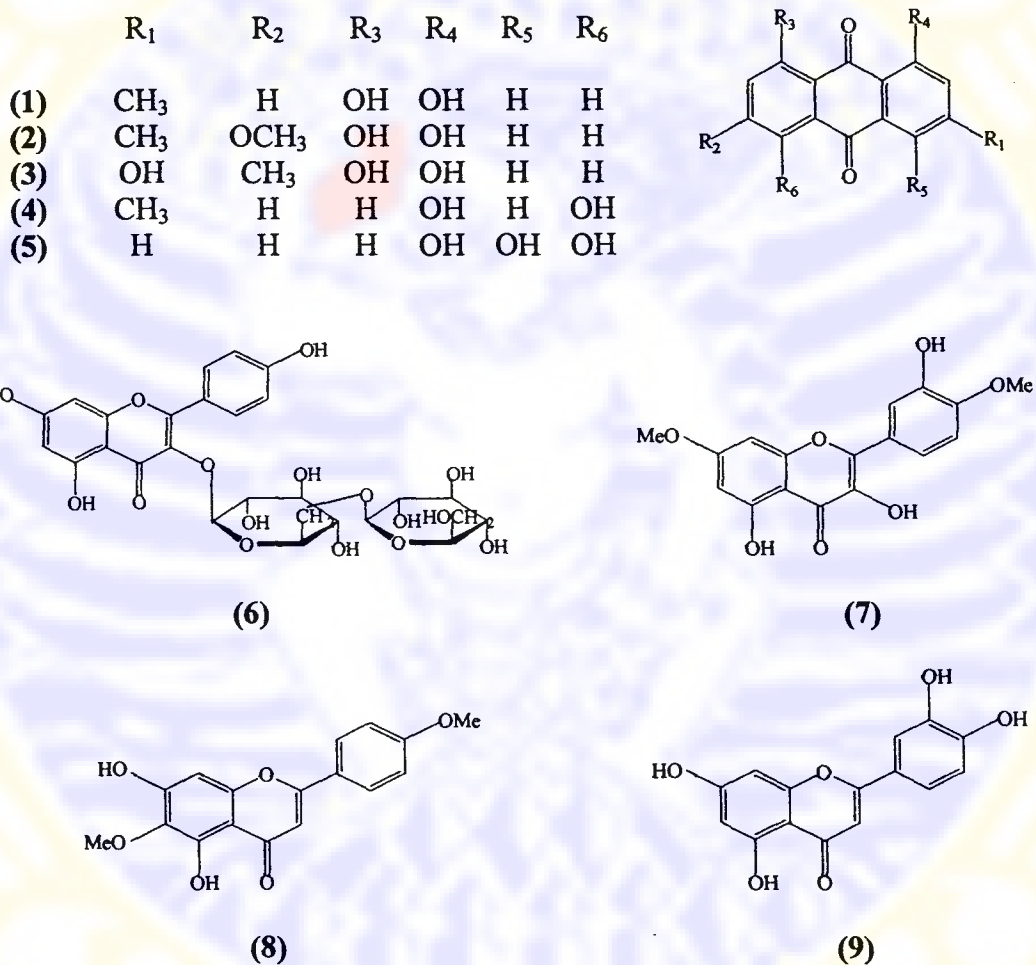
Beberapa senyawa fenolik telah berhasil diisolasi dari famili ini, salah satu diantaranya adalah oligostilbenoid yang berhasil diisolasi dari genus *Caragana* yaitu caraganafenol (Kitanaka, *et. al.*, 1996), dan hopeafenol dari genus *Sophora* (Inuma, *et. al.*, 1994). Disamping oligostilbenoid, pada leguminosae juga dilaporkan adanya senyawa fenolik lain dari golongan flavonoid dan flavonostilben yang merupakan gabungan antara unit flavon dan stilben. Leacianon I adalah flavonostilben yang berhasil diisolasi dari *Sophora leachiana* (Inuma, *et. al.*, 1994), sedangkan eukrestaflavanon, shophoraflavon G, dan leacianon A merupakan contoh senyawa flavonoid yang telah berhasil diisolasi dari famili ini (Kang, *et. al.*, 2000; Ohyama, *et. al.*, 1995). Keistimewaan senyawa flavonoid yang berhasil diisolasi dari famili ini adalah gugus isopren yang terikat pada flavonoid tersebut, senyawa ini lebih dikenal dengan senyawa flavonoid terprenilasi.

2.2 *Cassia*

Cassia merupakan salah satu genus dari famili Leguminosae yang berasal dari daerah tropis Amerika, tinggi pohon ini dapat mencapai 20 m, dapat tumbuh baik pada daerah tropis dengan ketinggian, tanah, temperatur dan curah hujan sedang. Spesies dari *Cassia* banyak dibudidayakan sebagai tanaman hias karena kecantikan bunganya (Heyne, 1987).

Secara tradisional banyak spesies dari genus *Cassia* yang dimanfaatkan dalam bidang obat-obatan, salah satu contohnya adalah *Cassia sieberiana* yang dimanfaatkan masyarakat Nigeria sebagai obat pencuci perut (pencahar), daun dan

Selain senyawa antrakuinon, dari genus *Cassia* juga dilaporkan adanya flavonoid diantaranya adalah kaempferol 3-O-gentibiosida (6) dari *Cassia alata* (Moriyama *et. al.*, 2003), ombuin (7) dari *Cassia laevigata* (Tiwari dan Singh, 1980), pektolinarigenin (8) dari kulit batang *Cassia renigera* (Tiwari dan Bajpai, 1977), dan suatu luteolin dari *Cassia siamea* (9) (Ingkaninan, 2000).



Senyawa fenolik lain dari genus ini yang tidak kalah menariknya adalah oligostilbenoid. Senyawa ini dilaporkan terdapat pada tiga genus yaitu *Cassia*, *Caragana*, dan *Sophora*. Dari *Cassia garrettiana* telah berhasil diisolasi senyawa 3',4,5',5 tetrahidroksistilben (10), cassigarol C (11) dan cassigarol D (12) yang memiliki aktivitas antifungal dan anti hipertensi (Baba *et. al.*, 1992).

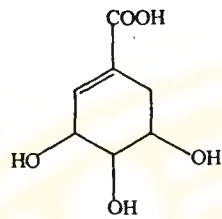
kayu sehingga cenderung untuk patah. Memerlukan pembabatan untuk menghasilkan struktur yang lebih kuat (lampiran 1) (Gilman dan Watson, 1993).

Struktur tumbuhan *Cassia spectabilis* DC adalah membulat, simetris, dan rapat. Daun berbentuk obovate dengan panjang 2-4 inci, dan berwarna hijau sepanjang tahun. Buahnya memiliki panjang 6-12 inci, bentuk memanjang, berupa polongan dengan struktur kulit keras atau kering (Gilman dan Watson, 1993)

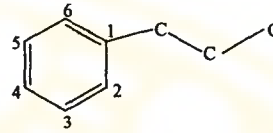
Cassia spectabilis secara tradisional banyak digunakan sebagai obat analgesik dan antiinflamatori. Selain itu, batang yang sudah sangat tua dari tanaman ini juga digunakan untuk tiang dan rumah (Heyne, 1987).

Menurut Tjitrosoepomo kedudukan *Cassia spectabilis* DC dalam taksonomi tumbuhan sebagai berikut:

Divisio	: Spermathophyta
Sub division	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Sub class	: Dialypetalae
Ordo	: Fabales
Familia	: Leguminosae / Fabaceae
Genus	: <i>Cassia</i>
Spesies	: <i>Cassia spectabilis</i> DC
Synonim	: <i>Senna spectabilis</i>



asam sinamat

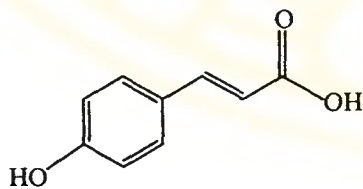


fenilpropanoid

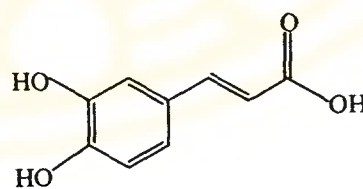
Beberapa jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan fenilpropanoid ialah turunan asam sinamat, turunan alilfenol, turunan propenil fenol, dan turunan kumarin. Beberapa senyawa fenilpropanoid mempunyai oksidasi maksimal trihidroksida yang sama seperti pola dari asam shikimat. Kemungkinan lain dari pola oksidasi ini ialah 3,4-dihidroksi atau 4-hidroksi atau tidak teroksidasi sama sekali (Achmad, 1986).

2.7 Senyawa Turunan Sinamat

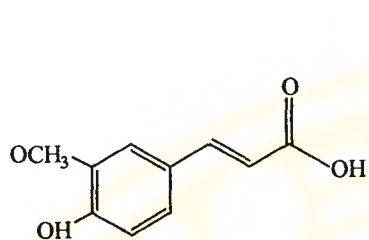
Senyawa-senyawa turunan sinamat seperti asam p-kumarat (13), asam kafeat (14), asam ferulat (15) dan asam sinapat (16) ditemukan secara luas di alam, terutama dalam bentuk esternya (Achmad, 1986). Beberapa senyawa turunan sinamat yang telah dilaporkan terdapat dalam beberapa spesies dari leguminosae diantaranya adalah metil (17) sinamat dan etil sinamat (18) dari *Trifolium pratense* (Anonim, 2005), sedangkan asam sinamat, benzyl sinamat (19) dan sinamil sinamat (20) dari *Myroxylon pereirae* (Felter dan Lloyd, 2006) dan *Myrospermum toluiferum* (Anonim, 2006).



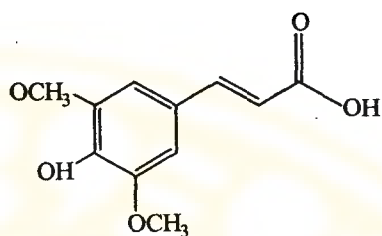
(13)



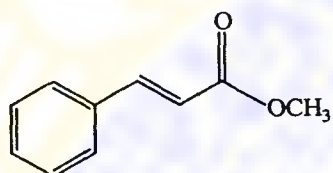
(14)



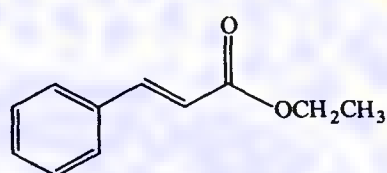
(15)



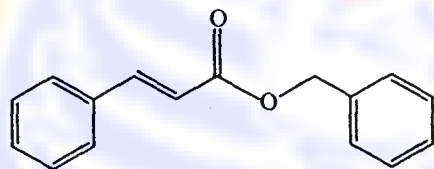
(16)



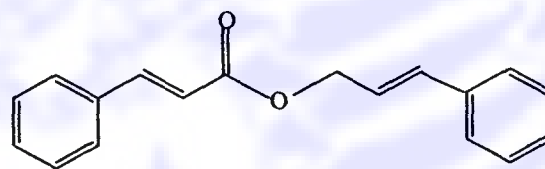
(17)



(18)

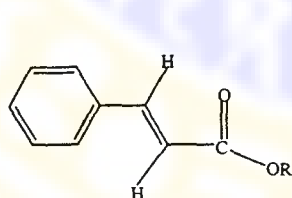


(19)

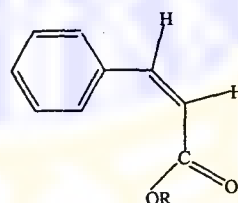


(20)

Pada senyawa-senyawa turunan sinamat yang telah ditemukan di alam, ikatan rangkap olefin umumnya mempunyai konfigurasi *trans* yang lebih stabil daripada konfigurasi *cis*. Akan tetapi, konfigurasi ini dapat diubah dari yang satu menjadi yang lain oleh sinar matahari terutama sinar ultraviolet, sehingga turunan sinamat yang dipisahkan dari jaringan tumbuhan lazimnya ialah campuran kesetimbangan dari kedua isomer tersebut (Achmad, 1986).



trans-sinamat



cis-sinamat

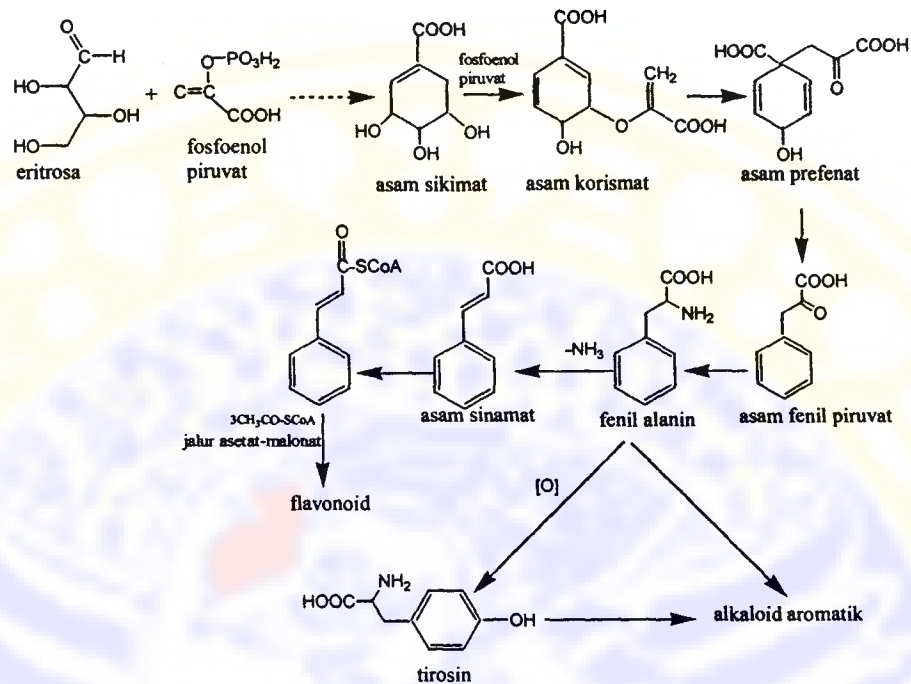
2.8 Biosintesis senyawa fenolik.

Senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki gugus fenol pada struktur molekulnya. Beberapa senyawa bahan alam yang termasuk ke dalam golongan senyawa fenolik diantaranya adalah fenilpropanoid, flavonoid, stilbenoid, antrakuinon dan alkaloid.

Biosintesa senyawa fenolik dapat berasal dari jalur shikimat, jalur asetat-malonat, maupun kombinasi dari kedua jalur tersebut. Fenilpropanoid merupakan salah satu kelompok fenol alam yang berasal dari jalur shikimat.

Biosintesa fenilpropanoid diawali dengan pembentukan asam shikimat dari eritrosa yang berkondensasi dengan asam fosfoenolpiruvat. Asam shikimat yang terbentuk selanjutnya diadisi oleh asam fosfoenolpiruvat menghasilkan asam p-fenolat yang kemudian melakukan aromatisasi membentuk asam fenilpiruvat. Reaksi reduktif aminasi dari asam fenilpiruvat menghasilkan fenilalanin yang dengan deaminasi akan menghasilkan asam sinamat. Reaksi paralel yang sejenis terhadap tirosin yang memiliki tingkat oksidasi lebih tinggi menghasilkan asam p-kumarat, dan selanjutnya asam kafeat, asam ferulat dan asam sinapat yang merupakan turunan dari sinamat.

Biosintesa senyawa flavonoid berasal dari kombinasi unit C₆-C₃ yakni senyawa turunan sinamat seperti asam p-kumarat, asam kafeat, asam ferulat dan asam sinapat, dengan tiga unit C₂ yaitu asetat atau malonat yang berasal dari jalur asetat-malonat. Senyawa alkaloid aromatik jenis fenilalanin dihasilkan dari fenilalanin, tirosin dan 3,4 dihidroksi fenilalanin (Achmad, 1986).



Gambar 1. Biosintesis senyawa fenolik (Achmad, 1986)

2.9 Isolasi dan Ekstraksi Senyawa Fenolik

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat tergantung pada tekstur, kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi (Gritter *et. al.*, 1991).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan pelarut organik terhadap bahan segar atau bahan kering. Pada prinsipnya senyawa polar diekstraksi dengan pelarut polar, sedangkan senyawa non polar diekstraksi dengan pelarut non polar. Proses ekstraksi tergantung dari kestabilan senyawa yang diisolasi, untuk senyawa metabolit sekunder khususnya senyawa fenolik, dianjurkan menggunakan ekstraksi pada suhu kamar (Harborne, 1987).

Isolasi senyawa fenolik dari jaringan tumbuhan dalam bentuk glikon maupun aglikon menggunakan pelarut etanol atau metanol pada suhu kamar dengan cara maserasi atau perkolasi. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian ditambahkan air (~10%) dan dipartisi dengan pelarut semi polar seperti diklorometan, kloroform atau etil asetat. Dengan demikian senyawa aglikon dan glikon fenolik dapat dipisahkan. Aglikon fenolik akan terekstrak dalam pelarut semi polar sedangkan glikonnya berada pada fasa air (Markham, 1988). Selanjutnya komponen kimia yang terdapat dalam ekstrak dipisahkan dengan metode kromatografi, antara lain kromatografi kolom gravitasi, kromatografi cair vakum, kromatografi kolom cepat dan sebagainya dengan menggunakan fasa diam silika gel, aluminium oksida atau selulosa (Markham, 1988).

2.10 Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan dan pemurnian dari campuran senyawa kimia yang didasarkan pada distribusi komponennya pada fasa gerak dan fasa diam. Pemisahan senyawa dengan metode kromatografi dapat memisahkan hampir setiap campuran kimia mulai dari berat molekul rendah sampai tinggi menjadi komponen-komponennya. Berdasarkan teknik pemisahannya kromatografi dapat dibedakan menjadi : kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi (Gritter *et. al.*, 1991).

2.10.1 Kromatografi lapis tipis.

Berdasarkan prinsipnya kromatografi lapis tipis (KLT) digolongkan pada kromatografi partisi atau kromatografi adsorpsi yang dibedakan pada pengaktifan fasa diamnya (pada kromatografi adsorpsi). Pada KLT, fasa diam berupa lapisan tipis (tebal 0,1-2 mm) yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan dengan bantuan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca tetapi dapat pula terbuat dari pelat polimer atau logam dengan ketebalan 0,1-2 mm. Lapisan pekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat biasanya digunakan kalsium sulfat atau amilum (pati). Fasa diam yang umum dipakai dalam kromatografi lapis tipis adalah silika gel, alumina, silika gel dan selulosa. Fasa gerak yang digunakan berupa hampir segala macam pelarut atau campuran pelarut (Hosstetmann *et. al.*, 1995).

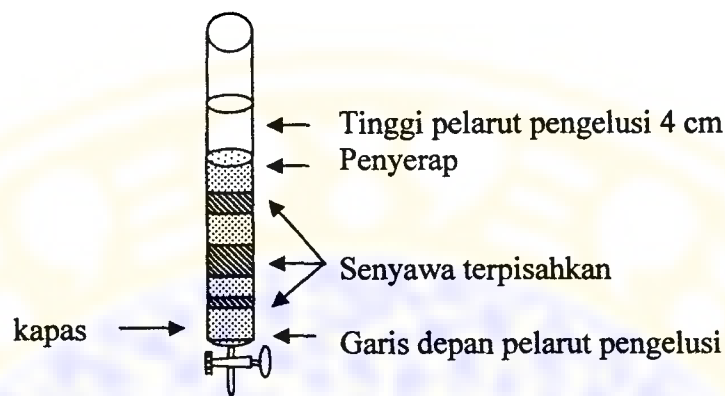
Urutan kerja pada KLT adalah campuran yang akan dipisahkan, dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, lebih menguntungkan jika dipakai pelarut pengembang atau pelarut yang kepolarannya sama dengan pengembang dan ditotolkan berupa bercak (garis tengah 15 mm) pada lapisan tipis (kira-kira 2 cm dari salah satu ujung satu pelat). Penotolan biasanya menggunakan pipa kapiler yang terbuat dari kaca. Selanjutnya pelat dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang bertindak sebagai fase gerak dan ditutup, untuk menjaga kejenuhan larutan digunakan kertas saring yang dimasukkan ke dalam bejana. Proses elusi dihentikan setelah eluen mengembang 10-15 cm diatas totolan cuplikan. Data diberikan dalam bentuk harga R_f (*Retardation factor*) senyawa dalam sistem pelarut tertentu (Hosstetmann *et. al.*, 1995).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Pemakaian KLT berguna untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif atau preparatif dan uji kemurnian suatu senyawa (Gritter *et. al.*, 1991). KLT dapat digunakan untuk mengetahui banyaknya komponen yang ada pada fraksi, sedangkan untuk uji kemurnian senyawa tunggal dapat dilakukan dengan mengelusi senyawa menggunakan tiga eluen yang berbeda dengan perbandingan tertentu, bila senyawa yang diperiksa murni akan diperoleh satu spot (Hosstetmann *et. al.*, 1995).

2.10.2 Kromatografi kolom gravitasi.

Pada pemisahan komponen senyawa kimia dengan metode kromatografi kolom gravitasi, campuran yang akan dipisahkan dimasukkan ke bagian atas kolom yang berisi fasa diam dan dilanjutkan dengan elusi bertahap dari setiap komponen dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Apabila telah dikondisikan dengan baik, campuran yang dipisahkan akan mengalir keluar dari kolom dengan laju yang berbeda dan dikumpulkan sebagai fraksi-fraksi. Fasa diam atau adsorben yang digunakan adalah silika gel, gel sephadex, sellulosa, dan poliamida. Pemisahan dengan metode kromatografi kolom pada umumnya menggunakan campuran pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara gradien (Gritter *et. al.*, 1991).



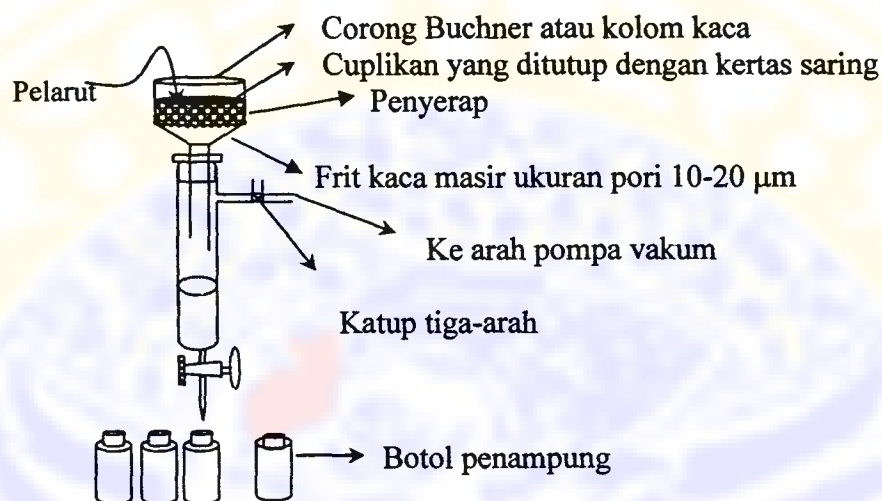
Gambar 2. Alat kromatografi kolom gravitasi (Gritter *et. al.*, 1991)

2.10.3 Kromatografi cair vakum.

Kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan corong buchner dan kolom pendek yang dilengkapi dengan kaca masir. Kromatografi ini dikemas kering dalam keadaan vakum dengan tujuan diperoleh kerapatan yang maksimum. Eluen yang kepolarannya rendah dituangkan ke permukaan adsorben, kolom dihisap sampai kering dan siap dipakai. Sampel diserapkan pada silika gel kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom dan dihisap perlahan-lahan dalam kemasan dengan memvakumkannya. Kolom selanjutnya dielusi dengan campuran pelarut yang sesuai, dimulai dari pelarut yang kepolarannya rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan, kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Oleh karena itu kromatografi cair vakum menggunakan tekanan rendah untuk meningkatkan laju aliran fase gerak (Hostettmann *et. al.*, 1995).

Ada dua keuntungan yang dapat diperoleh dengan menggunakan kromatografi vakum cair dibandingkan dengan kromatografi kolom gravitasi yaitu

waktu yang dibutuhkan relatif lebih cepat dan lebih hemat pelarut (Tanjung, 1996).



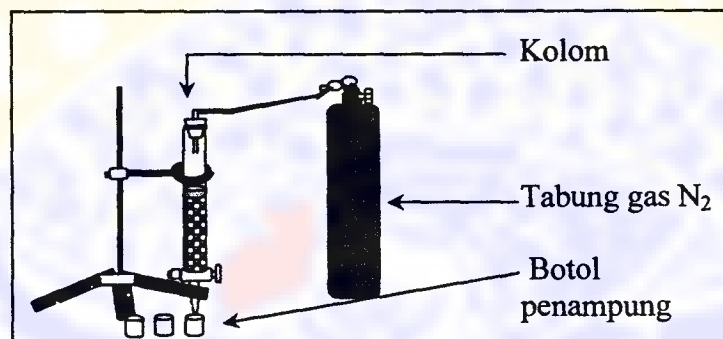
Gambar 3. Alat kromatografi kolom cair vakum (Hostettmann *et. al.*, 1995)

2.10.4 Kromatografi kolom cepat.

Kromatografi kolom cepat merupakan pengembangan atau modifikasi dari kromatografi kolom dengan bantuan tekanan gas nitrogen. Laju aliran kromatografi kolom cepat ini 50-60 ml per menit. Pada kromatografi kolom cepat, campuran dipisahkan memakai silika gel G₆₀ (Meck 7734) ukuran 0,063-0,200 mm dengan menggunakan tekanan gas nitrogen dari tangki silinder.

Cuplikan dimasukkan ke kolom dan kolom ditutup dengan penutup kolom yang dilengkapi dengan lubang masukan udara bertekanan dan katup jarum untuk mengendalikan pasokan udara bertekanan sehingga diperoleh tekanan yang mencapai 1 bar di atas tekanan atmosfer untuk mengatasi cuplikan. Keunggulan kromatografi kolom cepat dibandingkan kromatografi kolom gravitasi adalah waktu yang dibutuhkan relatif lebih cepat (Hostettmann *et. al.*, 1995). Ukuran kolom yang digunakan tergantung pada jumlah cuplikan yang akan dipisahkan,

banyaknya cuplikan berbanding lurus dengan luas penampang kolom (Gritter *et. al.*, 1991). Waktu yang diperlukan bergantung pada ukuran kolom. Ukuran kolom yang dilaporkan untuk kromatografi ini berdiameter 3 – 10 cm dan panjangnya 7 – 15 cm (Hostettmann *et. al.*, 1995).



Gambar 4. Alat Kromatografi Kolom Cepat (Hostettmann *et. al.*, 1995)

Tabel 2.1 Hubungan antara diameter kolom dengan ukuran cuplikan (tinggi lapisan penyerap 15 cm), (Still dalam Hostettmann, 1995)

Diameter kolom (mm)	Volume pengelusi (ml)	Besarnya cuplikan (mg)		Volume fraksi (ml)
		$\Delta R_f \geq 0,2$	$\Delta R_f \geq 0,1$	
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

2.11 Uji Sifat Fisika

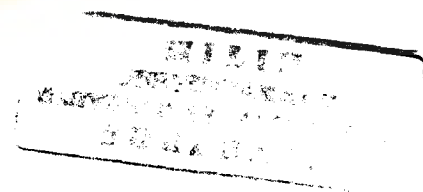
Uji sifat fisika dari senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menentukan titik lelehnya menggunakan Fisher Johns melting point apparatus. Senyawa hasil isolasi dikatakan murni apabila jarak suhu saat mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya adalah 2°C (Harborne dan Mabry, 1982).

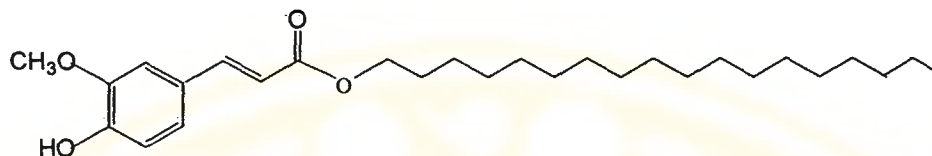
2.12 Spektroskopi

Metode spektroskopi bertujuan untuk menentukan struktur suatu senyawa yang tidak diketahui. Penentuan struktur senyawa organik umumnya menggunakan menggunakan kombinasi dari spektroskopi ultraviolet-visibel, spektroskopi inframerah, spektroskopi resonansi magnetik inti dan spektroskopi massa.

2.12.1 Spektroskopi ultraviolet-visibel.

Senyawa turunan sinamat dan senyawa-senyawa fenilpropanoid yang lain pada umumnya adalah senyawa fenolik yang memiliki gugus karbonil yang berkonjugasi dengan ikatan rangkap, $C=C-C=O$, oleh karena itu dapat menyerap sinar dari panjang gelombang daerah tampak atau daerah ultraviolet. Dengan demikian spektroskopi ultraviolet-visibel (UV-vis) dapat digunakan untuk membantu identifikasi senyawa-senyawa turunan sinamat yang mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang sekitar 245 nm dan sekitar 320 nm (Achmad, 1986). Salah satu contoh pola serapan spektroskopi UV-vis pada penentuan struktur senyawa turunan sinamat yaitu pada senyawa *trans* n-oktadesil ferulat yang berhasil diisolasi dari akar *Dendrobium clavatum* var. *Aurantiacum*, senyawa ini menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 243 nm dan 320 nm (Chang, S.J., *et. al.*, 2001).





trans n-oktadesil ferulat (Chang, S.J., *et. al.*, 2001)

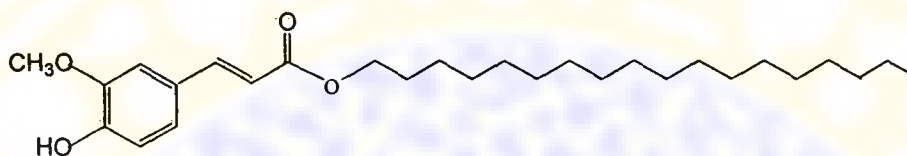
2.12.2 Spektroskopi infra merah.

Metode spektroskopi infra merah termasuk salah satu bagian dalam elucidasi struktur suatu senyawa di samping spektroskopi UV-Vis, RMI dan spektroskopi massa. Metode ini berguna untuk menganalisis dan mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada struktur molekul suatu senyawa. Spektrum infra merah senyawa organik dapat diukur dengan spektrofotometri inframerah yang merekam secara otomatis dalam bentuk larutan, bentuk gerusan dalam nujol, atau bentuk padat yang dicampur dengan KBr.

Analisis instrumental dengan spektroskopi ini menggunakan radiasi dengan rentang bilangan gelombang antara $4000\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ yang terbagi atas dua daerah yaitu daerah gugus fungsi pada rentang bilangan gelombang $4000\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ dan daerah sidik jari pada rentang bilangan gelombang $1600\text{-}670\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein *et. al.*, 1991).

Salah satu penerapan spektroskopi infra merah pada identifikasi gugus fungsi senyawa turunan sinamat dapat dilihat pada senyawa n-oktadesil *trans* ferulat. Pada spektrum infra merah pita serapan gugus -OH muncul pada bilangan gelombang 3540 cm^{-1} , adanya C-H alkil ditunjukkan dengan munculnya serapan pada 2919 cm^{-1} dan 2849 cm^{-1} , pita serapan gugus C=O yang berkonjugasi dengan

ikatan rangkap tampak pada bilangan gelombang 1681 cm^{-1} , dan gugus C=C aromatis terlihat pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} dan 1523 cm^{-1} (Chang, S.J., *et. al.*, 2001)



trans n-oktadesil ferulat (Chang, S.J., *et. al.*, 2001)

2.12.3 Spektroskopi resonansi magnet inti.

Penentuan struktur molekul dengan metode spektroskopi resonansi magnet inti (RMI) berdasarkan pada penyerapan energi oleh partikel yang sedang berputar dalam medan magnet yang kuat. Standar yang digunakan dalam analisis ^1H adalah pelarut terdeuterasi yang digunakan untuk melarutkan sampel dalam analisis (Hendayana, *et. al.*, 1994). Keunggulan dari tehnik spektroskopi ini adalah sampel dapat diperoleh kembali setelah pengukuran tanpa mengalami perubahan (Harborne, 1987). Dalam penentuan struktur molekul senyawa organik, spektroskopi RMI sangat berperan dan memberikan kontribusi yang besar dalam penentuan struktur.

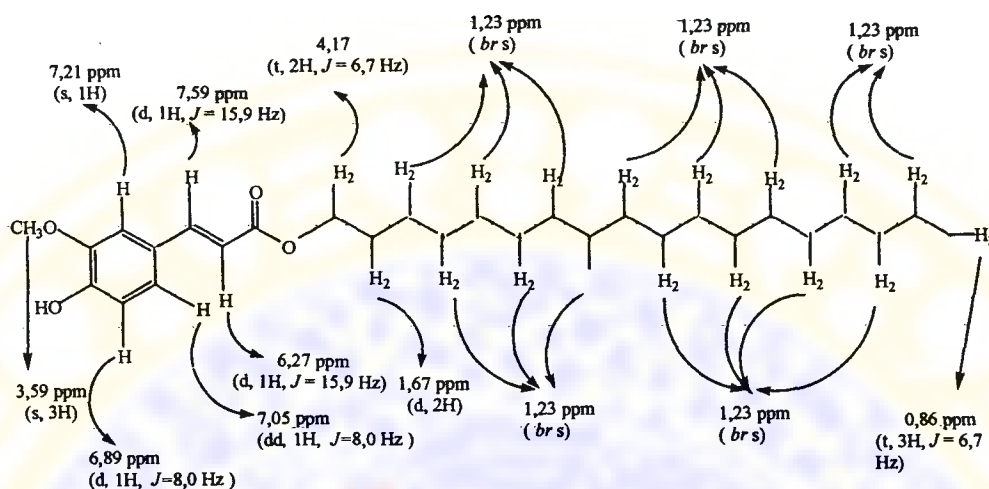
2.12.3.1 Spektroskopi resonansi magnet inti proton.

Dalam identifikasi struktur senyawa organik, spektroskopi resonansi magnet inti proton sangat berguna untuk mengetahui letak dan jumlah proton berdasarkan pergeseran kimia dan konstanta koplingnya. Spektrum yang dihasilkan merupakan hasil rekaman sejumlah atom hidrogen yang berada dalam

lingkungan kimia yang berlainan. Garis vertikal pada spektrum menunjukkan intensitas sedangkan garis horizontal merupakan pergeseran kimia dalam satuan ppm. Spektrum ^1H -RMI terlihat terutama didaerah 0 sampai 10 ppm. Integrasi atau ukuran sinyal yang diperoleh berbanding lurus dengan jumlah proton yang menghasilkan sinyal (Markham, 1988).

Pengukuran absorpsi radiasi elektromagnetik pada spektroskopi resonansi magnet inti proton berada didaerah frekuensi radio 4–6000 MHz atau panjang gelombang 75–0,5 m oleh partikel (inti atom) yang berputar didalam medan magnet. Pelarut yang dipilih untuk melarutkan sampel haruslah inert dan tidak mempunyai proton seperti : deuterokloroform (CD_3Cl), deuterioaseton (CD_3COCD_3) dan karbontetraklorida (CCl_4) (Hendayana *et. al.*, 1994).

Berikut ini merupakan contoh penggunaan spektrum ^1H -RMI dalam identifikasi senyawa turunan sinamat yaitu n-oktadesil trans ferulat yang berhasil diisolasi dari akar *dendrobium clavatum* var. *Aurantiacum* yaitu n-oktadesil trans ferulat. Pengukuran dilakukan dalam pelarut CDCl_3 dengan alat spektroskopi ^1H -RMI 500 MHz (Chang, S.J., *et. al.*, 2001).



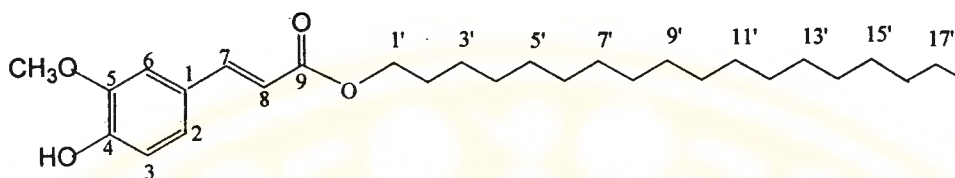
trans n-oktadesil ferulat (Chang, S.J., *et. al.*, 2001)

2.12.3.2 Spektroskopi resonansi magnet inti karbon.

Spektrum yang dihasilkan oleh ^1H -RMI tidak dapat memberikan keterangan langsung mengenai sifat kerangka karbon molekul, informasi tersebut hanya dapat diperoleh dari spektroskopi 13-karbon RMI (Harborne, 1987).

Resonansi karbon-13 terjadi terutama didaerah 0-200 ppm dan setiap karbon yang berlainan akan menghasilkan satu sinyal. Adapun pelarut yang digunakan pada spektroskopi ini sama dengan spektroskopi ^1H -RMI.

Berikut ini merupakan contoh hasil spektrum ^{13}C -RMI senyawa *trans* n-oktadesil ferulat dalam pelarut CDCl_3 yang memberikan sinyal pada pergeseran kimia (ppm): 14,1 (C-18'), 22,7, 26,0, 29,4, 29,7, 31,9 ((CH_2)_n), 28,8 (C-2'), 55,9 (C-met), 64,6 (C-1'), 109,3 (C-6), 114,7 (C-3), 115,7 (C-8), 123,0 (C-2), 127,1 (C-1), 144,6 (C-7), 146,8 (C-4), 147,9 (C-5) dan 167,4 (C-9) (Chang, S.J., *et. al.*, 2001).



trans n-oktadesil ferulat (Chang, S.J., *et. al.*, 2001)

2.13 Anti Radikal Bebas

Radikal bebas atau oksidan merupakan suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan pada orbital luar sehingga bersifat sangat tidak stabil dan sangat reaktif untuk memperoleh pasangan elektron. Radikal bebas dan oksidan mempunyai kecenderungan yang sama 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 *et. al.*, 1995). Keberadaan radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan sel yang akan menimbulkan berbagai macam penyakit misalnya kanker, katarak, penyakit lever dan jantung koroner (Miller, 1996).

Radikal bebas secara normal timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, berupa hasil sampingan dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernapas, metabolisme sel, peradangan atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan seperti asap kendaraan bermotor, asap rokok, bahan pencemar, dan radiasi matahari (Trilaksani, 2003)

Tubuh manusia memiliki sistem pertahanan terhadap efek buruk yang diakibatkan radikal bebas dengan tersedianya enzim yang berfungsi sebagai

antioksidan yaitu glutathion peroksidase (GSH), katalase dan superoksida dismutase (SOD) (Miller, 1996). Akan tetapi dengan pertambahan usia, kurangnya zat gizi atau terganggunya keseimbangan sistem dalam tubuh, produksi kedua enzim tersebut menjadi berkurang sehingga tidak mampu lagi menangkal radikal bebas dalam tubuh. Dengan demikian tubuh memerlukan antioksidan tambahan dari luar yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dengan meredam dampak negatif senyawa ini.

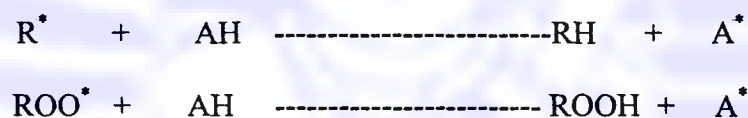
Menurut Cuendet tahun 1997 antioksidan adalah suatu zat yang mudah teroksidasi dan mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi substrat serta dapat bersifat sebagai penangkal radikal bebas.

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT) dan Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) merupakan contoh antioksidan yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Panichayupakaranant dan Kaewsuan, 2004; Trilaksani, 2003). Sedangkan flavonoid, antrakuinon, vitamin C, vitamin E, dan β karoten adalah beberapa contoh antioksidan alami (Gonda *et. al.*, 2000; Panichayupakaranant dan Kaewsuan, 2004).

Antioksidan yang diisolasi dari sumber alami pada umumnya berasal dari tumbuhan. Sebagian besar dari senyawa antioksidan adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol. Turunan sinamat yang memiliki aktivitas antioksidan

meliputi asam kafeat, asam ferulat dan lain-lain (Trilaksani, 2003). Bioaktivitas anti radikal bebas senyawa fenolik berbanding lurus dengan banyaknya gugus hidroksi yang tersubstitusi, maka semakin banyak gugus hidroksi semakin tinggi aktivitas anti radikal bebas (Cos *et. al.*, 1998).

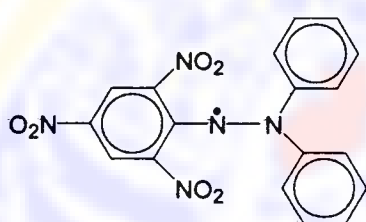
Berdasarkan fungsinya, antioksidan dapat dikelompokkan menjadi antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer memiliki fungsi utama yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Reaksi Penghambatan antioksidan terhadap radikal bebas adalah sebagai berikut (Trilaksani, 2003):



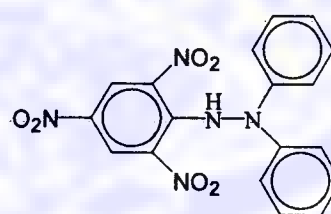
Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru .

Antioksidan sekunder memiliki fungsi memperlambat laju oksidasi dengan memberikan efek sinergis pada mekanisme kerja antioksidan primer, misalnya pada sistem makanan, asam sitrat dan asam askorbat sering ditambahkan sebagai antioksidan sekunder yang memberikan suasana asam pada medium (Trilaksani, 2003).

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur aktivitas penangkapan radikal bebas dari DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). DPPH menjadi sangat reaktif bila terdapat senyawa lain yang siap memberikan atom hidrogennya dan membentuk DPPH non radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) (Cos *et. al.*,1998).



2,2-difenil-1-pikrilhidrazil



2,2-difenil-1-pikrilhidrazin

Reaksi yang terjadi antara DPPH dengan senyawa pemberi atom hidrogen adalah sebagai berikut :



Besarnya peredaman terhadap radikal DPPH dinyatakan dengan IC_{50} (*Inhibitor Concentration 50%*) yaitu besarnya konsentrasi larutan uji yang dapat menurunkan 50% absorbansi larutan DPPH dibandingkan dengan larutan blanko. Absorbansi dari larutan uji setelah ditambah DPPH diukur pada tiga panjang gelombang yaitu 497 nm, 517 nm dan 537 nm. Aktivitas anti radikal bebas dari senyawa tersebut dapat dihitung absorbansinya dengan rumus : Absorbansi hitung

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

Sedangkan perhitungan kapasitas anti radikal bebas sebagai % peredaman absorbansi adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ Peredaman DPPH} = \left[1 - \frac{(\text{A hitung bahan uji})}{\text{A hitung DPPH (pembeding)}} \right] \times 100\%$$

Penentuan daya hambat IC_{50} (inhibitor concentration 50%) berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa. Apabila IC_{50} lebih kecil 1000 ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai anti radikal bebas (Cos *et. al.*,1998).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2005 - Januari 2006 di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya. Identifikasi dengan spektroskopi RMI dilakukan di Laboratorium Kimia, Fakultas Ilmu Biologi dan Kimia, Universitas Queensland, St. Lucia 4067, Brisbane, Australia.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian.

Bahan tumbuhan yang digunakan berupa kulit batang *Cassia spectabilis* yang diperoleh dan diidentifikasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur.

3.2.2 Bahan kimia.

Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, n-heksana, etil asetat, aseton, kloroform, magnesium sulfat anhidrat, pelat silika gel GF₂₅₄, silika gel G₆₀ Merck 7733 ukuran 0,200-0,500 mm, silika gel G₆₀ Merck 7734 ukuran 0,063-0,200 mm, silika gel GF₂₅₄ Merck 7730 ukuran 0,005-0,025 mm, pereaksi cerium sulfat (CeSO₄), piridin (C₆D₅N) yang digunakan sebagai pelarut dalam

pengukuran spektroskopi RMI, larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 10^{-4} M dalam etanol digunakan sebagai bahan uji aktivitas anti radikal bebas.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk keperluan ekstraksi adalah yang berkualitas teknik dan telah didestilasi, sedangkan untuk keperluan analisis dan pemurnian menggunakan bahan kimia yang berkualitas pro analisis (p.a).

3.2.3 Alat penelitian.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin giling, seperangkat alat kromatografi kolom cair vakum, alat kromatografi kolom cepat, alat destilasi, *rotary vacuum evaporator*, alat-alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium, dan bejana kromatografi lapis tipis.

Alat-alat yang digunakan untuk keperluan analisis dan identifikasi digunakan *Fisher Johns melting point apparatus*, spektrofotometer FTIR JASCO-5300, spektrofotometer UV-Vis Beckman DU 7500, spektrometer ^1H -RMI Brucker AV 500 dan ^{13}C -RMI Brucker Varian AV 400.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Isolasi dan pemurnian senyawa anti radikal bebas.

Kulit batang *Cassia spectabilis* DC dibersihkan, dikeringkan dibawah sinar matahari dan dipotong-potong, setelah itu dihaluskan dengan menggunakan mesin giling hingga berbentuk serbuk.

Serbuk kulit batang *Cassia spectabilis* DC dimaserasi sebanyak dua kali masing-masing selama 2 x 24 jam pada suhu kamar dengan menggunakan pelarut

aseton. Ekstrak aseton yang diperoleh diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator*, ekstrak kental kemudian dilarutkan dengan metanol - air 10% selanjutnya dipartisi dengan n-heksana sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Fraksi metanol – air kemudian dipartisi dengan menggunakan etil asetat sebanyak 3 kali. Selanjutnya fraksi etil asetat yang diperoleh dikeringkan menggunakan magnesium sulfat anhidrat yang telah diaktifkan dengan pemanasan, kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* menghasilkan fraksi etil asetat bebas air.

Jumlah komponen senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi etil asetat ditentukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai macam perbandingan eluen. Eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada fraksi etil asetat dengan spot senyawa terbanyak dan jarak antar spot yang baik, kemudian digunakan sebagai acuan dalam proses pemisahan selanjutnya. Sebagai penampak noda digunakan lampu UV dan pereaksi CeSO_4 .

Pemisahan komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum. Fraksi etil asetat kental dilarutkan kembali dalam etil asetat dan diserapkan pada silika gel G_{60} ukuran 0,200-0,500 mm dengan perbandingan sampel : silika = 1 : 2, kemudian diletakkan diatas silika gel G_{60} ukuran 0,063-0,200 mm yang sudah *dipacking* dalam kolom cair vakum dengan diameter dan tinggi kolom yang sesuai. Elusi dilakukan dengan menggunakan pelarut campuran dalam berbagai perbandingan dengan menaikkan gradien kepolaran. Eluat dengan noda-noda yang memiliki harga R_f yang sama digabung hingga diperoleh fraksi-fraksi. Pada fraksi-fraksi

tersebut dilakukan uji pendahuluan untuk mengetahui aktivitas anti radikal bebas dengan menggunakan metode *assay* KLT-autografi, spot senyawa dengan pereaksi DPPH menunjukkan hasil positif dengan memberikan warna kuning, untuk selanjutnya spot senyawa tersebut dijadikan target dalam isolasi.

Fraksi-fraksi yang memiliki noda dengan warna dan harga Rf yang sama selanjutnya digabung dan dipisahkan komponen senyawa kimia didalamnya dengan metode kromatografi kolom cepat berulang-ulang menggunakan silika gel G₆₀ berukuran 0,063-0,200 mm dan eluen dalam berbagai perbandingan sampai diperoleh senyawa fenolik.

Senyawa fenolik hasil isolasi kemudian direkristalisasi dengan menggunakan pelarut yang berkualitas pro analisis. Selanjutnya dilakukan uji kemurnian senyawa fenolik hasil isolasi dengan uji KLT tiga sistem eluen dan uji titik leleh. Struktur molekul senyawa fenolik hasil isolasi ditentukan dengan kombinasi beberapa analisis spektroskopi yaitu spektroskopi ultraviolet – visibel, spektroskopi infra-merah dan spektroskopi resonansi magnet inti. Skema kerja isolasi dan uji aktivitas anti radikal bebas selengkapnya terdapat dalam gambar 5.

3.3.2 Uji sifat fisika senyawa hasil isolasi.

Senyawa hasil isolasi ditentukan titik lelehnya menggunakan Fisher Johns melting point apparatus dengan mengamati suhu saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan. Senyawa hasil isolasi dikatakan murni apabila jarak suhu saat mulai meleleh sampai meleleh seluruhnya adalah 2⁰C (Harborne dan Mabry, 1982).

3.3.3 Analisis spektroskopi senyawa hasil isolasi.

3.3.3.1 Spektroskopi ultraviolet – visibel.

Senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 mg dilarutkan dalam labu ukur 10 ml dalam metanol atau etanol sampai volumenya 10 ml, kemudian diukur panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) (Markham, 1988).

3.3.3.2 Spektroskopi infra-merah.

Senyawa hasil isolasi sebanyak 1 mg digerus dengan KBr dalam keadaan bebas air kemudian dibuat pellet KBr dan diukur serapannya pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} (Harborne, 1987).

3.3.3.3 Spektroskopi resonansi magnet inti.

Untuk analisis proton dengan spektroskopi resonansi magnet inti, senyawa fenolik hasil isolasi sebanyak 10-20 mg dilarutkan dalam pelarut piridin ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) dan diukur pada pergeseran 0 – 14 ppm sedangkan untuk analisis karbon RMI senyawa fenolik hasil isolasi dilarutkan dalam pelarut yang sama dan diukur pada pergeseran 0-200 ppm (Harborne, 1987).

3.3.4 Uji aktivitas anti radikal bebas.

Uji pendahuluan aktivitas anti radikal bebas dilakukan dengan *assay* KLT-autografi. Hasil kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai disemprot dengan pereaksi DPPH dalam etanol. Uji positif ditandai dengan adanya warna

kuning pada spot senyawa yang akan dijadikan target untuk diisolasi (Cuendet, *et. al.* 1997).

Aktivitas antioksidan senyawa hasil isolasi ditentukan secara spektrometri dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm dan 537 nm. Sampel senyawa dilarutkan dalam etanol dengan variasi konsentrasi yaitu 1000 ppm dan 500 ppm. Sampel sebanyak 1,0 ml ditambah 1,0 ml buffer asam asetat 0,1 M pH 5,5 dan 0,5 ml DPPH 10^{-4} M dalam etanol kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 20°C , setelah itu larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 497 nm, 517 nm dan 537 nm. Perlakuan terhadap larutan standar sama dengan larutan sampel (Gonda *et. al.*, 2000).

Larutan pembanding dibuat dengan cara melarutkan 1,0 ml larutan DPPH 5×10^{-4} M dalam etanol ke dalam 2,0 ml buffer asetat dan 2,0 ml etanol. Sedangkan larutan blanko yang digunakan diperoleh dengan cara melarutkan 3,0 ml etanol dengan 2,0 ml larutan buffer asetat pH 5,5 (Gonda *et. al.*, 2000).

Observasi aktivitas anti radikal bebas senyawa terhadap pereaksi DPPH dapat dihitung absorbansinya sebagai berikut:

$$A_{\text{hit}} = A_{517 \text{ nm}} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$

Keterangan: A_{517} : Absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm.

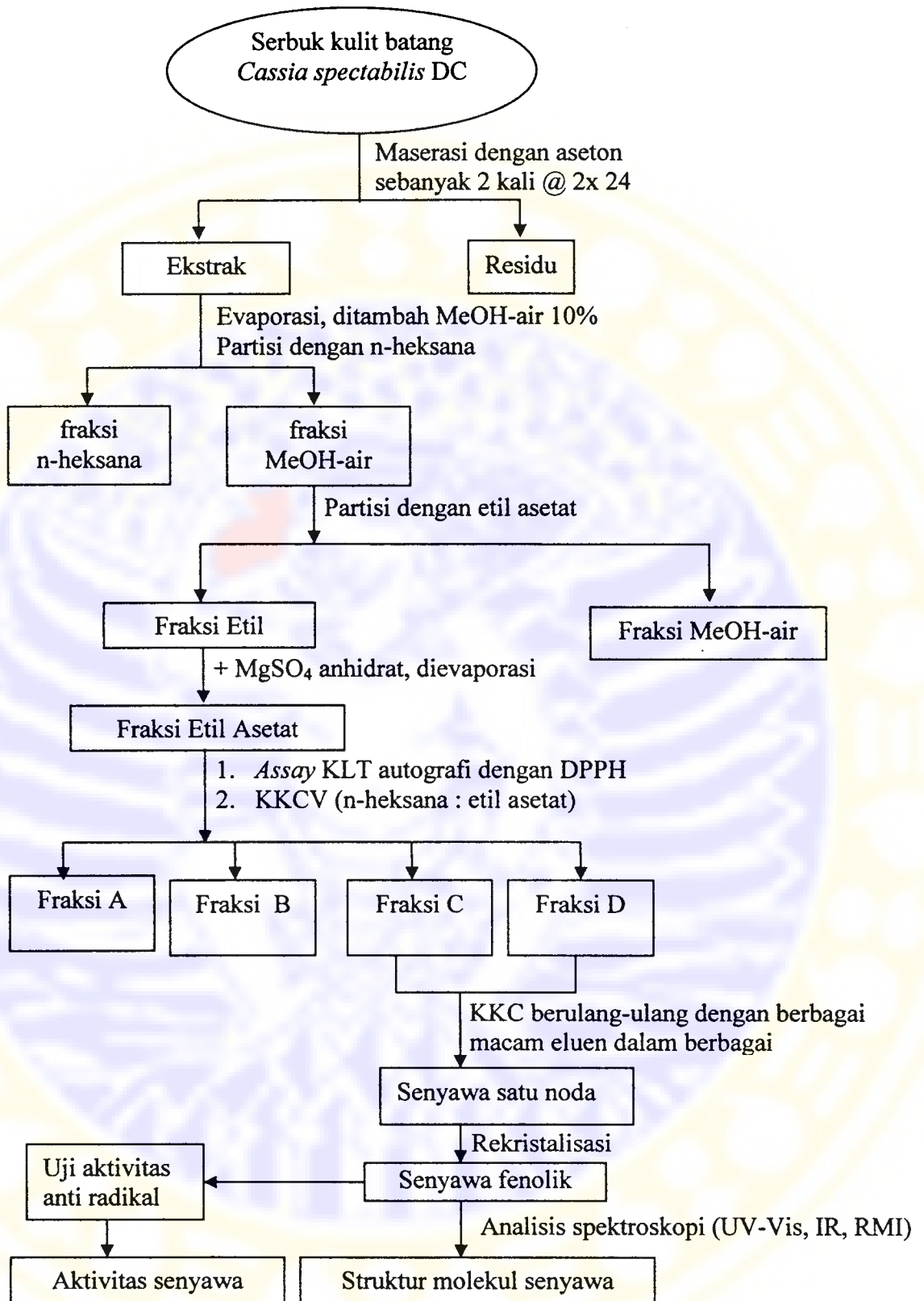
A_{497} : Absorbansi diukur pada panjang gelombang 497 nm.

A_{537} : Absorbansi diukur pada panjang gelombang 537 nm.

Kapasitas anti radikal bebas sebagai % peredaman absorbansi adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Peredaman DPPH} = \left[1 - \frac{(\text{A hitung bahan uji})}{\text{A hitung DPPH (pembanding)}} \right] \times 100\%$$

Penentuan daya hambat IC_{50} (*inhibitor concentration 50%*) berdasarkan analisis regresi linier % peredaman DPPH terhadap konsentrasi senyawa. Apabila IC_{50} lebih kecil 1000 ppm maka senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai anti radikal bebas (Cos *et. al.*, 1998).



Gambar 5. Skema kerja isolasi dan uji aktivitas anti radikal bebas senyawa fenolik fraksi etil asetat dari kulit batang tanaman *Cassia spectabilis* DC

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Fenolik

4.1.1 Hasil ekstraksi.

Kulit batang tumbuhan *Cassia spectabilis* DC dibersihkan dari kotoran yang menempel pada lapisan luar, dikeringkan, dan dipotong-potong, kemudian dihaluskan dengan menggunakan mesin giling hingga diperoleh serbuk sebanyak 3,5 kg.

Serbuk kulit batang *Cassia spectabilis* DC sebanyak 3,5 kg dimaserasi menggunakan pelarut aseton sebanyak dua kali masing-masing selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak aseton yang diperoleh diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental aseton kemudian dilarutkan dengan metanol-air 10% selanjutnya dipartisi dengan n-heksana sebanyak 3 kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Fraksi metanol-air kemudian dipartisi dengan menggunakan etil asetat sebanyak 3 kali untuk mendapatkan senyawa fenolik. Fraksi etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan magnesium sulfat anhidrat selama 24 jam kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental etil asetat sebanyak 30,5 g.

Untuk mengetahui jumlah komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat yang diperoleh, dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai macam perbandingan eluen. Berdasarkan hasil uji KLT, eluen yang

memberikan pemisahan dengan spot senyawa terbanyak dan jarak antar spot yang baik adalah eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 (lampiran 2). Eluen tersebut kemudian digunakan sebagai acuan dalam proses pemisahan selanjutnya. Penampak noda dari kromatogram hasil uji KLT pada fraksi etil asetat menggunakan lampu UV dan pereaksi CeSO_4 .

4.1.2 Hasil isolasi.

Pemisahan komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum. Fraksi etil asetat kental sebanyak 30,5 g dilarutkan kembali dalam etil asetat dan diserapkan pada silika gel G_{60} berukuran 0,200-0,500 mm dengan perbandingan sampel : silika = 1 : 2, kemudian diletakkan diatas silika gel G_{60} ukuran 0,063-0,200 mm yang sudah *dipacking* dalam kolom cair vakum dengan diameter 10 cm dan tinggi kolom 6,5 cm. Elusi dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana–etil asetat dalam berbagai perbandingan berdasarkan peningkatan gradien kepolarannya. Eluat dengan noda-noda yang memiliki harga R_f yang sama digabung hingga akhirnya diperoleh 4 fraksi yaitu fraksi A (1-2), B (3-6), C (7-10) dan D (11-24). Dari hasil uji pendahuluan aktivitas anti radikal bebas dengan metode *assay* KLT-autografi menggunakan pereaksi DPPH yang dilakukan pada keempat fraksi, fraksi C dan fraksi D menunjukkan hasil positif dengan memberikan warna kuning. Kedua fraksi tersebut selanjutnya dijadikan target dalam isolasi dan dilakukan pemisahan lebih lanjut.

Sebagian fraksi D sebanyak 2 g yang memiliki noda dengan warna dan harga R_f yang hampir sama dengan fraksi C sebanyak 5,1 g selanjutnya digabung dan dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom cepat. Campuran kedua fraksi diserapkan pada silika gel G_{60} berukuran 0,200-0,500 mm kemudian diletakkan diatas silika gel G_{60} berukuran 0,063-0,200 mm yang sudah *dipacking* dalam kolom. Proses elusi menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (9 : 1) dan dihasilkan 71 fraksi. Fraksi-fraksi tersebut kemudian diuji dengan KLT dan fraksi yang memiliki noda dengan harga R_f yang sama selanjutnya digabung sehingga diperoleh 6 fraksi C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, dan C-6. Dari keenam fraksi, dilakukan pemisahan lebih lanjut terhadap fraksi C-4 sebanyak 4,5 g.

Pemisahan komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi C-4 dilakukan dengan kromatografi kolom cepat menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2) (lampiran 4). Terhadap fraksi mayor yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom cepat sebanyak dua kali masing-masing menggunakan eluen kloroform : metanol (9,75 : 0,25) dan n-heksana : aseton (9,5 : 0,25). Komponen senyawa kimia didalam fraksi mayor yang diperoleh selanjutnya dipisahkan lagi dengan kromatografi kolom cepat beberapa kali menggunakan berbagai macam eluen dalam berbagai perbandingan hingga diperoleh senyawa yang hampir murni.

Rekristalisasi senyawa hasil isolasi menggunakan kloroform–n-heksana dengan kualitas pro analisis menghasilkan padatan berwarna putih kekuningan sebanyak 40 mg dengan titik leleh 238°C (terdekomposisi). Uji kemurnian senyawa hasil isolasi menggunakan KLT dengan tiga sistem eluen yang berbeda

yaitu kloroform : metanol (9,5 : 2,5), n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan n-heksana : aseton (8 : 2). Dari hasil uji KLT dengan tiga sistem eluen, tampak bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa murni yang ditunjukkan dengan hanya adanya 1 noda pada plat KLT (lampiran 3). Perbandingan harga R_f senyawa hasil isolasi dalam uji tiga sistem eluen disajikan dalam tabel berikut:

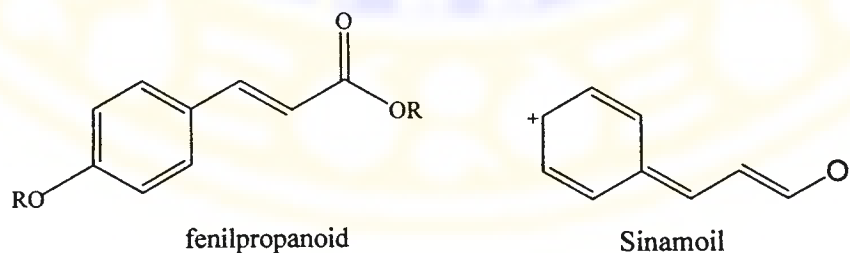
Tabel 4.1 Hasil uji KLT senyawa fenolik hasil isolasi

Eluen	Harga R_f	Jumlah noda
n-heksana : aseton = 8 : 2	0,325	1 noda
n-heksana : etil asetat = 8 : 2	0,300	1 noda
kloroform : metanol = 9,75 : 0,25	0,320	1 noda

4.2 Pembahasan Hasil Spektroskopi Senyawa Fenolik

Penentuan struktur molekul senyawa fenolik hasil isolasi dilakukan dengan kombinasi analisis spektroskopi ultraviolet-visibel, spektroskopi inframerah, dan spektroskopi resonansi magnet inti.

Hasil analisis spektroskopi ultraviolet-visibel menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang (λ_{maks}) 297,0 nm (sh) dan 319,0 nm yang merupakan serapan khas gugus sinamoil (lampiran 5), berdasarkan penelusuran literatur puncak serapan tersebut merupakan puncak serapan khas senyawa fenolik khususnya fenilpropanoid (Chang S.J. *et. al.*, 2001).



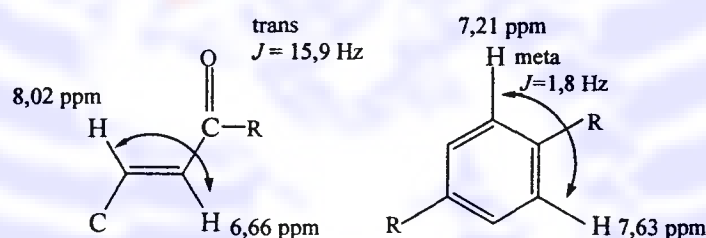
Data tersebut didukung oleh hasil analisis dengan spektroskopi inframerah yang menunjukkan bahwa senyawa fenolik hasil isolasi mempunyai gugus karbonil terkonjugasi pada bilangan gelombang $1685,94\text{ cm}^{-1}$. Gugus karbonil tersebut terikat pada gugus C-O-C ester yang muncul pada $1277,00\text{ cm}^{-1}$. Adanya gugus OH dari senyawa fenolik terlihat dengan pita serapan melebar pada $3479,90\text{ cm}^{-1}$, gugus C=C aromatis ditunjukkan oleh pita serapan pada 1471 cm^{-1} sampai $1602,99\text{ cm}^{-1}$ sedangkan gugus alkil yang terikat gugus ester terlihat pada serapan $2918,56\text{ cm}^{-1}$ dengan pita serapan kuat. Adanya gugus eter terlihat pada pita serapan 1180 cm^{-1} (lampiran 6)(Chang S.J. *et. al.*, 2001).

Analisis spektroskopi karbon ^{13}C -RMI dalam pelarut piridin ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) memberikan informasi mengenai kerangka karbon senyawa fenolik hasil isolasi dengan munculnya 18 sinyal yang mewakili 18 atom karbon yaitu δ (ppm) : 167,5; 150,5; 147,7; 145,8; 126,9; 122,0; 116,7; 115,8; 115,1; 64,8; 64,4; 32,1; 29,6; 29,5; 29,2; 26,3; 22,9 dan 14,3 (lampiran 7). Kedelapan belas atom karbon tersebut terdiri atas delapan atom karbon ikatan rangkap yaitu dari karbon aromatik dan vinilik pada pergeseran kimia δ (ppm): 150,5; 147,7; 145,8; 126,9; 122,0; 116,7; 115,8; dan 115,1, satu atom karbon karbonil pada (δ) 167,5 ppm, satu gugus metoksi pada (δ) 64,8 ppm dan delapan atom karbon alkil δ (ppm): 64,4; 32,1; 29,6; 29,5; 29,2; 26,3; 22,9 dan 14,3. Dari sinyal atom karbon aromatik terlihat bahwa senyawa fenolik hasil isolasi mempunyai tiga substituen yakni pada δ (ppm) 150,5; 147,7; dan 145,8. Sinyal pada pergeseran kimia 64,8 ppm menunjukkan gugus metoksi ($-\text{OCH}_3$) yang terikat pada cincin benzena, sedangkan sinyal pada δ (ppm) 64,4; 32,1; 29,6; 29,5; 29,2; 26,3; 22,9 dan 14,3

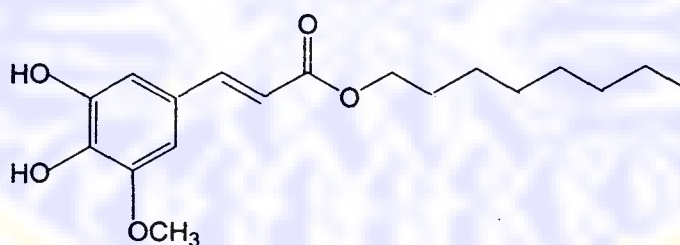
merupakan sinyal alkil yang terikat pada gugus ester. Pergeseran kimia pada 64,4 ppm menunjukkan sinyal karbon alkil yang terikat dengan atom oksigen dari gugus ester (Chang, S.J., *et. all.*, 2001).

Spektroskopi proton ^1H -RMI sangat berguna untuk mengetahui letak dan jumlah proton berdasarkan pergeseran kimia dan konstanta koplingnya. Analisis proton RMI memberikan pergeseran kimia pada δ (ppm) 8,02 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz); 7,63 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz); 7,21 (s, 1H); 6,66 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz); 4,28 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz); 3,59 (s, 3H) 1,66 (m, 12 H); 0,86 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz) (lampiran 8). Dalam pelarut piridin ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$), hasil analisis spektrum memperlihatkan adanya 2 sinyal proton vinil pada pergeseran 8,02 ppm dan 6,66 ppm yang muncul sebagai doublet dengan harga konstanta kopling (J) 15,9 Hz. Hal ini memberikan informasi bahwa kedua proton tersebut terikat pada karbon vinil dengan posisi *trans*. Dua Proton aromatis yang saling berorientasi meta ditunjukkan dengan munculnya 2 sinyal yaitu sinyal doublet pada pergeseran 7,63 ppm dengan harga konstanta kopling (J) sebesar 1,8 Hz dan sinyal singlet yang mewakili satu proton pada pergeseran kimia 7,21 ppm. Sesuai dengan aturan multiplisitas yaitu jumlah proton yang terikat pada atom karbon tetangga ditambah satu ($n + 1$) maka sinyal pada 7,21 ppm seharusnya keluar sebagai doublet, akan tetapi karena pengaruh pelarut yang digunakan yaitu piridin ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) yang juga memberikan sinyal di daerah aromatis maka sinyal tersebut tidak muncul sebagai doublet tetapi sebagai singlet. Sinyal proton alifatis yang keluar sebagai triplet pada pergeseran kimia 4,28 ppm dengan harga konstanta kopling (J) 6,7 Hz menunjukkan dua proton gugus metilen ($-\text{CH}_2-$) yang terikat pada atom oksigen dari gugus ester. Sinyal pada pergeseran

4,28 ppm muncul sebagai triplet karena jumlah proton yang dimiliki oleh atom karbon tetangga adalah dua. Sinyal multiplet pada 1,67 ppm merupakan sinyal proton beberapa gugus metilen dari rantai alkil, sinyal pada pergeseran tersebut muncul sebagai multiplet karena atom karbon tetangga dari masing-masing gugus metilen memiliki dua proton. Sinyal triplet pada 0,86 ppm dengan konstanta kopling 6,7 Hz merupakan sinyal untuk tiga proton metil. Pergeseran kimia 3,59 ppm muncul sinyal yang sangat karakteristik untuk proton gugus metoksi (-OCH₃) berupa singlet yang mewakili 3 proton (Chang, S.J., *et. all.*, 2001).



Kombinasi hasil analisis spektrum ¹³C-RMI dan ¹H-RMI dengan spektrum UV-VIS dan IR menunjukkan bahwa senyawa fenolik hasil isolasi adalah *trans* Oktil 4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat.



Penemuan senyawa sinamat dalam *Cassia* merupakan hal yang sangat jarang ditemukan. Berdasarkan penelusuran literatur, genus *Cassia* banyak dilaporkan sebagai penghasil senyawa fenolik seperti flavonoid, oligostilbenoid dan antrakuinon. Berikut ini diberikan tabel perbandingan harga pergeseran kimia ¹³C-RMI dan ¹H-RMI senyawa *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat

dengan senyawa-senyawa derivat sinamat yang telah dilaporkan untuk mendukung kesimpulan tersebut.

Tabel 4.2 Perbandingan harga pergeseran kimia ^{13}C -RMI senyawa hasil isolasi dengan senyawa turunan sinamat yang telah dilaporkan.

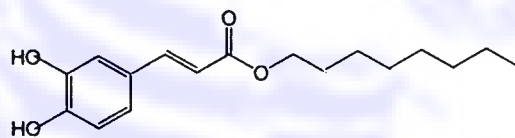
karbon	<i>trans</i> -oktil 4,5- dihidroksi-3- metoksi sinamat (ppm) (a)	Oktil 4,5 dihidroksi sinamat (Octylcaffeate) (Batovska, 2005) (ppm) (b)	Etil p-hidroksi sinamat (Barbosa, 2003) (ppm) (c)	Metil sinamat (Barbosa, 2003) (ppm) (d)
C-1	122,0	126,9	125,9	134,4
C-2	115,1	133,7	130,4	127,9
C-3	150,5(*)	122,1	116,7	128,7
C-4	147,7(*)	140,1(*)	161,3(*)	130,2
C-5	145,8(*)	149,5(*)	116,7	128,7
C-6	115,8	122,7	130,4	127,9
C-7	126,9	128,6	144,9	144,8
C-8	116,7	114,1	115,1	117,7
C-9	167,5(**)	167,3	167,1	167,3
Alkil C-1'	64,4	63,2	60,0	51,6
Alkil C-2'	32,1	32,9	14,3	-
Alkil C-3'	29,6	31,9	-	-
Alkil C-4'	29,5	29,3	-	-
Alkil C-5'	29,2	29,2	-	-
Alkil C-6'	26,3	25,8	-	-
Alkil C-7'	22,9	22,7	-	-
Alkil C-8'	14,3	14,2	-	-
OCH ₃	64,8	-	-	-

Keterangan (*) : karbon oksil aril
(**) : karbon karbonil

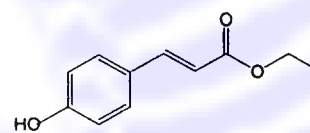
Tabel 4.3 Perbandingan harga pergeseran kimia ^1H -RMI senyawa hasil isolasi dengan senyawa turunan sinamat yang telah dilaporkan.

Posisi proton	<i>trans</i> -oktil 4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat (ppm) (a)	Oktil 4,5 dihidroksi sinamat (ppm) (Batovska, 2005) (b)	Etil 4 hidroksi sinamat (ppm) (Barbosa, 2003) (c)	Metil sinamat (ppm) (Barbosa, 2003) (d)
H-1	-	-	-	-
H-2	7,63 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz)	6,85 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz)	7,55 (d, 1H $J = 8,6$ Hz)	7,50 (m, 1H)
H-3	-	6,99 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz)	7,11 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz)	7,36 (m, 1H)
H-4	-	-	-	7,36 (m, 1H)
H-5	-	-	7,11 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz)	7,36 (m, 1H)
H-6	7,21 (s, 1H)	7,07 (s, 1H)	7,55 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz)	7,50 (m, 1H)
H-7	8,02 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz)	7,56 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz)	7,89 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz)	7,68 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz)
H-8	6,66 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz)	6,25 (d, 1H, $J = 15,7$ Hz)	6,53 (d, 1H, $J = 15,9$ Hz)	6,42 (d, 1H, $J = 16,2$ Hz)
Alkil H-1'	4,28 (t, 2H, $J = 6,7$ Hz)	4,18 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz)	4,20 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz)	3,76 (s, 3H)
Alkil H-2'	1,66 (m, 2H)	1,28 (s, 2H)	1,15 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz)	-
Alkil H-3'	1,66 (m, 2H)	1,28 (s, 2H)	-	-
Alkil H-4'	1,66 (m, 2H)	1,28 (s, 2H)	-	-
Alkil H-5'	1,66 (m, 2H)	1,28 (s, 2H)	-	-

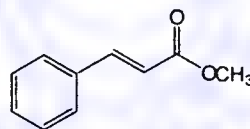
Posisi proton	<i>trans</i> -oktil 4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat (ppm) (a)	Oktil 4,5 dihidroksi sinamat (ppm) (Batovska, 2005) (b)	Etil 4 hidroksi sinamat (ppm) (Barbosa, 2003) (c)	Metil sinamat (ppm) (Barbosa, 2003) (d)
Alkil H-6'	1,66 (m, 2H)	1,28 (s, 2H)	-	-
Alkil H-7'	1,66 (m, 2H)	1,6-1,55 (m, 2H)	-	-
Alkil H-8'	0,86 (t, 3H, $J = 6,7$ Hz)	0,88 (t, 3H, $J = 6,6$ Hz)	-	-
OCH ₃	3,59 (s, 3H)	-	-	-



(b)

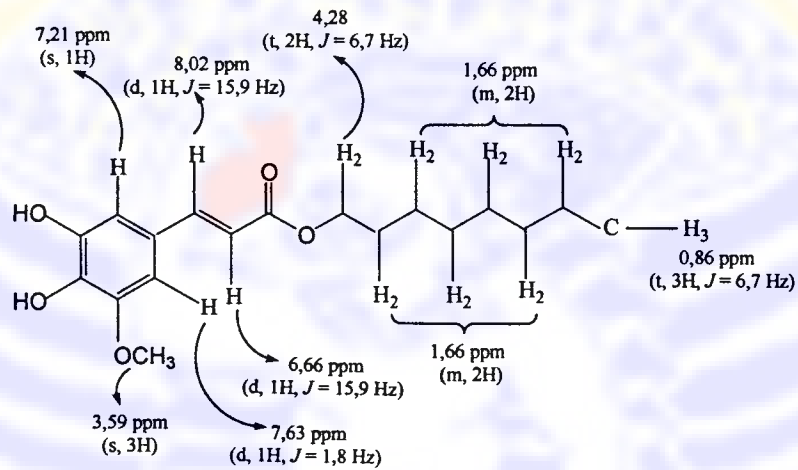
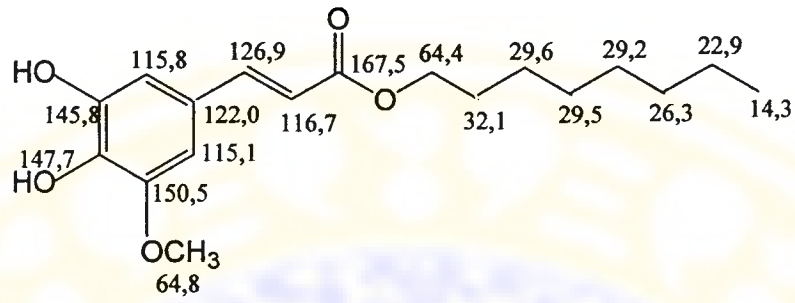


(c)



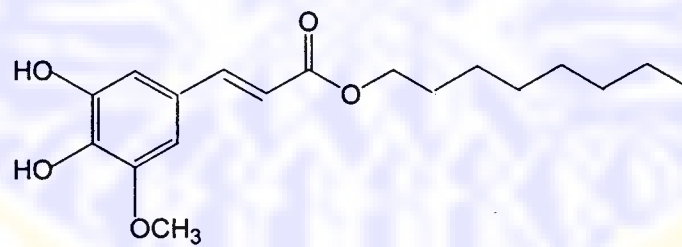
(d)

Dari hasil perbandingan data tersebut, dapat ditarik kesimpulan bahwa geseran kimia ¹³C-RMI dan ¹H-RMI dari senyawa fenolik hasil isolasi memiliki kesamaan yang cukup signifikan dengan senyawa yang telah berhasil diisolasi, dengan perbedaan pergeseran kimia yang disebabkan oleh perbedaan posisi substituenya. Untuk selanjutnya posisi proton dan karbon senyawa fenolik hasil isolasi dapat dilihat pada gambar berikut :



Dari hasil analisis spektrum secara lengkap, dapat disimpulkan bahwa senyawa fenolik hasil isolasi adalah *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat.

Struktur senyawa hasil isolasi dapat digambarkan sebagai berikut :



trans oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat

4.3 Hasil Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa *trans*-Oktil-4,5-Dihidroksi-3-Metoksi Sinamat

Senyawa *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat diuji aktivitasnya sebagai anti radikal bebas dengan mengukur peredamannya terhadap DPPH menggunakan spektroskopi ultraviolet visibel pada konsentrasi 1000 dan 500 ppm. Pengukuran dilakukan setelah 5 menit penambahan sampel. Hasil pengukuran absorbansi peredaman pada DPPH senyawa *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat ditunjukkan pada tabel berikut :

Tabel 4.4 Hasil pengukuran absorbansi senyawa *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat terhadap DPPH

Konsentrasi (ppm)	Nilai Absorbansi		
	497	517	537
Standar	0,309	0,380	0,364
1000	0,706	0,625	0,551
500	0,409	0,357	0,310

Dari hasil pengukuran diperoleh harga absorbansi pada variasi konsentrasi lebih besar daripada harga absorbansi standar, sehingga besarnya peredaman terhadap radikal DPPH tidak dapat hitung. Dengan demikian daya hambat IC_{50} tidak dapat ditentukan melalui persamaan regresi linier $y = ax + b$ dengan y adalah besarnya persen (%) peredaman terhadap DPPH dan x merupakan variasi konsentrasi larutan uji. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenolik hasil isolasi yaitu senyawa *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat tidak memiliki aktivitas sebagai anti radikal bebas walaupun pada uji KLT *assay autografi* terhadap DPPH menunjukkan hasil positif warna kuning.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian terhadap fraksi etil asetat kulit batang tumbuhan *Cassia spectabilis* DC dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. senyawa hasil isolasi merupakan senyawa fenolik turunan sinamat yaitu *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat.
2. senyawa *trans*-oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat hasil isolasi tidak mempunyai aktivitas sebagai anti radikal bebas.

5.2 Saran

Perlu dilakukan uji aktivitas yang lain misalnya antifungal, antimikroba, dan lain-lain untuk senyawa *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat hasil isolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., 1986, *Kimia Organik Bahan Alam*, Modul 1-6, cetakan kedua, Karunia, Jakarta, Hal. 1-39
- Andin, F.N.A., 2005, **Isolasi dan Uji Aktivitas Inhibitor Xanthine Oxidase Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, Unair, Surabaya.
- Baba, K., Kido, T., Maeda, K., Taniguchi, M., and Kozawa, M., 1991, **Two Stilbenoids from *Cassia garrettiana***, *Phytochemistry*, 31, 3215-3218
- Barbosa, F.G., Silveira, E.R., Braz-Filho, and Maria da Conceicao F. de Oliveira, 2004, **Anthraquinones and Naphthopyrones from *Senna rugosa***, *Biochem.Syst.and Ecology*, 32, 363-365
- Barbosa, F.J.M., Lima, C.S.A., Camorim, E.L., FR de Sena, K.X., Almeida, J.R.G.S., L da Cunha, E.V., Silva, M.S., Agra, M.F., Braz-Filho, R., 2003, **Botanical Study, Phytochemistry and Antimicrobial Activity of *Tabebuia aurea***, *Phyton*, 23.V
- Batovska, D.I., Kishimoto, T., Bankova, V.S., Kamenarska, Z.G., and Ubukata, M., 2005, **Synthesis of Some Phenylpropanoid Monoglycerides via the Mitsunobu Protocol**, *Molecules*, 10, 552-558
- Chang, S.J., Lin, T.H., and Chen, C.C., 2001, **Constituents from The Stems of *Dendrobium clavatum* var. *Aurantiacum***, *J.Chin Med*, 12 (3), 211-218
- Cos, P., Ying, P., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, I., Berghe, D.P., 1998, **Structure Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers**, *J.Nat.Prod.*, 61, 71-76

- Cuendet, M, Hostettmann, K, and Potteral, O., 1997, **Flavonoids with Free Radical Scavenging From *Fagrae blumei***, *Helvetica Chimica Acta*, 80, 1144-1152
- Gilman, E.F., and Watson, D.G., *Senna spectabilis*, *Cassia*, <http://edis.ifas.ufl.edu//ST588>, 14 Oktober, 2004
- Gonda, R., Takeda, T., and Akiyama, T., 2000, **Studies on the Constituents of *Anaxagorea luzonensis* A.Gray**, *Chem.Pharm.Bull*, 48(8), 1219-1222
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., dan Schwarting, A.F., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi kedua, ITB, Bandung.
- Hakim, E. H., 2002, **Oligostilbenoid Dari Tumbuhan Dipterocarpaceae**, *Bull. Soc. Nat. prod. Chem.*, 2, 1-9
- Harborne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.L., 1971, *Chemotaxonomy of the Leguminosae*, London, Academic Press.
- Harborne, J.B., (diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan Iwang Soediro), 1987, *Metode Fitokimia*, Terbitan kedua, ITB, Bandung.
- Harborne, J.B., and Mabry, T.J., 1982, *The Flavonoid Advances in Research*, Chapman and Hall Ltd, London, New York.
- Hendayana, Dr., Sumar, 1994, *Kimia Analitik Instrumen*, Edisi kesatu, IKIP Semarang Press.
- Heyne, K., (diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan), 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II dan IV, Edisi kesatu, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, Hal. 928
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., dan A. Marston, 1995, *Cara Kromatografi Preparatif*, Penerbit ITB, Bandung.

- Jojeux, M., Lobstein, A., and Morties, F., 1995, **Comparative Antilipoperoxidant, Antinecrotic and Scavenging Properties of Biflavonoid from *Ginkgo* and Some Flavonoids**, *Planta Medica*, 61, 126-129
- Kang, S.S., Kim, J.S., Son, K.H., Chang, H.W., and Kim, H.P., 2000, **A New Prenylated Flavonone from the Roots of *Shopora flavescens***, *Fitoterapia*, 71, 511-515
- Kitanaka, S., Takido, M., Mizoue, K., Kondo, H., Nakaike, S., 1996, **Oligomeric stilbenes from *Caragana Chamlagu* Lamark Root**, *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 565-567
- Lee, C.K., Lee, P.H., and Kuo, Y.H., 2001, **The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L.**, *Chinese Chemical Society*, 48, 1053-1058
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, Bandung.
- Miller, A. L., 1996, **Antioxidant Flavonoid : Structure, Function and Clinical Usage**, *Alternative Medicine Review*, 1 (2), 103-111
- Moriyama, H., Iizuka, T., Nagai, M., Miyataka, H., and Satoh, T., 2003, **Antiinflammatory Activity of Heat-treated *Cassia alata* Leaf Extract and Its Flavonoid Glycoside**, *Yakugaku Zasshi*, 123 (7), 607-611
- Mulchandani, N.B., Hassarajani, S.A., 1977, **Cassinine, A New Alkaloid and Anthraquinones from *Cassia spectabilis* and Their Biogenetic Relationship**, *Planta Medica*, 32, 357-361
- Ohyama, M., Tanaka, T., Yokohama, J., and Iinuma, M., 1995, **Occurrence of Prenylated Flavonoids and Oligostilbenes and its significance for chemataxonomy of genus *Shopora* (Leguminosae)**, *Biochemical Systematics and Ecology*, 23 (6), 669-667

- Panichayupakaranant, P., and Kaewsuwan, S., 2004, **Biossay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata* L. leaves**, *Sangklanakar J.Sci. Technol.*, 26 (1), 103-107
- Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., and Ongsakul, M., 2004, **Antifungal Activity from Leaf Extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L., and *Cassia tora* L.**, *Songklanakar J.Sci.Technol.*, 26(5), 741-748
- Silverstein, Baslerr, dan Morrill, 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Edisi kelima, John Willey and Sons, Singapura.
- Singh, J., and Tiwari, R.D., Tiwari, A.R., 1980, **Anthraquinones and flavonoids of *Cassia laevigata* Roots**, *Phytochemistry*, 19, 1253-1254
- Sotheeswaran, S., and Pasupati, V., 1993, **Distribution of Resveratrol Oligomers in Plants**, *Phytochemistry*, 32, 1083-1092
- Tan, R., [http://www.naturia.per.sg/buloh/Plants/Seven Golden Candlestick \(Cassia alata\) info fact shett. photos. htm.](http://www.naturia.per.sg/buloh/Plants/Seven_Golden_Candlestick_(Cassia_alata)_info_fact_shett_photos.htm), 28 juni 2001
- Tanjung, M, 1996, **Isolasi dan Bioaktivitas Senyawa Flavonoid dari Rimpang *Kaempferia pandurata* ROXB**, Penelitian, Lembaga Penelitian Unair, Surabaya.
- Taylor, Fedegosa, www.rain-tree.com/fedegosa.htm, 3 April 2005
- Tiwari, R.D., and Singh, J., 1979, **Flavonoids from the leaves of *Cassia laevigata***, *Phytochemistry*, 18, 2060-2061
- Tiwari, R.D., and Bajpai, M., 1976, **The Flavonoids of *Cassia renigera* Steam Bark**, *Phytochemistry*, 16, 798-799
- Trilaksani, W., [http://rudycr.tripod.com/sem2_023/wini trilaksani.htm](http://rudycr.tripod.com/sem2_023/wini_trilaksani.htm), 5 Juni 2005

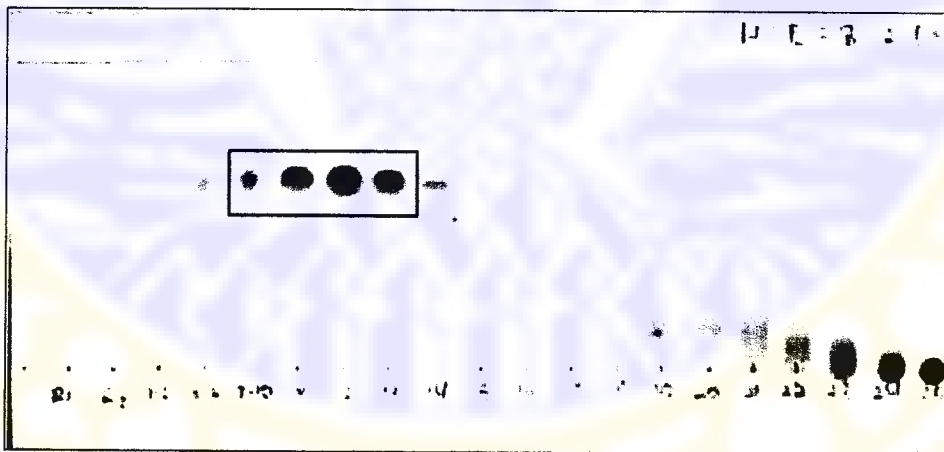
Tjitrosoepomo, G., 1993, *Taksonomi Tumbuhan*, cetakan kesembilan, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Viegas, C., Bolzani, V., Furlan, M., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Tomazela, D., and Eberlin, M.N., 2004, **Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis***, *J.Nat.Prod.*, 67 (5), 908-910

Lampiran 1. Foto tumbuhan *Cassia spectabilis* DC

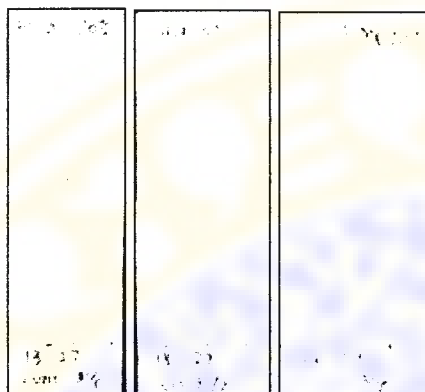


Lampiran 2. Hasil KLT kromatografi kolom cair vakum



senyawa fenolik hasil isolasi

Lampiran 3. Uji tiga sistem eluen senyawa fenolik hasil isolasi



I. n-heksana : aseton = 8:2

II. n-heksana : etil asetat = 8 : 2

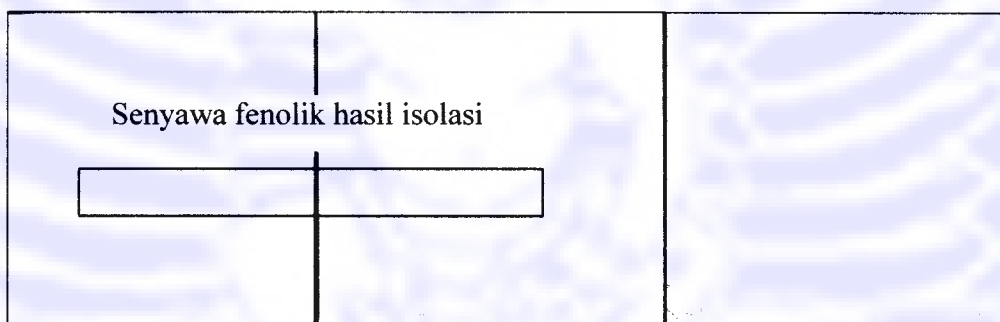
III. kloroform : metanol = 9,75 : 0,25

I

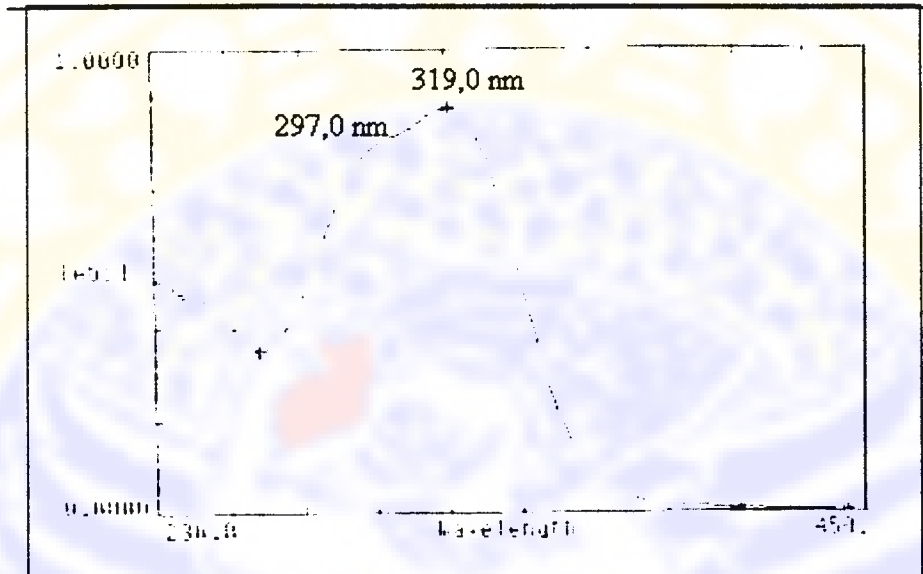
II

III

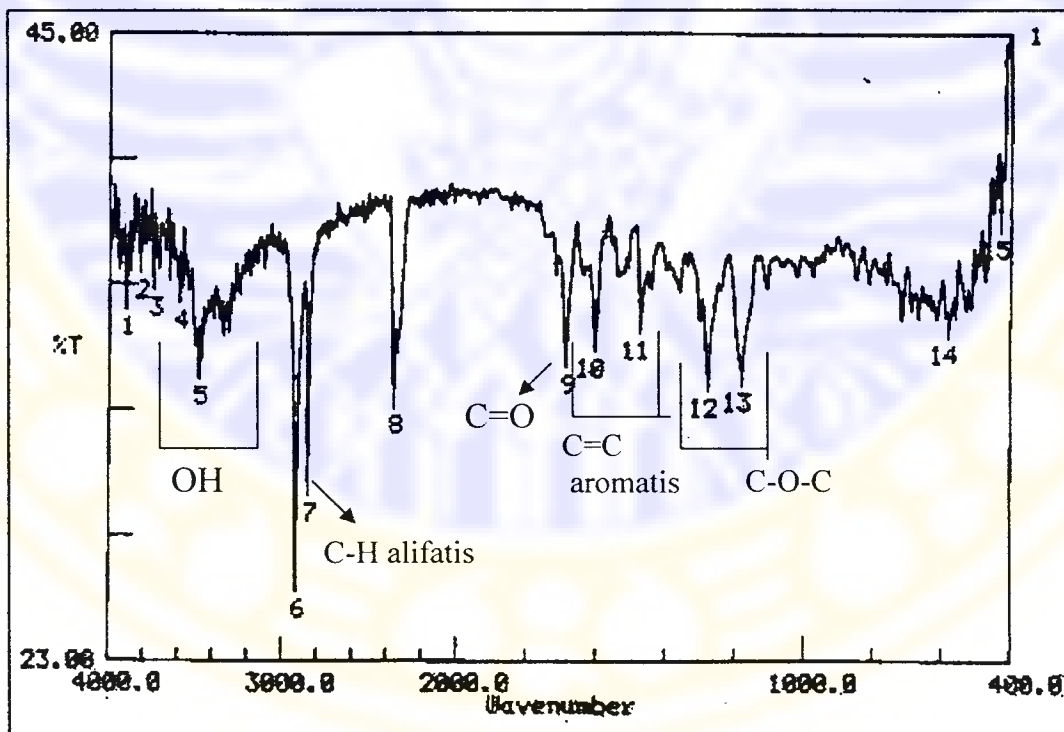
Lampiran 4. Kromatografi kolom cepat senyawa fenolik hasil isolasi



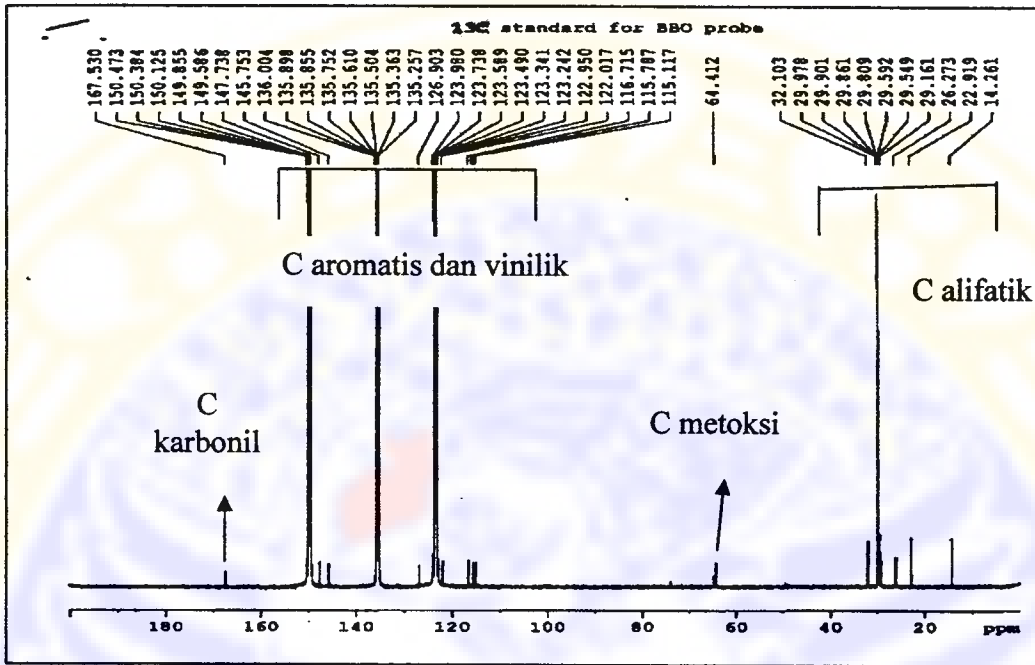
Lampiran 5. Spektrum UV-Vis senyawa fenolik hasil isolasi dalam pelarut kloroform



Lampiran 6. Spektrum IR senyawa fenolik hasil isolasi



Lampiran 7. Spektrum ^{13}C -RMI senyawa fenolik hasil isolasi



Lampiran 8. Spektrum ^1H -RMI senyawa fenolik hasil isolasi

