



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ISOLASI FLAVONOID DARI EKSTRAK AKTIF DAUN PAKU RASAM (*Gleichenia linearis*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN

SKRIPSI



**PAUL SEPTINUS
07 132 038**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

ABSTRAK

ISOLASI FLAVONOID DARI EKSTRAK AKTIF DAUN PAKU RASAM (*Gleichenia linearis*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN

Oleh:
Paul Septinus (07132038)

Sarjana Sains (S.Si) dalam Bidang Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas
Dibimbing oleh Prof. Dr. Sanusi Ibrahim dan Dr. Afrizal

Suatu senyawa flavonoid telah diisolasi dari ekstrak aktif daun paku rasam (*Gleichenia linearis*) sebagai antioksidan. Isolasi dilakukan dengan metode sokletasi dan sistem ampas menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol. Uji antioksidan dilakukan terhadap radikal bebas DPPH. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksan. Ekstrak metanol kemudian dilanjutkan pemurniannya dengan kromatografi kolom. Senyawa hasil isolasi adalah berupa padatan berwarna kuning dengan titik leleh 228 – 230 °C. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan spektroskopi UV dan IR. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi diduga flavonol dimana H dari OH yang terikat pada atom C₃ tersubstitusi. Senyawa ini juga mempunyai gugus OH bebas pada atom C₇ dan C₄.

Kata kunci: paku rasam, antioksidan, ekstrak aktif, flavonoid, flavonol

ABSTRACT

ISOLATION OF FLAVONOID FROM THE ACTIVE EXTRACT OF *Gleichenia linearis* LEAVES AS ANTIOXIDANT

By:
Paul Septinus (07132038)

Bachelor of Science in Chemistry
Faculty of Mathematic and Natural Science
Andalas University
Supervised by Prof. Dr. Sanusi Ibrahim and Dr. Afrizal

A flavonoid compound has been isolated from the active extract of *Gleichenia linearis* leaves as antioxidant. Isolation carried out by soxhletation using hexane, ethyl acetate and methanol as solvent. Antioxidant activity determined by DPPH scavenging method. The results showed that the methanol extract has highest activity than that of ethyl acetate and hexane extracts. Afterwards the methanol extract is purified using column chromatography. The isolated compound is solid, yellow in colour and has melting point 228 – 230 °C. It was characterized using UV and IR spectroscopy. The results indicated that the isolated compound was flavonol group which hydrogen of hydroxyl at C₃ substituted and also had hydroxyl groups at C₇ dan C₄.

Keywords: *Gleichenia linearis*, antioxidant, active extract, flavonoid, flavonol

ABSTRACT

ISOLATION OF FLAVONOID FROM THE ACTIVE EXTRACT OF *Gliceria linaria* LEAVES AS ANTI-OXIDANT

By :
Paul Septinus (07132038)

Supervised by Prof. Dr. Saunusi Ibrahim and Dr. Alvinah
Andalas University
Faculty of Mathematic and Natural Science
Bachelor of Science in Chemistry

A flavonoid compound has been isolated from the active extract of *Gliceria linaria* leaves as antioxidant. Isolation carried out by Soxhlet extraction using hexane (60% ethyl acetate and methanol as solvent). Antioxidant activity determined by DPPH scavenging method. The results showed that the methanol extract has highest activity than that of ethyl acetate and hexane extract. Towards the methanol extract is purified using column chromatography. The isolated compound is solid, yellow in color and has melting point 228 - 230 °C. It was characterized using UV and IR spectroscopy. The results indicated that the isolated compound was flavonol group which hydrogen of hydroxyl at C₃ substituted and also had hydroxyl groups at C₇ dan C₈.

Key words: *Gliceria linaria*, antioxidant, active extract, flavonoid, flavonol

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas rahmat dan karunia-Nya, penulis bisa menyelesaikan skripsi ini. Adapun judul skripsi ini adalah **“Isolasi Flavonoid dari Ekstrak Aktif Daun Paku Rasam (*Gleichenia linearis*) Sebagai Antioksidan”**.

Skripsi ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Sanusi Ibrahim dan Bapak Dr. Afrizal selaku dosen pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan arahan dan membimbing penulis selama penelitian dan dalam penulisan skripsi.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas.
3. Bapak Dr. Mai Efdi selaku Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia, sekaligus Penasehat Akademik yang telah membimbing dan menasehati penulis selama menjalani perkuliahan di Jurusan Kimia Universitas Andalas.
4. Bapak dan Ibu staf pengajar Jurusan Kimia Universitas Andalas.
5. Bapak dan Ibu pegawai Jurusan Kimia beserta analis laboratorium yang ada di Jurusan Kimia Universitas Andalas.
6. Para senior dan rekan-rekan mahasiswa kimia.

Tentunya skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mohon maaf apabila ada kesalahan dalam penulisan skripsi ini dan dengan tangan terbuka penulis menerima segala saran ataupun kritikan demi kesempurnaan skripsi ini.

Padang, Juni 2012

Hormat penulis

Paul Septinus

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
ABSTRAK	ii
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Botani Paku Rasam (<i>Gleichenia linearis</i>).....	3
2.2 Tinjauan Kimia Genus Gleichenia	5
2.3 Flavonoid.....	8
2.3.1 Tinjauan Umum Flavonoid	8
2.3.1.1 Flavonol.....	9
2.3.1.2 Flavon.....	10
2.3.1.3 Flavan-3-ol	10
2.3.1.4 Flavanon	11
2.3.1.5 Antosianidin	12
2.3.1.6 Isoflavon.....	13
2.3.2 Biosintesis Flavonoid	13
2.4 Metode Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder	15
2.4.1 Metode Ekstraksi.....	15
2.4.2 Kromatografi	16
2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis	16

2.4.2.2 Kromatografi Kolom	17
2.5 Uji Kemurnian	17
2.6 Metode Karakterisasi.....	18
2.6.1 Spektroskopi Ultraviolet	18
2.6.2 Spektroskopi Inframerah	18
2.7 Aktivitas Antioksidan.....	19
2.7.1 Metode DPPH untuk Uji Aktivitas Antioksidan.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
3.2 Alat dan Bahan	22
3.2.1 Alat	22
3.2.2 Bahan Kimia.....	22
3.3 Pembuatan Pereaksi dan Larutan	22
3.3.1 Pereaksi Liebermann-Burchard	22
3.3.2 Pereaksi Mayer.....	23
3.3.3 Pereaksi besi (III) klorida 5 %.....	23
3.3.4 Pereaksi natrium hidroksida 1 %.....	23
3.3.5 Pereaksi asam sulfat 2 N	23
3.3.6 Larutan DPPH 50 μ M	23
3.4 Prosedur Penelitian.....	23
3.4.1 Persiapan Sampel	23
3.4.2 Uji Profil Fitokimia Daun Paku Rasam.....	24
3.4.2.1 Pemeriksaan Flavonoid, Fenolik, Saponin, Triterpenoid dan Steroid.....	24
3.4.2.2 Pemeriksaan Alkaloid	25
3.4.2.3 Pemeriksaan Kumarin	25
3.5 Isolasi Flavonoid Dari Daun Paku Rasam.....	25
3.5.1 Ekstraksi	25
3.5.2 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Paku Rasam	26
3.5.3 Kromatografi	26
3.6 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	27

3.0 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	31
3.2.3 Kromatografi	30
3.2.3 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Baku Kasam	30
3.2.1 Ekstraksi	32
3.2 Isolasi Flavonoid Dari Daun Baku Kasam	32
3.4.3.3 Pemeriksaan Kimia	32
3.4.3.3 Pemeriksaan Mikologi	32
Inhibensioid dan Steroid	34
3.4.3.1 Pemeriksaan Flavonoid Fenolik Gabung	
3.4.3 Uji Profil Mikotoksin Daun Baku Kasam	34
3.4.1 Persiapan Sampel	33
3.4 Prosedur Penelitian	33
3.3.0 Larutan DPPH 20 ppm	33
3.3.2 Perakasi asam salisilat 5 M	33
3.3.4 Perakasi natrium hidrogen sulfida 1 %	33
3.3.3 Perakasi besi (III) klorida 2 %	33
3.3.3 Perakasi Molyb	33
3.3.1 Perakasi 1 (permalium-Burchard)	33
3.3 Pembuatan Perakasi dan Larutan	33
3.3.3 Bahan Kimia	33
3.3.1 Air	33
3.3 Air dan Bahan	33
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	33
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1.1 Metode DPPH untuk Uji Aktivitas Antioksidan	30
3.3 Aktivitas Antioksidan	10
3.0.3 Spektroskopi Inframerah	18
3.0.1 Spektroskopi Ultraviolet	18
3.0 Metode Karakterisasi	18
3.2 Uji Kimia	11
3.4.3.3 Kromatografi Kolom	11

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji Profil Fitokimia Daun Paku Rasam	29
4.2 Isolasi Flavonoid Dari Daun Paku Rasam.....	30
4.2.1 Ekstraksi	30
4.2.2 Hasil Uji Antioksidan Ekstrak Daun Paku Rasam	30
4.2.3 Kromatografi	31
4.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	33

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran.....	38

DAFTAR PUSTAKA	39
-----------------------------	----

LAMPIRAN	41
-----------------------	----

Lampiran 1. Skema kerja isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak aktif daun paku rasam sebagai antioksidan.....	41
--	----

Lampiran 2. Skema kerja uji antioksidan terhadap ekstrak n-heksan etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam	43
---	----

Lampiran 3. Perhitungan persen inhibisi aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam.....	44
--	----

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Hasil uji profil fitokimia daun paku rasam	29
Tabel 2.	Hasil ekstraksi daun paku rasam.....	30
Tabel 3.	Hasil pengukuran absorban dan persen inhibisi ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari sampel	30
Tabel 4.	Hasil elusi kromatografi kolom	31
Tabel 5.	Analisis KLT kelompok fraksi hasil kromatografi kolom.....	32
Tabel 6.	Nilai Rf senyawa hasil isolasi dengan berbagai variasi eluen	32
Tabel 7.	Data pergeseran absorpsi spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi setelah penambahan pereaksi geser	36



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Tumbuhan paku rasam.....	4
Gambar 2.	Senyawa yang telah diisolasi oleh Raja <i>et al</i> (1995)	6
Gambar 3.	Senyawa glikosida baru yang diisolasi oleh Raja <i>et al</i> (1995) pada <i>G. linearis</i> var. <i>sebastiana</i>	6
Gambar 4.	Senyawa terpenoid baru yang diisolasi oleh Xiao-Li Li <i>et al</i> (2008).....	7
Gambar 5.	Sembilan senyawa terpenoid yang diisolasi oleh Xiao-Li Li <i>et al</i> (2008) yang telah diketahui sebelumnya	8
Gambar 6.	Sub-kelas utama flavonoid.....	9
Gambar 7.	Penomoran pada flavonoid.....	9
Gambar 8.	Senyawa golongan flavonol.....	10
Gambar 9.	Golongan utama flavon.....	10
Gambar 10.	Proasianidin B ₁ dan B ₂	11
Gambar 11.	Senyawa golongan flavanon	11
Gambar 12.	Senyawa golongan utama antosianidin.....	12
Gambar 13.	Senyawa golongan utama isoflavon.....	13
Gambar 14.	Jalur biosintesis flavonoid.....	14
Gambar 15.	Struktur DPPH	20
Gambar 16.	Reduksi DPPH oleh antioksidan RH	21
Gambar 17.	Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol.....	33
Gambar 18.	Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOMe	34
Gambar 19.	Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser AlCl ₃ dan AlCl ₃ – HCl	35
Gambar 20.	Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOAc dan NaOAc – H ₃ BO ₃	36
Gambar 21.	Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak aktif daun paku rasam sebagai antioksidan	41
Lampiran 2. Skema kerja uji antioksidan terhadap ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam.....	43
Lampiran 3 Perhitungan persen inhibisi aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam	44



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan. Beberapa diantaranya adalah tumbuh-tumbuhan obat yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Salah satu jenis tumbuhan tersebut adalah paku rasam (*Gleichenia linearis*).

Paku rasam adalah salah satu jenis tumbuhan paku yang berasal dari famili Gleicheniaceae. Tumbuhan ini banyak tersebar di hutan-hutan tropis dan subtropis seperti di wilayah Afrika, Asia, Australia, Selandia Baru dan Hawaii. Paku rasam mempunyai berbagai kasiat dan banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Masyarakat tradisional di India memanfaatkan daunnya untuk mengobati asma dan kemandulan wanita. Sementara di Filipina, paku rasam dimanfaatkan oleh masyarakatnya untuk mengurangi demam.¹ Selain itu, tumbuhan ini juga bermanfaat untuk mengobati bisul dan untuk mencegah cacing usus.²

Paku rasam juga mempunyai bioaktivitas yang bermanfaat bagi tubuh manusia. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa paku rasam mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, *antinociceptive*, *anti-inflammatory*, dan *antipyretic*.³ Selain itu paku rasam juga mempunyai bioaktivitas sebagai antikanker dan antioksidan.²

Hasil penelitian Raja *et al* (1995) menunjukkan bahwa salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan paku rasam adalah flavonoid.⁴ Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dapat berperan sebagai antioksidan dalam tubuh manusia dan dapat menghambat proses oksidasi molekul di dalam tubuh. Oleh karena banyaknya manfaat dari paku rasam dan adanya senyawa flavonoid yang terkandung pada tumbuhan paku rasam, maka dilakukan isolasi senyawa flavonoid dari tumbuhan paku rasam. Senyawa flavonoid tersebut diisolasi dari ekstrak daun paku rasam yang aktif sebagai antioksidan.

1.2 Perumusan Masalah

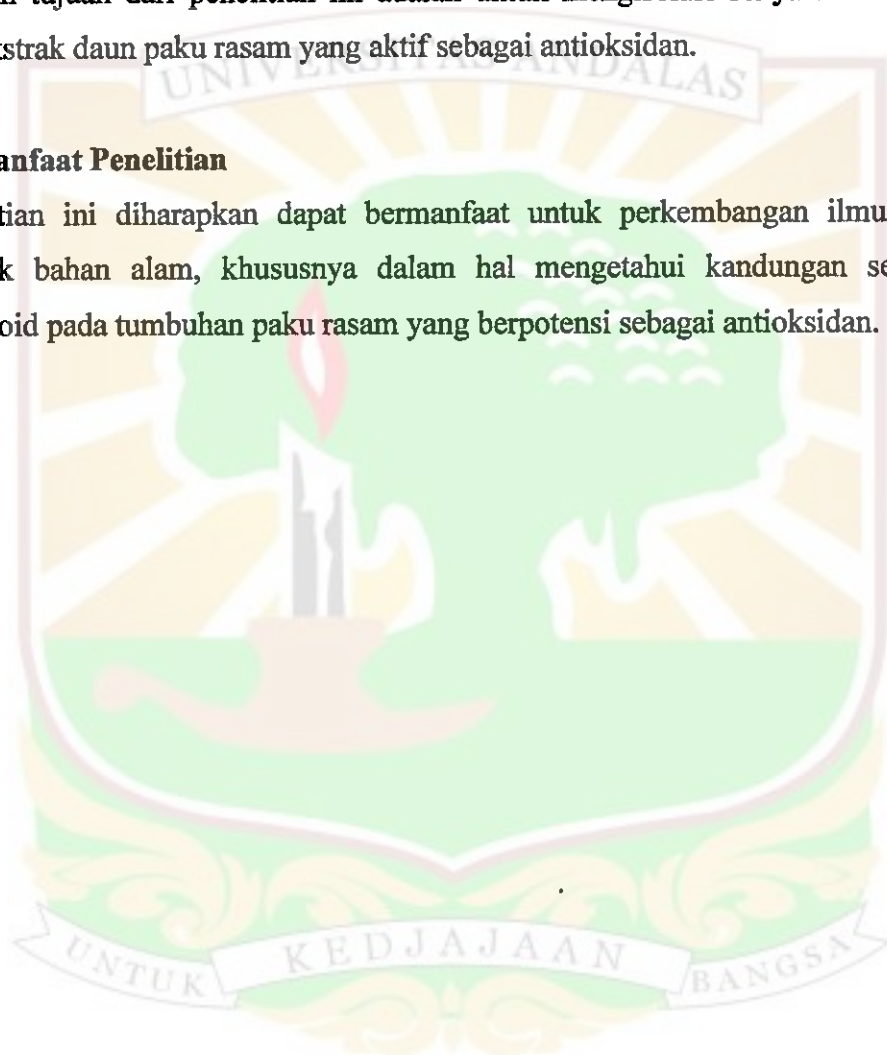
Berdasarkan latar belakang seperti yang dikemukakan diatas, maka perumusan masalahnya adalah bagaimana mengisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak daun paku rasam yang aktif sebagai antioksidan.

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak daun paku rasam yang aktif sebagai antioksidan.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu kimia organik bahan alam, khususnya dalam hal mengetahui kandungan senyawa flavonoid pada tumbuhan paku rasam yang berpotensi sebagai antioksidan.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Botani Paku Rasam (*Gleichenia linearis*)

Paku rasam (*Gleichenia linearis*) merupakan salah satu jenis tumbuhan paku yang berasal dari famili Gleicheniaceae. Tumbuhan ini banyak tersebar di hutan-hutan tropis dan subtropis seperti di wilayah Afrika, Asia (termasuk Indonesia), Australia, Selandia Baru dan Hawaii.¹

Secara umum, tumbuhan paku memiliki ciri khas tersendiri yang tidak dijumpai pada tumbuhan jenis lainnya. Ciri utama yang membedakan tumbuhan paku dengan tumbuhan lain adalah adanya daun-daun muda yang berbentuk seperti gulungan tali. Ciri lain yang sangat khas dari tumbuhan paku adalah tumbuhan ini menghasilkan spora yang terbentuk didalam sporangium.⁵

Tumbuhan paku termasuk kedalam golongan tumbuhan tingkat rendah dan pada umumnya menyukai tempat-tempat yang lembab. Tumbuhan ini mempunyai peranan yang sangat penting dalam kehidupan makhluk hidup, baik secara ekologis maupun secara ekonomis. Secara ekologis, keberadaan tumbuhan ini berperan penting sebagai produsen dalam suatu rantai makanan. Selain itu, tumbuhan ini juga berperan penting dalam siklus daur nitrogen. Secara ekonomis, keberadaan tumbuhan paku mempunyai peranan sebagai tanaman hias, tumbuhan obat dan bahan sayuran.⁵ Klasifikasi ilmiah tumbuhan paku rasam adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Divisi	: Pteridophyta (paku-pakuan)
Kelas	: Filicopsida
Ordo	: Polypodiales
Famili	: Gleicheniaceae
Genus	: <i>Gleichenia</i>
Spesies	: <i>Gleichenia linearis</i>

Tumbuhan paku rasam sangat mudah dikenali karena percabangannya. Tiap-tiap cabangnya akan bercabang dua, masing-masing cabang akan bercabang dua lagi dan begitu seterusnya. Tunas dari tumbuhan ini tumbuh dari akar rimpang yang berwarna hijau pucat yang ditutupi oleh bulu-bulu berwarna hitam. Pada setiap anak daun terdapat sori dan penyebarannya terbatas hanya disepanjang tulang daun.⁶ Sori pada tumbuhan paku rasam berdiameter 1 mm dan masing-masing sori mengandung 7-15 sporangia. Sporangia yang terdapat pada sori tersebut berdiameter antara 0,2 – 0,25 mm, berwarna kuning pucat kecokelatan dan berbentuk tetrahedral.¹

Tumbuhan paku rasam bisa mencapai tinggi sampai 2 m dan bercabang banyak. Wujud permukaan daunnya kasar, dibagian atas berwarna hijau dan dibagian bawah daun agak berwarna keabu-abuan. Tumbuhan ini biasa tumbuh ditempat-tempat terbuka dan lembab, misalnya dipinggiran sungai. Tumbuhan paku rasam ini sering dijumpai tumbuh pada tanah-tanah liat.¹ Tumbuhan paku ini biasanya dapat tumbuh dari ketinggian 1.034 m diatas permukaan laut.⁶ Tumbuhan paku rasam dapat dilihat pada Gambar 1.

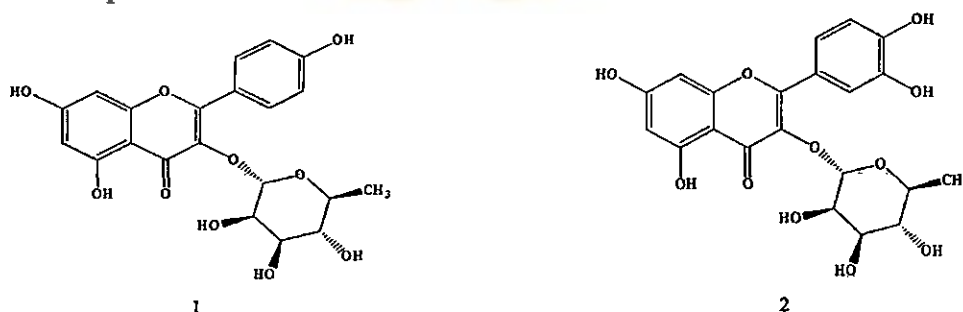


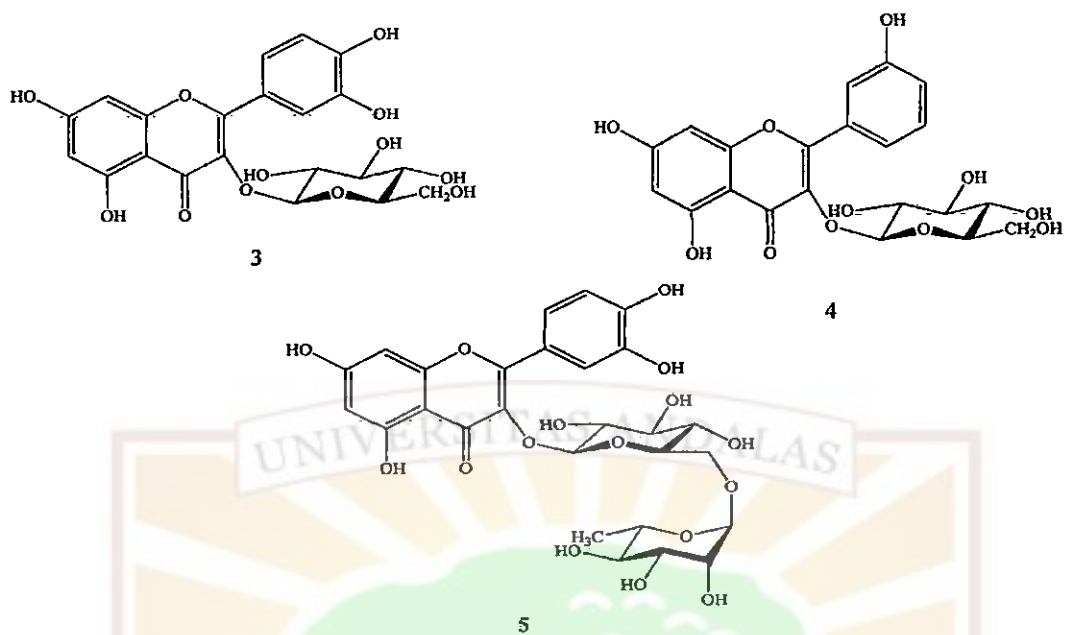
Gambar 1. Tumbuhan paku rasam

Jenis tumbuhan paku ini hanya memiliki sedikit indusia sehingga untuk berkembangbiak dengan spora sangat mudah. Ketika tumbuhan ini sudah tumbuh pada suatu tempat, maka tidak ada kesempatan bagi tumbuhan lain untuk tumbuh diantaranya. Salah satu lokasi dimana paku rasam tumbuh dengan subur adalah Kepulauan Hawaii. Di Kepulauan yang bergunung-gunung tersebut, dengan cepat tumbuhan paku ini akan tumbuh menutupi setiap lereng yang terbuka. Selain bermanfaat sebagai obat tradisional, tumbuhan paku rasam juga mempunyai manfaat lain. Kulit batang paku ini bisa digunakan sebagai bahan baku kerajinan tangan. Sedangkan batang bagian dalamnya bisa digunakan untuk memperkuat kopiah.⁶

2.2 Tinjauan Kimia Genus *Gleichenia*

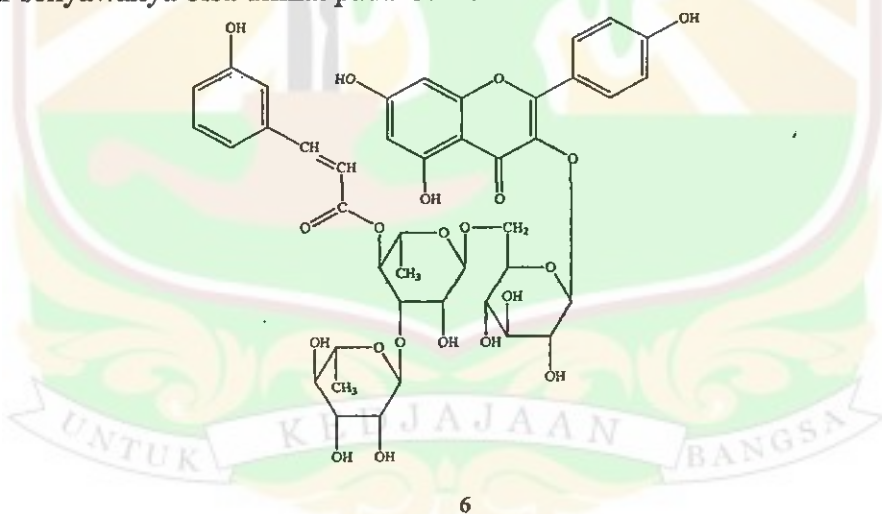
Pada tahun 1995, Raja *et al* telah berhasil mengisolasi senyawa flavonoid dari tiga varietas *Gleichenia linearis* (*G. linearis*) dengan menggunakan daunnya sebagai sampel. Ketiga jenis varietas tumbuhan paku tersebut adalah *G. linearis* var. *brevis*, *G. linearis* var. *tenuis* dan *G. linearis* var. *sebastiana*. Flavonoid yang berhasil diisolasi dari ketiga jenis varietas *G. linearis* ini adalah golongan flavonol 3-O-glikosida. Mereka juga berhasil menemukan satu buah senyawa glikosida baru yaitu pada spesies *G. Linearis* var. *sebastiana* berupa padatan amorf yang berwarna kuning. Adapun senyawa flavonoid yang berhasil diisolasi pada ketiga varietas tumbuhan paku tersebut adalah afzelin (1) dan quercitrin (2) pada *G. linearis* var. *brevis*, quercitrin dan isoquercitrin (3) pada *G. linearis* var. *tenuis*, serta astragarin (4), isoquercitrin, rutin (5), dan kaempferol 3-O-(4-O-p-kumaroil-3-O- α -L-ramnopiranosil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranosida (6) pada *G. linearis* var. *sebastiana*.⁴ Struktur senyawa-senyawa(1,2,3,4,5) tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.





Gambar 2. Senyawa yang telah diisolasi oleh Raja *et al* (1995)

Senyawa glikosida baru yang berhasil diisolasi oleh Raja *et al* (1995) pada *G. linearis* var. *sebastiana* merupakan golongan kaempferol 3-O-glikosida dan struktur senyawanya bisa dilihat pada Gambar 3.

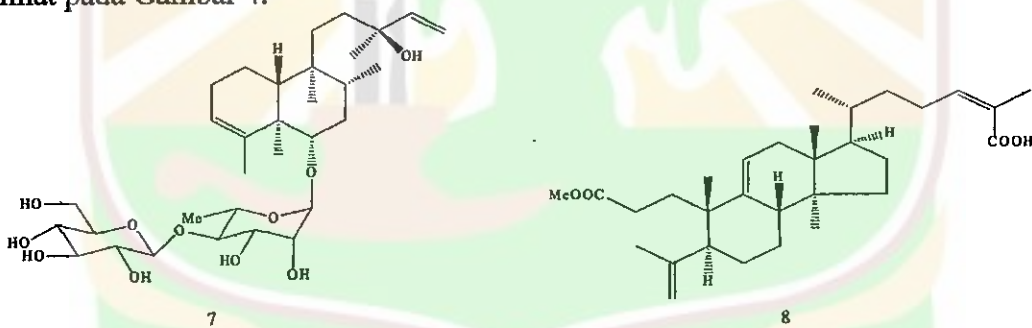


Gambar 3. Senyawa glikosida baru yang diisolasi oleh Raja *et al* (1995) pada *G. linearis* var. *Sebastiana*

Selain flavonoid, senyawa metabolit sekunder lainnya juga telah diisolasi dari genus *Gleichenia* yaitu terpenoid seperti yang dilakukan oleh Xiao-Li Li *et al* (2008) juga dengan menggunakan daun sebagai sampel. Mereka berhasil mengisolasi sebelas senyawa terpenoid dan dua diantaranya adalah senyawa terpenoid baru. Dua senyawa terpenoid baru yang berhasil diisolasi adalah

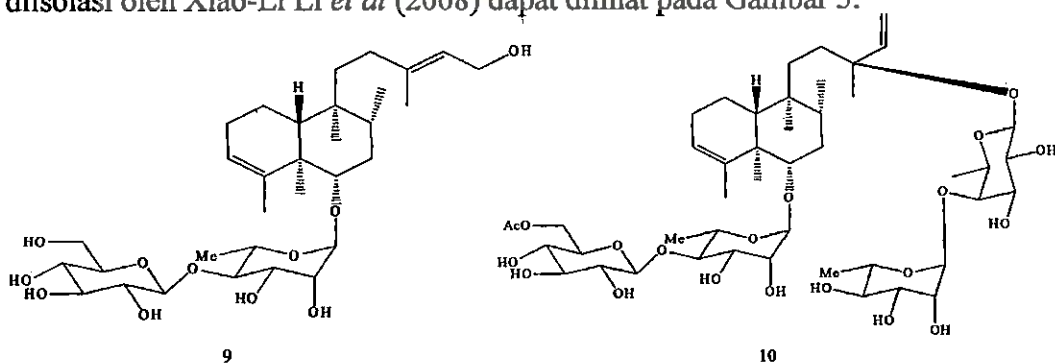
(6S,13S)-6-[[β -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil]oksi}cleroda-3,14-dien-13-ol (7) dan asam kadsurik 3-metil ester (8).

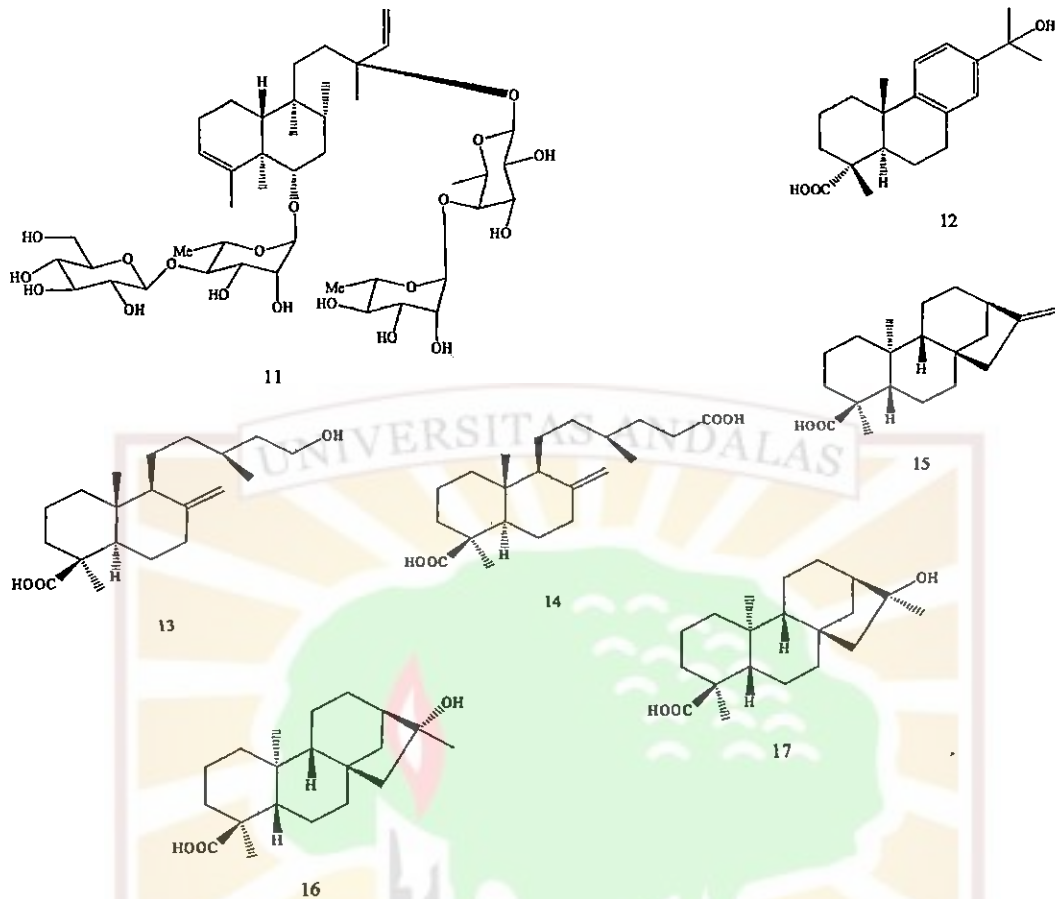
Sembilan senyawa terpenoid yang telah diketahui sebelumnya yang berhasil diisolasi oleh Xiao-Li Li *et al* (2008) adalah (6S,13E)-6-[[β -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil]oksi}cleroda-3,13-dien-15-ol (9), (6S,13S)-6-[6-O-asetil- β -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil]oksi}-13-[[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fukopiranosil]oksi}cleroda-3,14-dien (10), (6S,13S)-6-[[6-O- β -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil]oksi}-13-[[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fukopiranosil]oksi}cleroda-3,14-dien (11), (6S,13S)-6-[[6-O- β -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil]oksi}-13-[[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-fukopiranosil]oksi}cleroda-3,14-dien (12), asam 15-hidroksidehidroabietik (12), asam 15-hidroksilabd-8(17)-en-19-olat (13), asam junicedrik (14), asam (4 β)-kaur-16-en-18-olat (15), asam (4 β)-16-hidroksikauran-18-olat (16), dan asam (4 β ,16 β)-16-hidroksikauran-18-olat (17).⁷ Struktur dua senyawa terpenoid baru yang berhasil diisolasi oleh Xiao-Li Li *et al* (2008) dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Senyawa terpenoid baru yang diisolasi oleh Xiao-Li Li *et al* (2008)

Sedangkan sembilan senyawa terpenoid yang telah diketahui sebelumnya yang diisolasi oleh Xiao-Li Li *et al* (2008) dapat dilihat pada Gambar 5.





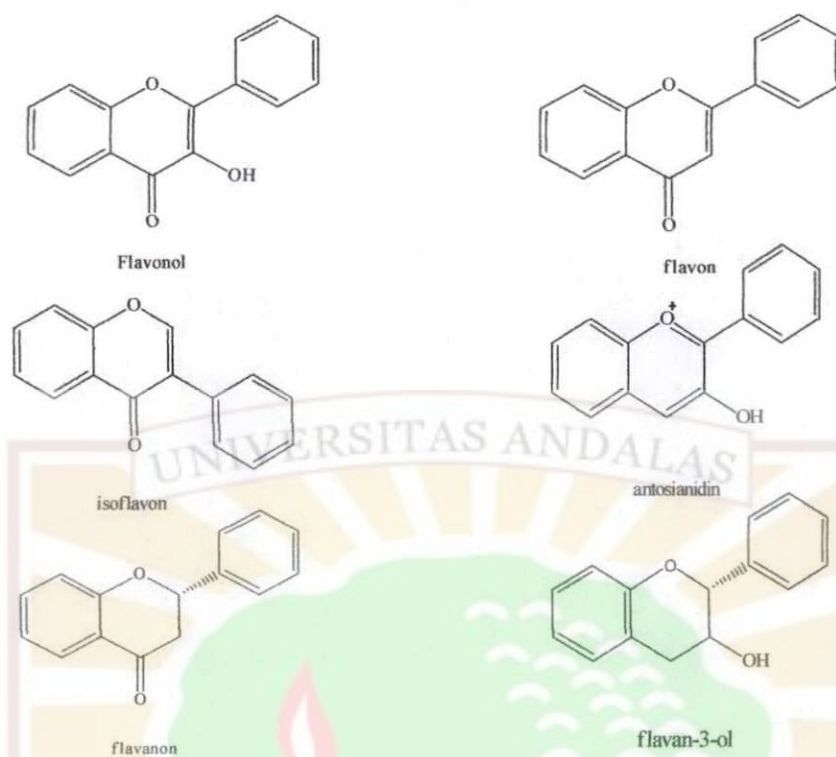
Gambar 5. Sembilan senyawa terpenoid yang diisolasi oleh Xiao-Li Li *et al* (2008) yang telah diketahui sebelumnya

Batang tumbuhan paku rasam bisa dimanfaatkan sebagai adsorben ion timbal pada limbah-limbah industri atau air yang tercemar seperti yang dilaporkan oleh Darus *et al* (2004). Mereka menggunakan tiga parameter untuk mengukur daya adsorpsi batang paku rasam terhadap kemampuannya mengadsorpsi ion timbal yaitu ukuran partikel adsorben, pH dan konsentrasi larutan timbal.⁸

2.3 Flavonoid

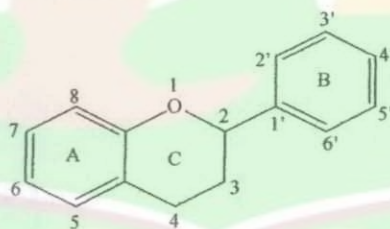
2.3.1 Tinjauan Umum Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdiri dari lima belas atom karbon dengan dua cincin aromatis yang dihubungkan oleh tiga rantai karbon. Flavonoid dapat dibagi menjadi enam sub-kelas utama dengan struktur yang berbeda-beda. Keenam sub-kelas tersebut adalah flavonol, flavon, flavan-3-ol, flavanon, isoflavon dan antosianidin.⁹ Struktur keenam sub-kelas flavonoid tersebut dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Sub-kelas utama flavonoid

Penomoran pada struktur flavonoid dapat dilihat pada Gambar 7.

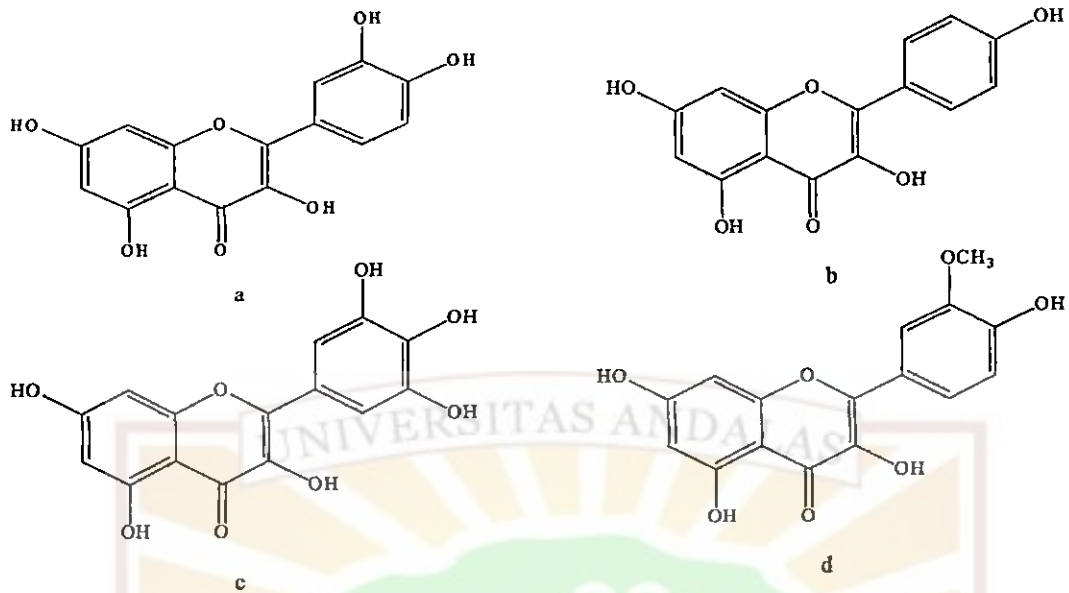


Gambar 7. Penomoran pada flavonoid

2.3.1.1 Flavonol

Flavonol merupakan senyawa flavonoid yang paling banyak tersebar luas pada tumbuhan-tumbuhan yang dapat dimakan. Warnanya bervariasi, ada yang putih namun ada juga yang kuning dan strukturnya hampir mirip dengan flavon. Beberapa golongan flavonol yang utama adalah quercetin (a), kaempferol (b), miricetin (c) dan isoramnetin (d). Quercetin termasuk yang paling melimpah di alam.⁹ Keempat struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 8.

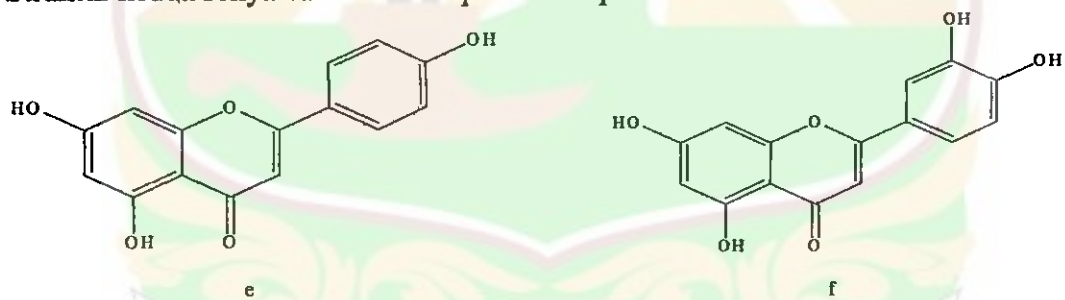




Gambar 8. Senyawa golongan flavonol

2.3.1.2 Flavon

Struktur flavon hampir sama dengan flavonol, hanya bedanya pada flavon tidak terdapat gugus hidroksi pada posisi 3 pada cincin C. Golongan utama dari flavon adalah apigenin (e) dan luteolin (f). Flavon tidak terlalu banyak tersebar di alam.⁹ Struktur kedua senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 9.

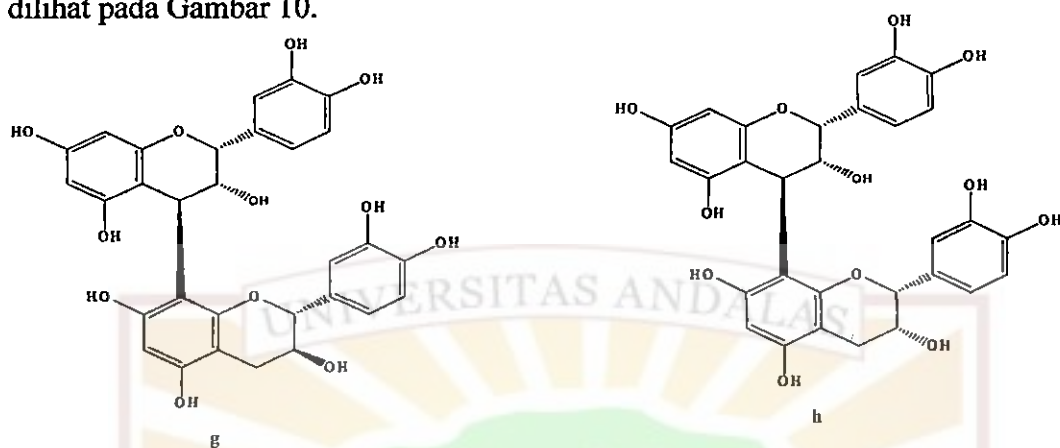


Gambar 9. Golongan utama flavon

2.3.1.3 Flavan-3-ol

Flavan-3-ol merupakan senyawa golongan flavonoid yang paling banyak dikonsumsi sebagai makanan diet, obat dan suplemen. Flavan-3-ol adalah sub-kelas flavonoid yang paling kompleks strukturnya, mulai dari monomer sederhana seperti (+)-katekin dan isomernya (-)-epikatekin sampai proantosianidin oligomer dan polimer, atau yang dikenal dengan tanin. Salah satu jenis proantosianidin yang melimpah di alam adalah prosianidin yang mengandung epikatekin, dua

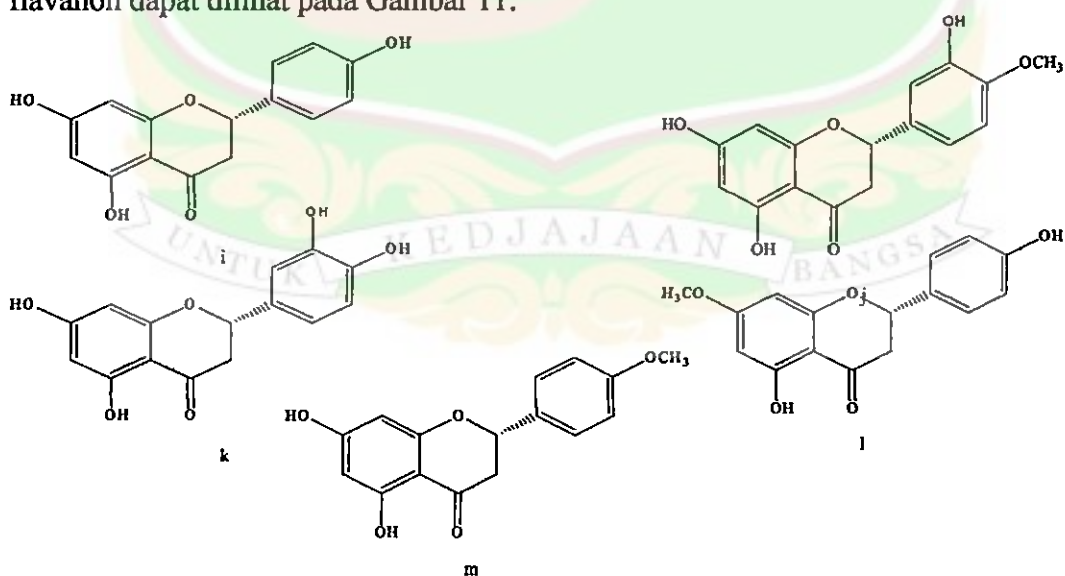
diantaranya berhasil diisolasi dari buah apel oleh Hong *et al* (2004) yaitu prosianidin B₁ (g) dan prosianidin B₂ (h).⁹ Kedua struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Prosianidin B₁ dan B₂

2.3.1.4 Flavanon

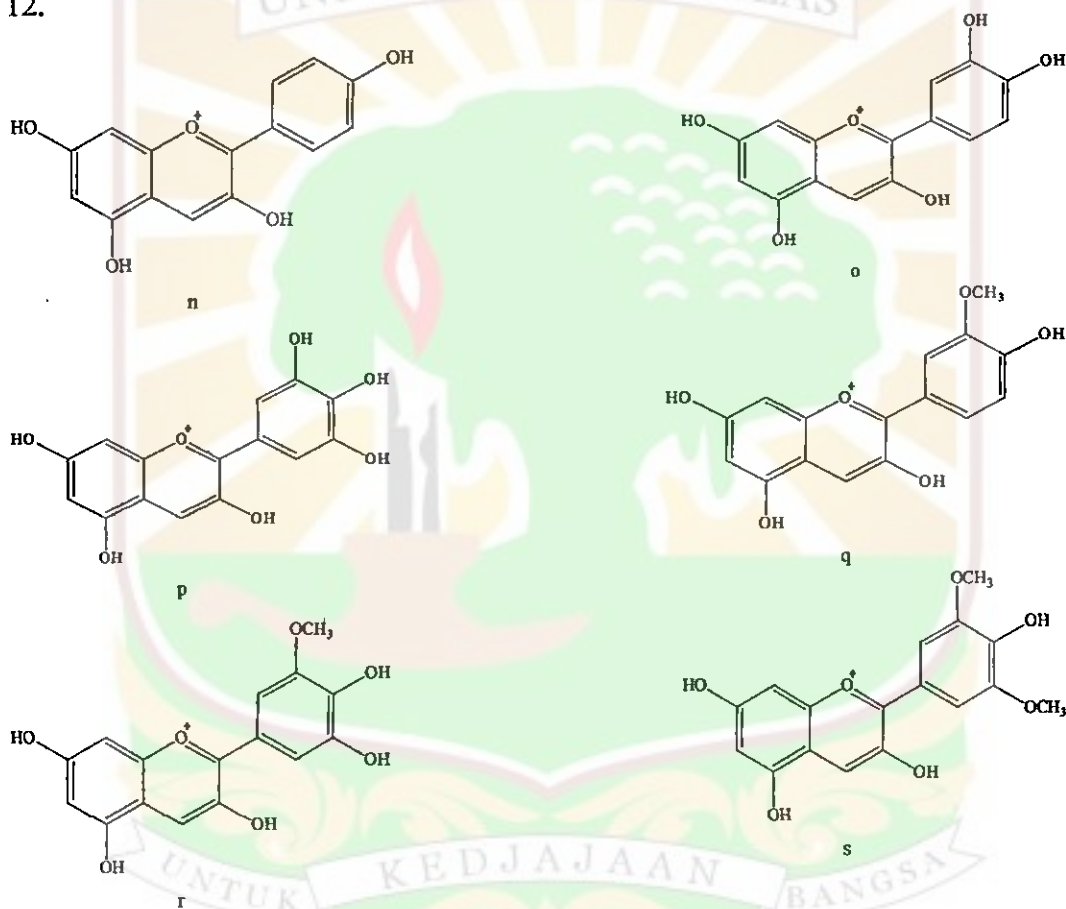
Golongan utama yang paling banyak melimpah di alam dari flavanon adalah naringenin (i), hesperitin (j) dan eriodiktiol (k). Sementara golongan minornya adalah sakuranetin (l) dan isosakuranetin (m). Flavanon sangat reaktif dan bisa mengalami hidroksilasi, glikosilasi dan reaksi O-metilasi. Flavanon banyak terkandung dalam buah jeruk dalam bentuk glikosida.⁹ Struktur senyawa golongan flavanon dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Senyawa golongan flavanon

2.3.1.5 Antosianidin

Antosianidin larut dalam air dan biasanya banyak terdapat pada buah dan bunga yang memberi warna pada buah dan bunga seperti warna merah, biru dan ungu. Pada umumnya, antosianidin berupa glikosida dari masing-masing aglikon kromofor antosianidin dimana terdapat gugus gula pada posisi 3 cincin C atau posisi 5 pada cincin A. Lima golongan utama antosianidin yang banyak terdapat di alam adalah pelargonidin (n), cianidin (o), delphinidin (p), peonidin (q), petunidin (r) dan malvidin (s).⁹ struktur senyawanya dapat dilihat pada Gambar 12.

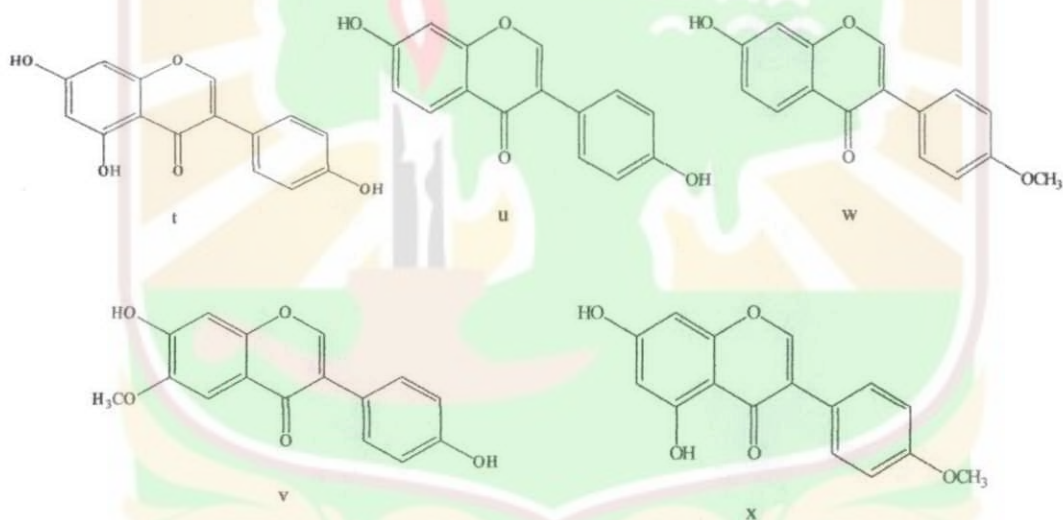


Gambar 12. Senyawa golongan utama antosianidin

Antosianidin berperan penting dalam melindungi tumbuhan dari cahaya matahari berlebihan dan juga berperan penting dalam menarik serangga untuk penyerbukan pada tumbuhan. Variasi struktur antosianidin tergantung pada (i) jumlah dan posisi gugus hidroksil dan metoksi; (ii) jenis, jumlah dan posisi gugus gula yang terikat; dan (iii) proses asilasi gula dan jenis asilatornya.⁹

2.3.1.6 Isoflavon

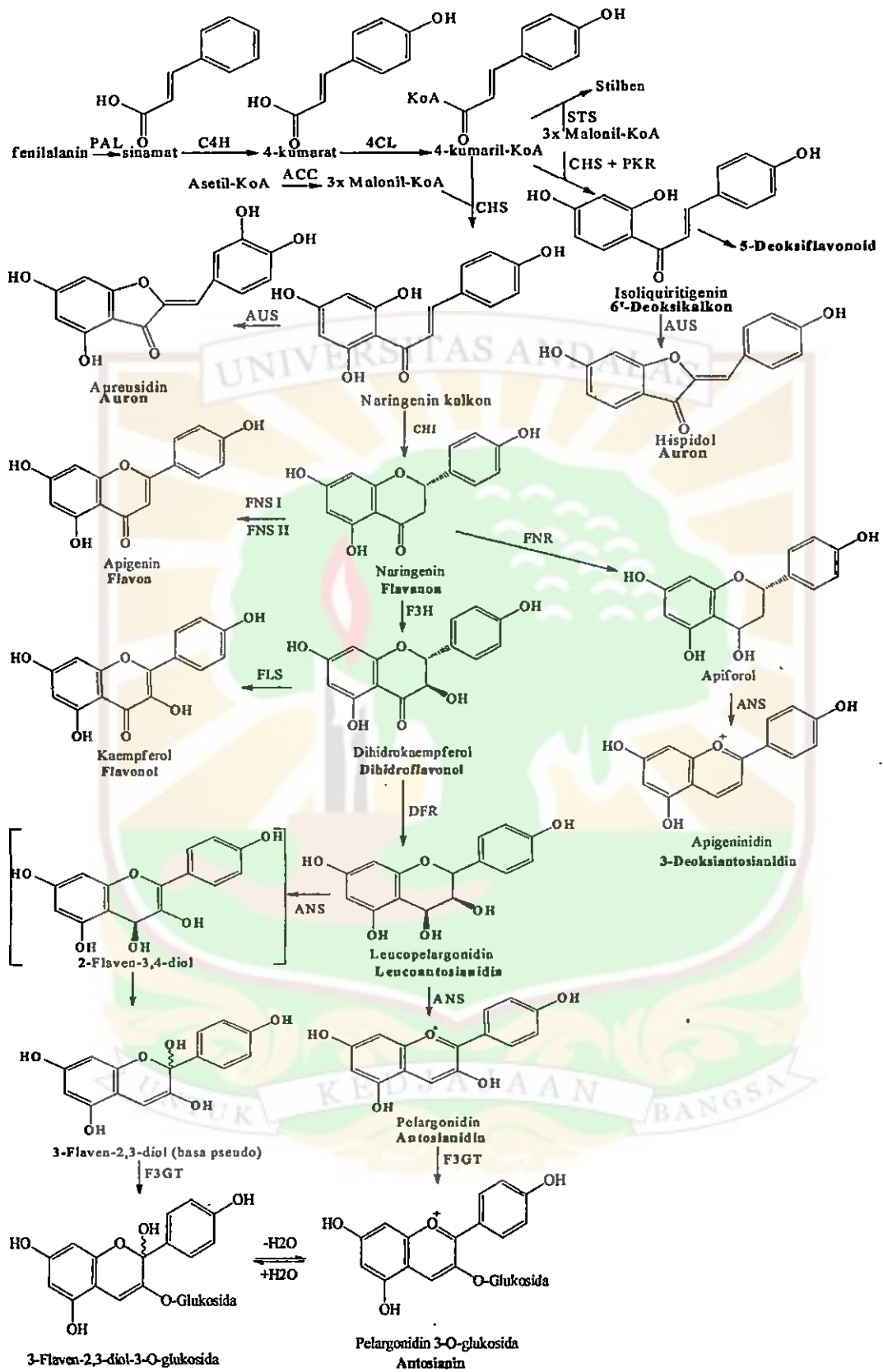
Salah satu perbedaan mendasar isoflavon dengan senyawa flavonoid lainnya yaitu letak cincin B yang terikat pada cincin C₃ sedangkan senyawa flavonoid lainnya umumnya, cincin B terikata pada C₂. Jumlahnya dialam sangat terbatas dan pada umumnya hanya ditemukan pada genus Leguminoseae. Isoflavon dikenal akan bioaktivitasnya mencegah kanker payudara dan osteoporosis. Salah satu jenis tumbuhan yang mempunyai kandungan isoflavon terbanyak adalah kacang kedelai. Isoflavon juga bisa mengalami berbagai modifikasi seperti metilasi, hidroksilasi atau polimerisasi dan modifikasi ini berujung pada terbentuknya isoflavonoid yang sederhana seperti isoflavanon, isoflavan dan isoflavonol. Beberapa golongan utama dari isoflavon adalah genistein (t), daidzein (u), glicitein (v), formononetin (w) dan biochanin A (x).⁹ Struktur senyawa dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Senyawa golongan utama isoflavon

2.3.2 Biosintesis Flavonoid

Jalur biosintesis flavonoid merupakan bagian dari jalur biosintesis fenilpropanoid yang juga mencakup biosintesis senyawa metabolit sekunder lainnya seperti asam fenolik, lignin, lignan dan stilben. Prekursor biosintesis flavonoid yang paling utama adalah fenilalanin, berasal dari jalur sikimat dan arogenat; dan malonil-KoA, yang berasal dari sitrat hasil dari siklus TCA (*tricarboxylic acid*).¹⁰ Jalur biosintesis flavonoid dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Jalur biosintesis flavonoid

Keterangan:

- PAL : fenilalanin amonia-liase
- C4H : sinamat 4-hidroksilase
- 4CL : 4-kumarat: KoA ligase
- ACC : asetil-KoA karboksilase (sitosolik)
- CHS : kalkon sintase
- CHI : kalkon isomerase
- PKR : poliketida reduktase
- AUS : aureusidin sintase
- FNR : flavanon 4-reduktase
- FNS I : flavon sintase I
- FNS II : flavon sintase II
- F3H : flavanon 3 β -hidroksilase
- FLS : flavonol sintase
- ANS : antosianidin sintase (leukoantosianidin dioksigenase)
- DFR : dihidroflavonol 4-reduktase
- F3GT : antosianidin 3-O-glukosiltransferase/flavonol 3-O-glukosiltransferase

2.4 Metode Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

2.4.1 Metode Ekstraksi

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada bagian tumbuhan seperti akar, buah, bunga, daun, dan kulit batang dapat diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi yang bervariasi, tergantung kepada jenis senyawa yang akan diisolasi dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Beberapa metode ekstraksi senyawa metabolit sekunder yang lazim digunakan di laboratorium antara lain:¹¹

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa metabolit sekunder karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel karena adanya perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Ekstraksi senyawa dapat diatur dengan lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut dalam metode maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa metabolit sekunder dengan pelarut yang digunakan.

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama dengan pelarut. Metode ini hanya efektif jika senyawa organik yang akan diisolasi mempunyai kelarutan yang besar pada pelarut organik yang digunakan.

3. Sokletasi

Sokletasi merupakan metode ekstraksi senyawa metabolit sekunder dengan pemanasan memakai soklet. Metode ini cukup menghemat jumlah pelarut yang digunakan dalam ekstraksi karena dalam ekstraksi ini terjadi sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel sampai proses ekstraksi selesai. Metode ini sangat baik untuk senyawa-senyawa yang tahan panas.

4. Distilasi Uap

Proses distilasi uap banyak digunakan untuk mengekstraksi senyawa bahan alam yang tahan pada suhu yang cukup tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Umumnya, banyak digunakan untuk ekstraksi minyak atsiri.

5. Pengempaan

Metode ini lebih banyak digunakan dalam proses industri seperti pada isolasi *Crude Palm Oil* (CPO) dari buah kelapa sawit dan isolasi katekin dari daun gambir. Proses ini tidak menggunakan pelarut.

2.4.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan sebuah metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari suatu campuran yang didasarkan pada interaksi komponen dengan fasa diam dan fasa gerak yang tidak saling bercampur. Pada penelitian ini, ada dua jenis metode kromatografi yang digunakan yaitu Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom.

2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu metode yang sangat penting dalam penelitian kimia organik. Manfaatnya antara lain untuk melihat jumlah komponen dalam suatu campuran, untuk menentukan apakah dua buah senyawa identik atau tidak, untuk menentukan pelarut yang baik dalam pemisahan dengan

դրանք որևէ պահի ստիպեցանքս Երևանը չունի բնիկ զգացման հասցանքը զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

Ինքնին կուսակցության կողմից
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

Երևանը կուսակցության կողմից
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

Երևանը կուսակցության կողմից
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

Երևանը կուսակցության կողմից
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

Երևանը կուսակցության կողմից
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս
 զանազան կողմերում զգացման հասցանքը ստիպեցանքս ստիպեցանքս ստիպեցանքս

kromatografi kolom (KK), memonitor hasil pemisahan dengan KK, dan memeriksa hasil pemurnian. Teknik pemisahan dengan KLT yaitu sampel ditotolkan pada plat KLT pada batas bawah yang telah dibuat, lalu kemudian dielusi dengan fasa gerak. Pada KLT, fasa diam atau adsorbennya berada pada sebuah plat sedangkan fasa geraknya adalah pelarut tertentu. Fasa gerak akan membawa naik dan memisahkan komponen-komponen yang terdapat pada noda yang telah ditotolkan pada plat KLT. Salah satu keuntungan dari KLT yaitu komponen yang terpisah bisa dideteksi dengan reagen tertentu dan dilihat dibawah lampu ultraviolet (UV).¹² Komponen yang terpisah dari noda totalan awal dapat dihitung Rf-nya dengan menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

2.4.2.2 Kromatografi Kolom

Pemisahan pada KK bisa berupa cair-padat (adsorpsi) atau cair-cair (partisi). Kolom yang digunakan biasanya terbuat dari kaca. Prinsip kerja dari KK adalah terjadinya interaksi antara fasa diam dan fasa gerak dalam kolom. Fasa diam yang biasa digunakan di laboratorium adalah silika gel dan fasa geraknya adalah pelarut tunggal dengan kepolaran tertentu atau kombinasi dari dua atau tiga pelarut sesuai dengan tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Sampel yang akan dielusi biasanya dicampur terlebih dahulu dengan silika baru kemudian dielusi (*packing*). Eluat yang keluar dari hasil KK ditampung sehingga akan diperoleh beberapa fraksi eluat. Fraksi-fraksi tersebut kemudian dimonitor dengan KLT, dimana fraksi-fraksi dengan nilai Rf yang sama digabung.¹²

2.5 Uji Kemurnian

Salah satu cara untuk menguji kemurnian senyawa hasil isolasi adalah dengan mengukur titik lelehnya. Ketika suatu zat meleleh, maka fasa padat dan fasa cair dari zat tersebut berada pada keadaan setimbang. Selama berada dalam keadaan setimbang, suhunya akan tetap, oleh karena itu suatu zat yang murni hanya mempunyai satu titik leleh. Namun, titik leleh suatu zat biasanya berada dalam kisaran angka tertentu. Suatu senyawa dikatakan murni apabila mempunyai titik

leleh pada kisaran suhu 1-2°C. Senyawa yang mempunyai titik leleh lebih dari 2°C dikatakan tidak murni dan harus dimurnikan lagi melalui proses rekristalisasi.¹³

2.6 Metode Karakterisasi

2.6.1 Spektroskopi Ultraviolet

Karakterisasi dengan spektroskopi UV bertujuan untuk mengetahui sistem elektron π berkonjugasi pada suatu senyawa. Spektroskopi UV berada pada rentang panjang gelombang 200 – 400 nm. Pada spektroskopi UV, adanya radiasi oleh sinar UV menunjukkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk mempromosikan satu elektron ke orbital lain pada ikatan rangkap berkonjugasi. Promosi elektron tersebut terjadi dari orbital molekul ikatan π ke orbital molekul ikatan π^* atau disebut eksitasi $\pi \rightarrow \pi^*$.¹⁴

Spektrum UV tercatat ketika sampel disinari dengan sinar UV dengan panjang gelombang yang berubah terus menerus. Ketika panjang gelombang sama dengan tingkat energi yang dibutuhkan untuk mengeksitasi elektron maka energi akan diserap. Spektra UV lebih sederhana, ditandai dengan puncak yang tunggal dan biasanya melebar.¹⁴

2.6.2 Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi inframerah merupakan salah satu elemen penting dalam karakterisasi senyawa organik. Dengan spektroskopi inframerah kita dapat mengetahui vibrasi molekul dan gugus fungsi dari suatu senyawa organik. Daerah inframerah berada pada rentang 4000 – 400 cm^{-1} dengan rentang energi 48,0 kJ/mol – 4,80 kJ/mol. Pada spektroskopi inframerah terdapat daerah sidik jari (*fingerprint region*) dengan rentang panjang gelombang dari 1500 – 400 cm^{-1} dan merupakan daerah yang sangat kompleks.¹⁴

Adanya vibrasi molekul yang terjadi pada senyawa organik menyebabkan senyawa itu mempunyai serapan yang khas pada spektrum inframerah. Suatu molekul dapat meregang dan menekuk hanya pada frekuensi tertentu, pada energi tertentu. Molekul akan menyerap energi dari radiasi inframerah ketika frekuensi dari radiasi tersebut sama dengan frekuensi vibrasi. Energi yang diserap akan

meningkatkan amplitudo vibrasi. Frekuensi radiasi yang diserap tersebut dapat dibaca pada spektrum inframerah yang dihasilkan. Dengan mengetahui jenis vibrasi dari molekul tersebut, dapat diketahui gugus fungsi yang ada pada molekul tersebut.¹⁴

Kebanyakan gugus fungsi mempunyai pita serapan inframerah yang spesifik yang tidak berubah antara satu senyawa dengan senyawa lainnya. Misalnya serapan C=O pada keton akan selalu berada pada rentang 1680 – 1750 cm^{-1} ; serapan OH dari alkohol akan selalu berada pada rentang 3400 – 3650 cm^{-1} ; serapan C=C dari alkena akan selalu berada pada rentang 1640 – 1680 cm^{-1} dan lain sebagainya. Dengan mempelajari serapan karakteristik dari gugus fungsi, memungkinkan kita untuk mendapatkan informasi struktur senyawa dari spektra inframerah. Untuk mempermudah penafsiran daerah serapan inframerah dari 4000 – 400 cm^{-1} , dibagi menjadi empat bagian sebagai berikut:¹⁴

1. Daerah panjang gelombang 4000 – 2500 cm^{-1} , ada serapan karena ada ikatan tunggal N-H, C-H dan O-H dengan gerak meregang. N-H dan O-H menyerap pada rentang panjang gelombang 3300 – 3600 cm^{-1} ; ikatan C-H mendekati 3000 cm^{-1} .
2. Daerah panjang gelombang 2500 – 2000 cm^{-1} yaitu daerah dimana terjadi serapan oleh ikatan rangkap tiga, C \equiv N dan C \equiv C.
3. Daerah panjang gelombang 2000 – 1500 cm^{-1} yaitu daerah dimana terjadi serapan oleh ikatan rangkap C=O, C=N dan C=C. Gugus karbonil (C=O) biasanya menyerap pada rentang panjang gelombang 1680 – 1750 cm^{-1} sementara C=C umumnya pada rentang panjang gelombang 1640 – 1680 cm^{-1} .
4. Daerah panjang gelombang antara 1500 – 500 cm^{-1} (*fingerprint region*) biasa terjadi serapan vibrasi dari C-C, C-O, C-N dan C-X.

2.7 Aktivitas Antioksidan

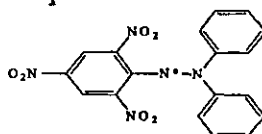
Antioksidan merupakan senyawa yang mampu melindungi kerusakan sel dalam jaringan tubuh akibat pengaruh dari radikal bebas. Radikal bebas kebanyakan adalah spesies oksigen yang reaktif seperti singlet oksigen, superoksida, peroksil radikal, hidroksil radikal dan peroksininitrit.¹⁵

Radikal bebas merupakan molekul tidak stabil karena kekurangan elektron sehingga sangat reaktif, selalu berbenturan dengan molekul lain, mengambil elektron dari molekul lain dan menyebabkan kerusakan pada jaringan tubuh.¹⁶ Molekul radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid atau DNA dan dapat menyebabkan penyakit degeneratif pada manusia. Senyawa antioksidan seperti asam fenolat, polifenol dan flavonoid akan menangkap radikal bebas seperti peroksida, hidroperoksida atau lipid peroksid sehingga dapat mencegah terjadi kerusakan pada sel dan penyakit degeneratif.¹⁷

Pada dasarnya, tubuh manusia menghasilkan antioksidan berupa protein yang dihasilkan oleh gen yang disebut antioksidan enzim. Akan tetapi karena kondisi lingkungan turut berperan dalam meningkatkan jumlah radikal bebas sehingga tubuh tidak mampu lagi melawan kerusakan oksidasi sel oleh radikal bebas sehingga dibutuhkan suplemen antioksidan seperti vitamin E, C dan karotenoid.¹⁶ Kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas mengakibatkan terjadinya penuaan dan berbagai macam penyakit seperti atherosklerosis, diabetes, kanker dan cirrhosis.¹⁸ Karakteristik utama dari antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas. Antioksidan juga berperan penting dalam mencegah kerusakan makanan. Lipid peroksidasi merupakan salah satu penyebab terjadinya kerusakan pada makanan selama proses pengolahan dan penyimpanan makanan.¹⁹

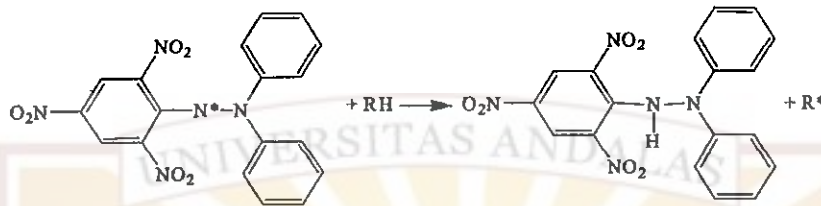
2.7.1 Metode DPPH untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Salah satu uji aktivitas antioksidan yang lazim digunakan adalah metode DPPH karena sederhana dan murah. DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) adalah molekul radikal stabil yang disebabkan oleh delokalisasi elektron pada molekul secara keseluruhan sehingga tidak dapat membentuk senyawa dimer seperti pada molekul radikal lainnya. Delokalisasi elektron tersebut menyebabkan senyawa ini berwarna ungu dan mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 515 nm. Struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 15.

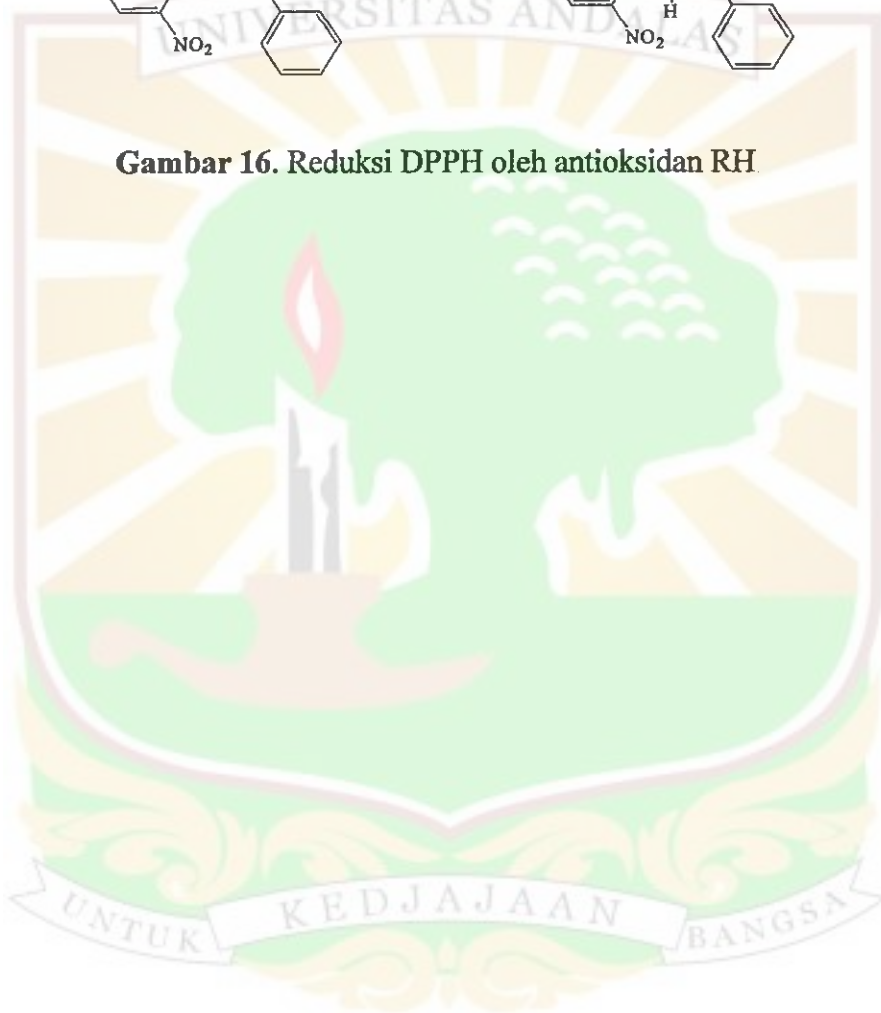


Gambar 15. Struktur DPPH

Warna larutan DPPH akan berubah menjadi kuning ketika DPPH direduksi oleh atom hidrogen yang berasal dari senyawa antioksidan membentuk DPPH - H. Perubahan warna ini juga menyebabkan terjadinya penurunan absorbtivitas molar DPPH dari 9660 menjadi 1640. Reduksi DPPH oleh antioksidan RH dapat dilihat pada Gambar 16.¹⁷



Gambar 16. Reduksi DPPH oleh antioksidan RH



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari bulan Maret 2011 s/d Februari 2012 di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Andalas. Pengukuran spektroskopi inframerah dilakukan di Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas. Pengukuran spektroskopi UV dilakukan di Laboratorium Biota Sumatera Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat distilasi pelarut, *rotary evaporator* Heidolf WB 2000, plat KLT (silika gel 60 F₂₅₄), kolom kromatografi, pipa kapiler, kertas aluminium foil, gelas ukur, lampu UV untuk pengungkap noda 254 dan 365 nm, *melting point apparatus*, spektrofotometer UV Vis-1700 PharmaSpec Shimadzu dan spektrofotometer FTIR Perkin Elmer 1600 series.

3.2.2 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksan distilasi, etil asetat distilasi, metanol distilasi dan pa, 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), silika gel, serbuk magnesium, besi (III) klorida, anhidrida asetat, natrium hidroksida, amoniak, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, asam sulfat, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi Mayer dan I₂.

3.3 Pembuatan Pereaksi dan Larutan

3.3.1 Pereaksi Liebermann-Burchard

Sebanyak 5 mL anhidrida asetat dicampurkan dengan 5 mL asam sulfat pekat. Kemudian campuran ini dilarutkan secara perlahan dengan 50 mL metanol.

3.3.2 Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g merkuri (II) klorida yang dilarutkan dalam 60 mL akuades dicampurkan dengan larutan yang mengandung 5 gram kalium iodida yang dilarutkan dalam 20 mL akuades.

3.3.3 Pereaksi besi (III) klorida 5 %

Sebanyak 5 g besi (III) klorida dilarutkan dengan akuades hingga volumenya mencapai 100 mL di dalam labu ukur.

3.3.4 Pereaksi natrium hidroksida 1 %

Sebanyak 1 g natrium hidroksida dilarutkan dengan akuades hingga volumenya mencapai 100 mL di dalam labu ukur.

3.3.5 Pereaksi asam sulfat 2 N

Sebanyak 5,5 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan akuades hingga volumenya mencapai 100 mL di dalam labu ukur.

3.3.6. Larutan DPPH 50 μ M

Sebanyak 1,97 mg DPPH dilarutkan kedalam metanol hingga volumenya mencapai 100 mL dalam labu ukur sehingga akan didapat larutan DPPH 50 μ M.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun paku rasam yang telah dipisahkan dari tulang daunnya. Daun paku rasam yang telah dipisahkan dari tulang daunnya tersebut dikeringkan terlebih dahulu selama beberapa hari. Setelah itu daun tersebut digiling halus sehingga dihasilkan sampel dalam bentuk serbuk. Sebanyak 300 g serbuk daun paku rasam tersebut digunakan untuk isolasi metabolit sekunder. Penghalusan sampel ini bertujuan untuk memperbesar luas permukaan per berat sampel sehingga akan mempermudah proses isolasi senyawa metabolit sekunder karena interaksi antara sampel dengan pelarut semakin besar.

3.4.2 Uji Profil Fitokimia Daun Paku Rasam

Pada penelitian ini dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada pada daun paku rasam. Adapun senyawa metabolit sekunder yang diidentifikasi adalah flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan kumarin.

3.4.2.1 Pemeriksaan Flavonoid, Fenolik, Saponin, Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 4 g sampel segar dirajang halus lalu ditambahkan 25 mL etanol dan dipanaskan selama lebih kurang 25 menit. Kemudian campuran disaring dalam keadaan panas dan pelarutnya diuapkan sampai kering. Kemudian ditambahkan kloroform dan akuades masing-masing sebanyak 5 mL lalu dikocok. Setelah itu dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan kloroform. Lapisan air yang berada diatas digunakan untuk pemeriksaan flavonoid, fenolik dan saponin, sedangkan lapisan kloroform yang berada dibawah digunakan untuk pemeriksaan triterpenoid dan steroid.¹¹

a) Pemeriksaan Flavonoid (*Sianidin test*)

Beberapa tetes lapisan air dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam klorida pekat dan serbuk magnesium. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya flavonoid.

b) Pemeriksaan Fenolik

Beberapa tetes lapisan air dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan besi (III) klorida 5 %. Timbulnya warna hijau sampai ungu menandakan adanya fenolik.

c) Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 1 mL lapisan air dikocok selama satu menit, terbentuknya busa yang tidak hilang selama 5 menit menandakan adanya saponin.

d) Pemeriksaan Triterpenoid dan Steroid

Beberapa tetes lapisan kloroform diteteskan pada plat tetes dan dibiarkan kering, kemudian ditambahkan beberapa tetes asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Terbentuknya warna merah atau merah muda menandakan positif untuk senyawa triterpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan positif untuk steroid.

3.4.2.2 Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 4 g sampel dipotong halus, digerus dengan lumpang dengan bantuan pasir bersih dan dibasahi dengan 10 mL kloroform. Kemudian ditambahkan kloroform-amoniak 0,05 M, digerus kembali dan disaring kedalam tabung reaksi dengan bantuan kapas. Kemudian ditambahkan 0,5 mL asam sulfat 2 N lalu dikocok hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan asam yang berada dibagian atas dan lapisan kloroform yang berada dibagian bawah. Lapisan asam diambil dengan pipet tetes dan dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan satu tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan berwarna putih atau kabut putih menandakan adanya alkaloid.¹¹

3.4.2.3 Pemeriksaan Kumarin

Sebanyak 2-4 g sampel dipotong kecil-kecil dan diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol. Hasil ekstraksi ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler dan dibiarkan kering diudara terbuka, kemudian dielusi dalam *chamber* yang berisi lebih kurang 10 mL eluen etil asetat 100 %. Setelah dielusi, amati noda yang timbul dibawa lampu UV (365 nm). Jika timbul fluoresensi biru pada plat KLT menandakan adanya kumarin dan jika disemprot dengan larutan NaOH 1% maka fluoresensi tersebut akan bertambah terang.¹¹

3.5 Isolasi Flavonoid Dari Daun Paku Rasam

3.5.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan sokletasi. Sistem ekstraksi yang digunakan adalah sistem kepolaran bertingkat. Sebanyak 50 g serbuk kering daun paku rasam diekstrak dengan n-heksan dimana volume n-heksan yang digunakan untuk ekstraksi adalah sebanyak 2½ kali volume ekstraktor soklet (i). Dari hasil ekstraksi diperoleh ekstrak n-heksan dan ampasnya. Selanjutnya, ampas n-heksan diekstrak dengan etil asetat dimana volume etil asetat yang digunakan adalah sebanyak 2½ kali volume ekstraktor soklet (ii). Dari hasil ekstraksi diperoleh ekstrak etil asetat dan ampasnya. Ampas etil asetat tersebut diekstrak lagi dengan metanol dimana volume metanol yang digunakan juga sebanyak 2½ kali volume ekstraktor soklet (iii).

Proses ini (i, ii, iii) dilakukan sampai 6 kali dimana hasil ekstraksi dari masing-masing pelarut yang sama digabung menjadi satu. Dengan demikian, total sampel yang digunakan selama proses ekstraksi adalah 300 g. Ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kasar dari n-heksan, etil asetat dan metanol. Masing-masing ekstrak ini kemudian diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH, dimana ekstrak yang paling aktif sebagai antioksidan dilanjutkan pemurniannya dengan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa flavonoid murni. Skema kerja isolasi flavonoid dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.5.2 Uji Antioksidan Ekstrak Daun Paku Rasam

Sebanyak 0,1 g dari masing-masing ekstrak dilarutkan dalam 100 mL metanol sehingga didapatkan larutan sampel dari masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 0,1 %. Sebanyak 0,4 mL larutan sampel ditambahkan dengan 7,6 mL larutan DPPH 50 µM dan didiamkan selama 30 menit ditempat yang gelap. Kemudian masing-masing larutan ini diukur absorbannya pada panjang gelombang 515 nm. Larutan kontrol yang digunakan adalah 0,4 mL metanol yang ditambahkan dengan 7,6 mL larutan DPPH 50 µM.²⁴ Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan secara duplo. Setelah dilakukan pengukuran absorban dari masing-masing larutan sampel, dihitung persen inhibisinya dengan rumus:

$$\text{persen inhibisi} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

dimana A adalah absorban. Skema kerja uji antioksidan ekstrak daun paku rasam dapat dilihat pada Lampiran 2. Untuk perhitungan persen inhibisi dari masing-masing fraksi dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.5.3 Kromatografi

Setelah didapatkan ekstrak yang paling aktif sebagai antioksidan, dilakukan pemurnian dari ekstrak tersebut dengan kromatografi kolom. Ekstrak yang akan dimurnikan dengan kromatografi kolom adalah seberat 2 gram. Proses

kromatografi kolom menggunakan silika gel sebanyak 80 g sebagai fasa diam yang sudah dibuat dalam bentuk bubur terlebih dahulu dengan pelarut etil asetat. Fasa gerak yang digunakan adalah etil asetat dan metanol dengan berbagai macam variasi kepolaran.

Sistem elusi dilakukan dengan kepolaran bertingkat dimulai dari etil asetat 100 % hingga metanol 100 %. Eluat yang keluar dari hasil kromatografi kolom ditampung dalam botol vial dengan volume lebih kurang 20 mL. Kemudian dilakukan uji KLT pada eluat. Eluat dengan pola noda yang sama digabung menjadi satu sehingga diperoleh beberapa kelompok fraksi. Selanjutnya dari beberapa kelompok fraksi yang diperoleh dilakukan kembali uji KLT dan salah satu fraksi yang menunjukkan noda tunggal dipilih untuk proses pemurnian lebih lanjut.

Fraksi yang menunjukkan noda tunggal tersebut (fraksi F) ternyata belum murni. Pada fraksi F kemudian ditambahkan n-heksan. Bagian yang larut (F_1) dipisahkan dari bagian yang tak larut. Bagian yang tak larut tersebut kemudian ditambah dengan etil asetat. Bagian yang larut dengan etil asetat (F_2) dipisahkan dari bagian yang tak larut. Bagian yang tak larut ini kemudian ditambah dengan metanol (F_3). Tahap pemurnian kemudian dilanjutkan pada fraksi F_2 yang menunjukkan noda tunggal setelah dimonitor pada plat KLT. Setelah dilakukan elusi berulang-ulang dengan eluen yang sama, noda yang dihasilkan juga tetap tunggal. Untuk memperkuat hasil analisis, dilakukan elusi dengan berbagai variasi kepolaran eluen dan pengujian dengan I_2 sebagai pengungkap noda.

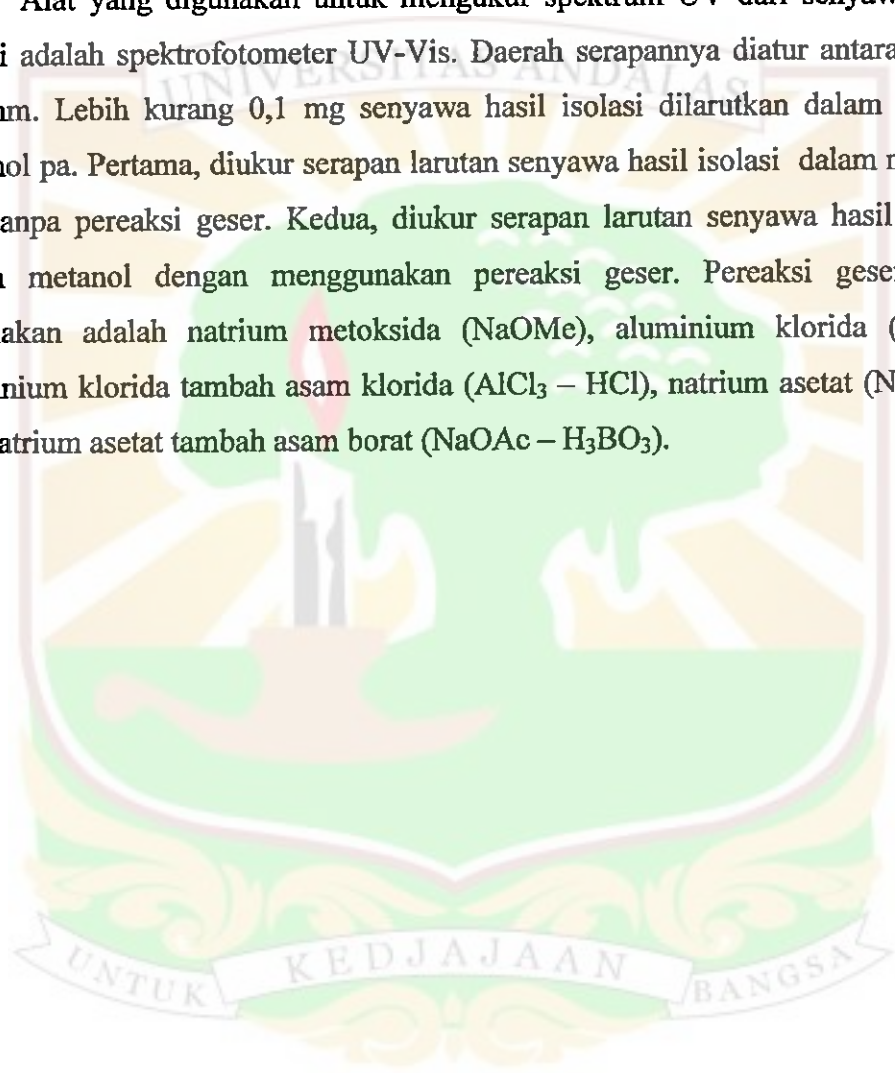
3.6 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Untuk mengetahui apakah senyawa hasil isolasi (F_2) positif mengandung flavonoid, maka dilakukan uji flavonoid dengan *Sianidin test*. Sebagian padatan dari F_2 tersebut dilarutkan dengan metanol kemudian ditambah dengan asam klorida pekat dan serbuk magnesium. Uji kandungan fenolik juga dilakukan pada F_2 dengan penambahan besi (III) klorida 5 %.

Pada senyawa hasil isolasi juga dilakukan pengukuran titik leleh untuk mengetahui apakah senyawa hasil isolasi telah murni. Caranya yaitu beberapa mg senyawa hasil isolasi dimasukkan kedalam pipa kapiler lalu ditempatkan pada alat

pengukur titik leleh. Kemudian dicatat perubahan suhu saat senyawa hasil isolasi mulai meleleh dan saat meleleh sempurna. Untuk mendapatkan spektrum inframerah dari senyawa hasil isolasi, digerus 1 mg sampel dengan 100 mg KBr sampai homogen, kemudian dijadikan pelet dengan memberikan tekanan yang besar. Pelet diletakkan pada alat spektrofotometri inframerah dan diukur spektranya.

Alat yang digunakan untuk mengukur spektrum UV dari senyawa hasil isolasi adalah spektrofotometer UV-Vis. Daerah serapannya diatur antara 200 – 400 nm. Lebih kurang 0,1 mg senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam 10 mL metanol. Pertama, diukur serapan larutan senyawa hasil isolasi dalam metanol saja tanpa pereaksi geser. Kedua, diukur serapan larutan senyawa hasil isolasi dalam metanol dengan menggunakan pereaksi geser. Pereaksi geser yang digunakan adalah natrium metoksida (NaOMe), aluminium klorida (AlCl_3), aluminium klorida tambah asam klorida ($\text{AlCl}_3 - \text{HCl}$), natrium asetat (NaOAc), dan natrium asetat tambah asam borat ($\text{NaOAc} - \text{H}_3\text{BO}_3$).



BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Uji Profil Fitokimia Daun Paku Rasam

Hasil uji kandungan senyawa metabolit sekunder (flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan kumarin) dari daun paku rasam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji profil fitokimia daun paku rasam

No.	Senyawa metabolit sekunder	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
1.	flavonoid	<i>Sianidin test</i>	larutan jingga - merah	(+)
2.	fenolik	besi (III) klorida 5 %	larutan kehijauan	(+)
3.	saponin	akuades	terbentuk busa	(+)
4.	triterpenoid	Liebermann – Burchard	larutan kuning kemerahan	(+)
5.	steroid	Liebermann – Burchard	larutan biru	(+)
6.	alkaloid	Mayer	tidak terbentuk endapan putih	(-)
7.	kumarin	NaOH 1 %	fluorisensi semakin terang pada plat KLT	(+)

Keterangan: - (+) : mengandung senyawa

- (-) : tidak mengandung senyawa

Dari data diatas dapat diketahui bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun paku rasam adalah flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid, dan kumarin.

4.2 Isolasi Flavonoid Dari Daun Paku Rasam

4.2.1 Ekstraksi

Hasil ekstraksi sampel yang diperoleh ada tiga yaitu ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil ekstraksi daun paku rasam

No.	Ekstrak	Berat (g)	% Berat	Warna
1.	n-heksan	4,01	0,013	hijau tua
2.	etil asetat	17,81	0,059	kuning
3.	metanol	34,46	0,115	jingga kemerahan

Dari Tabel 2 diatas dapat diketahui bahwa senyawa yang paling dominan terkandung dalam sampel adalah senyawa yang kepolarannya sama dengan metanol dengan persentase berat 0,115 %.

4.2.2 Hasil Uji Antioksidan Ekstrak Daun Paku Rasam

Hasil uji antioksidan dari ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol dari sampel dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel.3 Hasil pengukuran absorban dan persen inhibisi ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari sampel

No.	Ekstrak	Absorban	% inhibisi
1.	n-heksan	0,247	1,2
2.	etil asetat	0,112	55,2
3.	metanol	0,016	93,6

Absorban larutan kontrol adalah 0,250. Berdasarkan Tabel 3 diatas dapat diketahui bahwa ekstrak metanol mempunyai aktivitas antioksidan yang paling baik dibandingkan dengan ekstrak n-heksan dan etil asetat. Ekstrak metanol inilah yang kemudian dilanjutkan untuk kromatografi kolom karena paling aktif sebagai antioksidan.

4.2.3 Kromatografi

Hasil elusi kromatografi kolom dengan berbagai perbandingan eluen dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil elusi kromatografi kolom

No.	Perbandingan eluen		Volume terpakai (mL)	No. vial
	Etil asetat	Metanol		
1.	10	0	400	1-13
2.	9	1	400	14-32
3.	8	2	200	33-42
4.	7	3	200	43-49
5.	6	4	200	50-58
6.	5	5	200	59-69
7.	4	6	200	70-81
8.	3	7	200	82-90
9.	2	8	200	91-97
10.	1	9	200	98-104
11.	0	10	200	105-113

Eluat hasil kromatografi kolom yang ditampung dalam vial dengan volume lebih kurang 20 mL tersebut kemudian diuji dengan KLT. Eluat dengan pola noda yang sama digabung sehingga diperoleh beberapa kelompok fraksi. Dari pengelompokan tersebut ternyata pada fraksi F terdapat noda tunggal. Setelah dilakukan *Sianidin test* ternyata fraksi F positif mengandung flavonoid dengan perubahan larutan dari warna kuning menjadi jingga kemerahan.

Hasil elusi fraksi F dengan berbagai variasi kepolaran eluen menunjukkan bahwa fraksi F belum murni. Hal ini ditandai dengan timbulnya noda lain pada plat KLT. Pada fraksi F kemudian ditambahkan n-heksan. Bagian yang larut dengan n-heksan (F_1) dipisahkan dari bagian yang tak larut. Bagian yang tak larut kemudian ditambah dengan etil asetat. Bagian yang larut dengan etil asetat (F_2) dipisahkan dari bagian yang tak larut. Bagian yang tak larut kemudian ditambah dengan metanol (F_3). Kemudian pada F_1 , F_2 , dan F_3 dilakukan analisis KLT dan diperoleh noda tunggal pada F_2 . Elusi dengan berbagai variasi kepolaran eluen

dan pengujian dengan pengungkap noda I₂ pada F₂ menunjukkan bahwa noda yang dihasilkan tetap tunggal. Analisis KLT kelompok fraksi hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Analisis KLT kelompok fraksi hasil kromatografi kolom

No.	Fraksi	Vial	Kromatogram pada UV 254 nm
1.	A	1-12	1 noda <i>tailing</i>
2.	B	13-14	2 noda <i>tailing</i>
3.	C	15-16	2 noda <i>tailing</i>
4.	D	17-18	3 noda <i>tailing</i>
5.	E	19-23	1 noda <i>tailing</i>
6.	F	24-25	1 noda bulat
7.	G	26-40	2 noda <i>tailing</i>
8.	H	41-54	1 noda <i>tailing</i>
9.	I	55-67	1 noda <i>tailing</i>
10.	J	68-80	1 noda <i>tailing</i>
11.	K	81-91	1 noda <i>tailing</i>
12.	L	92-103	2 noda <i>tailing</i>
13.	M	104-113	2 noda <i>tailing</i>

Nilai R_f senyawa hasil isolasi pada F₂ dengan berbagai variasi kepolaran eluen dapat dilihat pada Tabel 6.

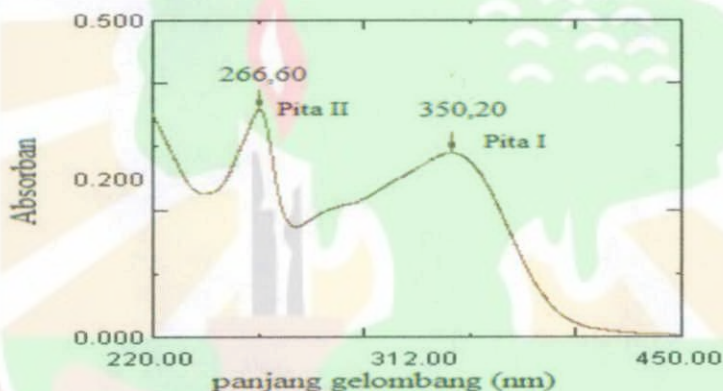
Tabel 6. Nilai R_f senyawa hasil isolasi dengan berbagai variasi eluen

No.	Eluen	R _f
1.	etil asetat : metanol (9:1)	0,56
2.	etil asetat : metanol (8:2)	0,69
3.	etil asetat : metanol (7:3)	0,75

4.3 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Siamidin test pada F_2 menunjukkan positif flavonoid dengan terjadinya perubahan warna larutan dari kuning menjadi jingga kemerahan. Sementara uji fenolik pada F_2 juga positif mengandung fenolik dengan perubahan warna larutan dari kuning menjadi hijau tua. Senyawa hasil isolasi dari F_2 yang diperoleh adalah padatan berwarna kuning dengan titik leleh 228 – 230 °C dan berat 11,1 mg. Dari hasil pengukuran titik leleh tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi telah murni.

Dari pengukuran spektrum UV senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol diperoleh dua pita serapan. Pita I pada λ_{maks} 350,20 nm dengan nilai absorban 0,290 dan pita II pada λ_{maks} 266,60 nm dengan nilai absorban 0,358 yang dapat dilihat pada Gambar 17.

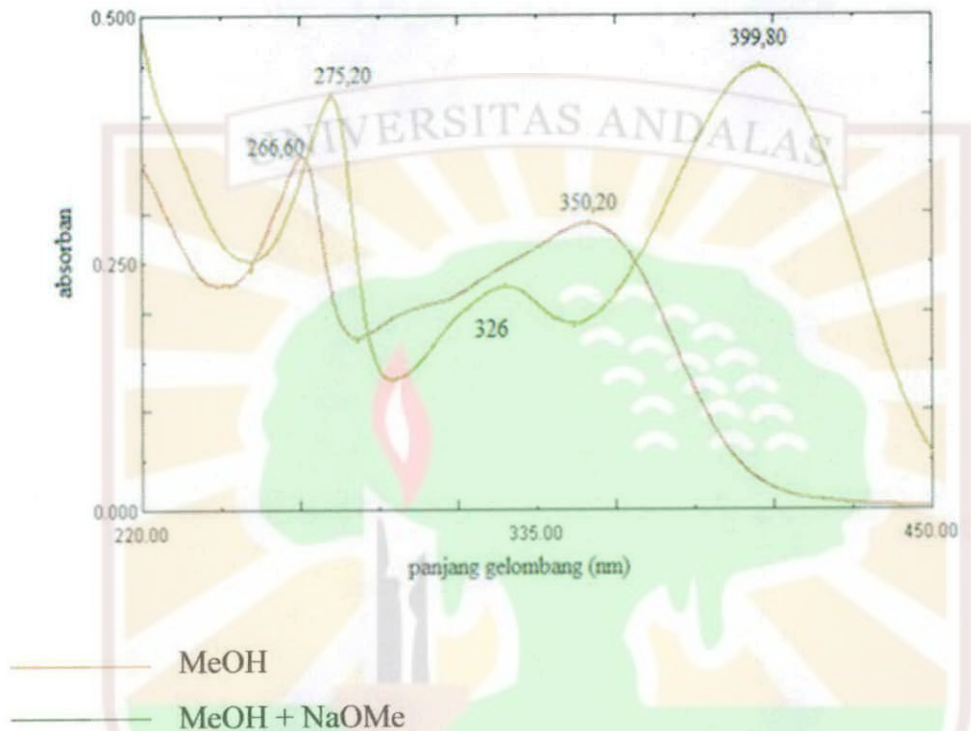


Gambar 17. Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol

Berdasarkan pita serapan pada Gambar 17 diatas, menurut Markham, apabila rentang panjang gelombang pita I 330-360 nm dan pita II 250-280 nm, maka dapat diduga bahwa flavonoid hasil isolasi adalah golongan flavonol dimana H dari OH yang terikat pada atom C_3 , tersubstitusi (bukan OH bebas).²⁰ Hal ini juga dibuktikan dengan penambahan pereaksi geser NaOMe, tidak terjadi pergeseran batokromik yang intensitas serapannya turun. Namun yang terjadi adalah pergeseran batokromik sebesar 49,6 nm pada pita I dengan intensitas serapan naik. Ini menandakan adanya OH bebas pada C_4 (bukan pada C_3).²⁰ Munculnya puncak serapan pita I pada 350,20 nm menandakan adanya ikatan $C=O$ yang berkonjugasi dengan cincin aromatis pada flavonoid. Sementara

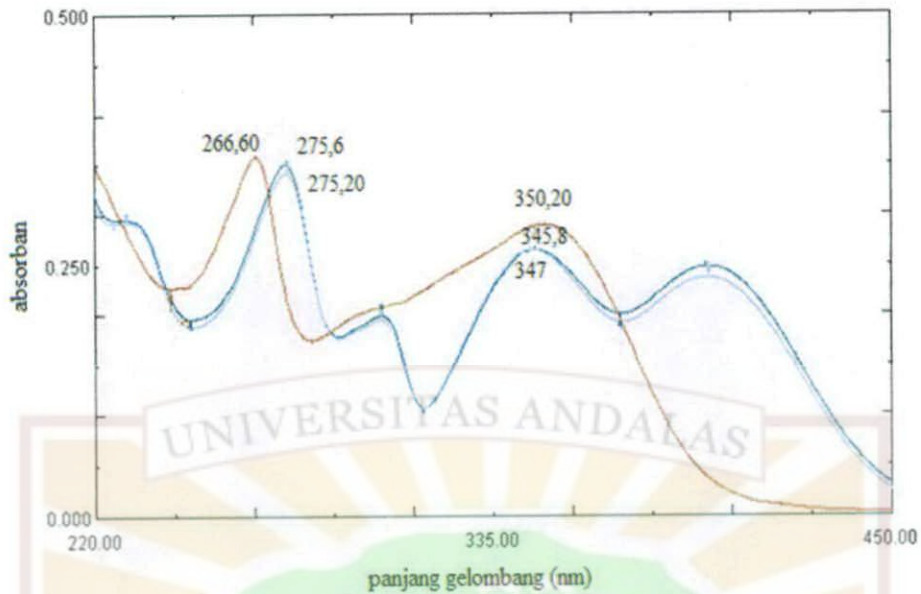
munculnya puncak serapan pita II pada 266,6 nm menandakan adanya ikatan C=C aromatis yang berkonjugasi pada flavonoid.^{20,21}

Penambahan NaOMe juga menyebabkan munculnya pita baru pada 326 nm yang menandakan adanya gugus OH bebas pada C₇.^{20,22} Spektrum UV-Vis dengan pereaksi geser NaOMe dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOMe

Penambahan AlCl₃ menyebabkan pergeseran hipsokromik pada pita I dari λ_{maks} 350,20 nm menjadi 347 nm dengan nilai absorban 0,264. Pada pita II terjadi pergeseran batokromik dari 266,60 nm menjadi 275,20 nm dengan nilai absorban 0,350. Penambahan AlCl₃ – HCl menyebabkan pergeseran hipsokromik pada pita I dari λ_{maks} 350,20 nm menjadi 345,80 nm dengan nilai absorban 0,264. Pada pita II terjadi pergeseran batokromik dari λ_{maks} 266,0 menjadi 275,60 nm dengan nilai absorban 0,342. Pergeseran hipsokromik pada pita I setelah penambahan AlCl₃ dan AlCl₃ – HCl menandakan tidak adanya gugus orto di-OH pada inti benzen.²⁰ Spektrum ini dapat dilihat pada Gambar 19.

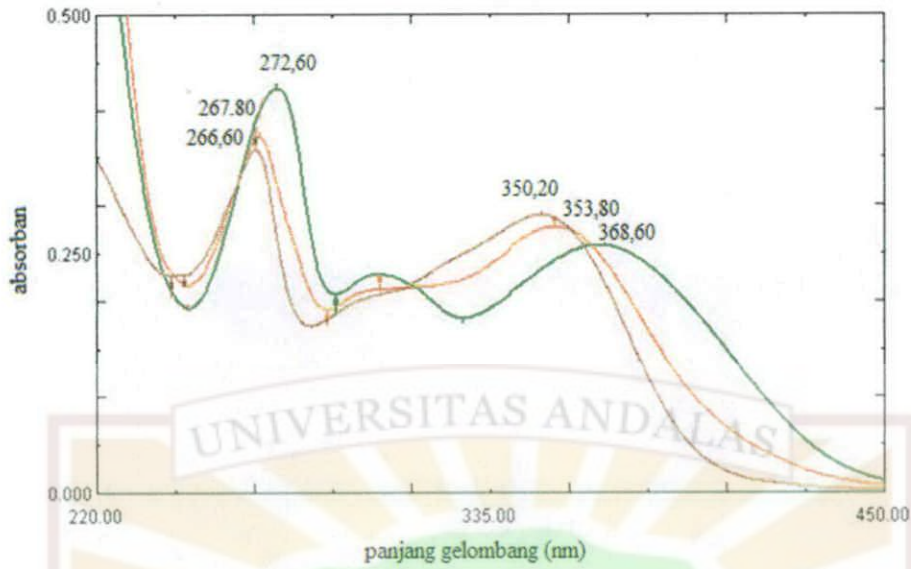


- MeOH
- MeOH + AlCl₃
- MeOH + AlCl₃ - HCl

Gambar 19. Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser AlCl₃ dan AlCl₃ - HCl

Penambahan NaOAc menyebabkan pergeseran batokromik pada pita I dan II. Pita I bergeser dari λ_{maks} 350,20 nm menjadi 368,60 nm dengan nilai absorban 0,258. Pita II bergeser dari λ_{maks} 266,60 nm menjadi 272,60 nm dengan nilai absorban 0,422. Pergeseran batokromik sebesar 6 nm pada pita II menandakan adanya gugus OH bebas pada atom C₇.²⁰

Penambahan NaOAc - H₃BO₃ juga menyebabkan pergeseran batokromik pada pita I dan II. Pita I bergeser dari λ_{maks} 350,20 nm menjadi 353,80 nm dengan nilai absorban 0,277. Pada pita II terjadi pergeseran dari λ_{maks} 266,60 nm menjadi 267,80 nm dengan absorban 0,371. Pergeseran yang tidak terlalu berarti pada pita I menandakan tidak adanya gugus orto di-OH pada inti benzen.^{20,23} Spektrum ini dapat dilihat pada Gambar 20.



- MeOH
- MeOH + NaOAc
- MeOH + NaOAc - H₃BO₃

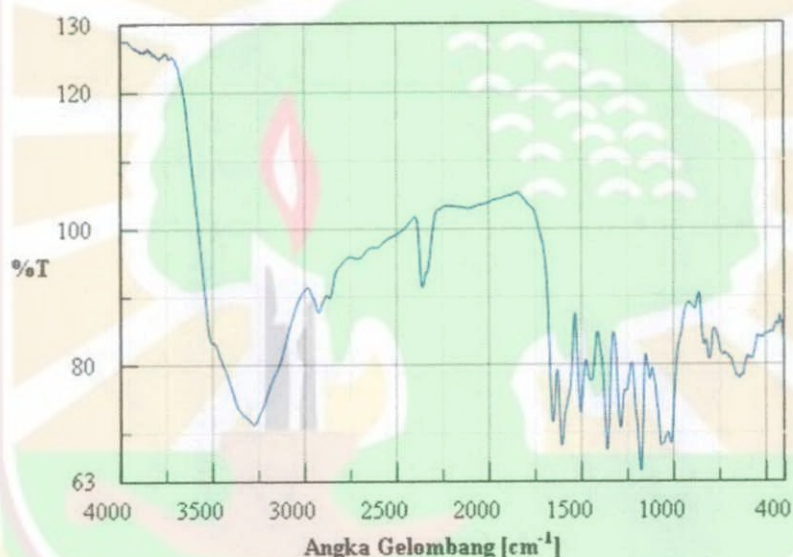
Gambar 20. Spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi dengan pereaksi geser NaOAc dan NaOAc - H₃BO₃

Data pergeseran absorpsi spektrum UV-Vis dari senyawa hasil isolasi setelah penambahan pereaksi geser dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Data pergeseran absorpsi spektrum UV-Vis senyawa hasil isolasi setelah penambahan pereaksi geser

No.	Pereaksi Geser	λ (nm)		Besarnya Pergeseran λ (nm)	
		Pita I	Pita II	Pita I	Pita II
1.	MeOH (pelarut)	350,20	266,60	-	-
2.	MeOH + NaOMe	399,80	275,20	+49,6	+8,6
3.	MeOH + AlCl ₃	347,00	275,20	-3,2	+8,6
4.	MeOH + AlCl ₃ + HCl	345,80	275,60	-4,8	+9
5.	MeOH + NaOAc	368,60	272,60	+18,4	+6
6.	MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	353,80	267,80	+3,6	+1,2

Karakterisasi senyawa hasil isolasi dengan FTIR memperlihatkan beberapa serapan penting antara lain pada angka gelombang 3276 cm^{-1} yang spesifik untuk serapan OH yang didukung oleh adanya serapan C-O alkohol pada angka gelombang 1178 cm^{-1} ; angka gelombang 2923 cm^{-1} yang menunjukkan adanya regangan C-H aromatik; angka gelombang 1655 cm^{-1} yang menunjukkan adanya regangan C=O karbonil; dan angka gelombang 1607 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus C=C aromatik. Pita serapan OH yang tidak terlalu mulus tersebut disebabkan karena kemungkinan senyawa hasil isolasi masih mengandung pelarut ketika akan dikarakterisasi dengan FTIR. Hasil karakterisasi dengan spektroskopi inframerah dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi

Dari uraian data UV dan inframerah serta perbandingan data dari literatur dapat diperkirakan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi adalah golongan flavonol dimana H dari OH yang terikat pada atom C₃, tersubstitusi. Senyawa hasil isolasi juga mempunyai gugus OH bebas pada atom C₇ dan C₄.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

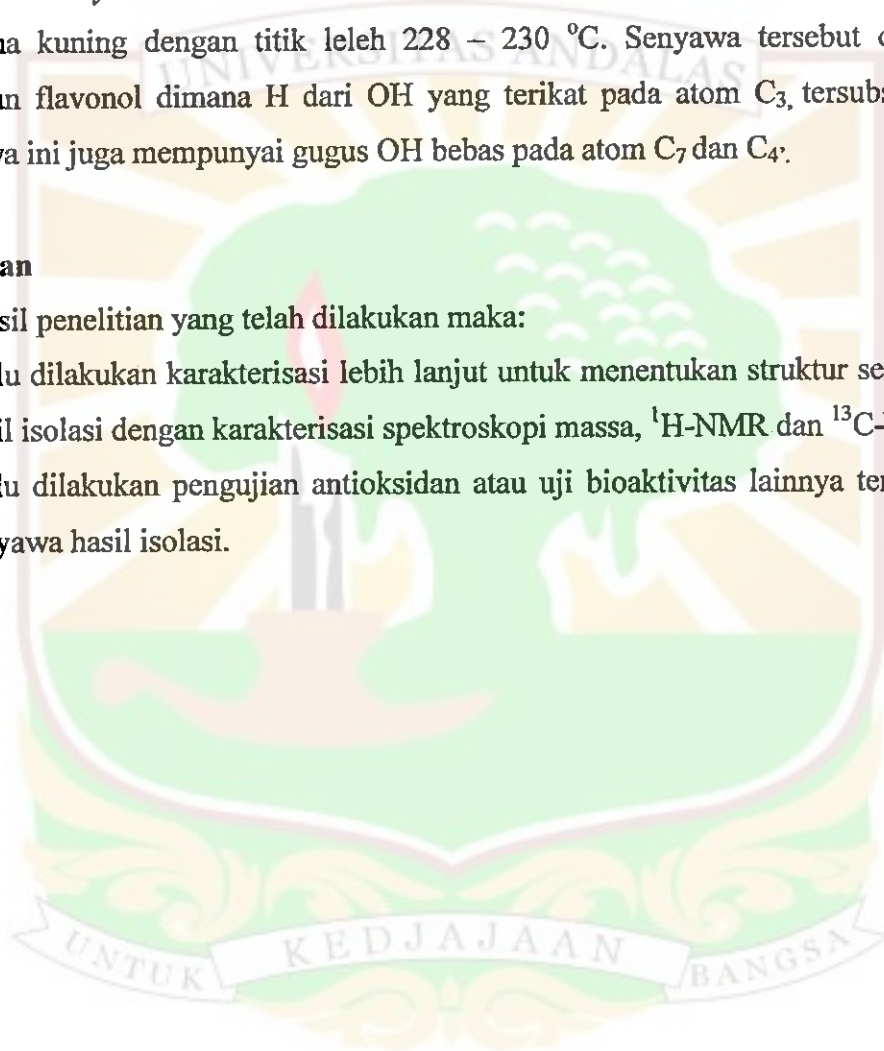
5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol paling besar dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksan. Senyawa hasil isolasi dari ekstrak metanol adalah berupa padatan berwarna kuning dengan titik leleh 228 – 230 °C. Senyawa tersebut diduga golongan flavonol dimana H dari OH yang terikat pada atom C₃, tersubstitusi. Senyawa ini juga mempunyai gugus OH bebas pada atom C₇ dan C₄.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka:

1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan struktur senyawa hasil isolasi dengan karakterisasi spektroskopi massa, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.
2. Perlu dilakukan pengujian antioksidan atau uji bioaktivitas lainnya terhadap senyawa hasil isolasi.



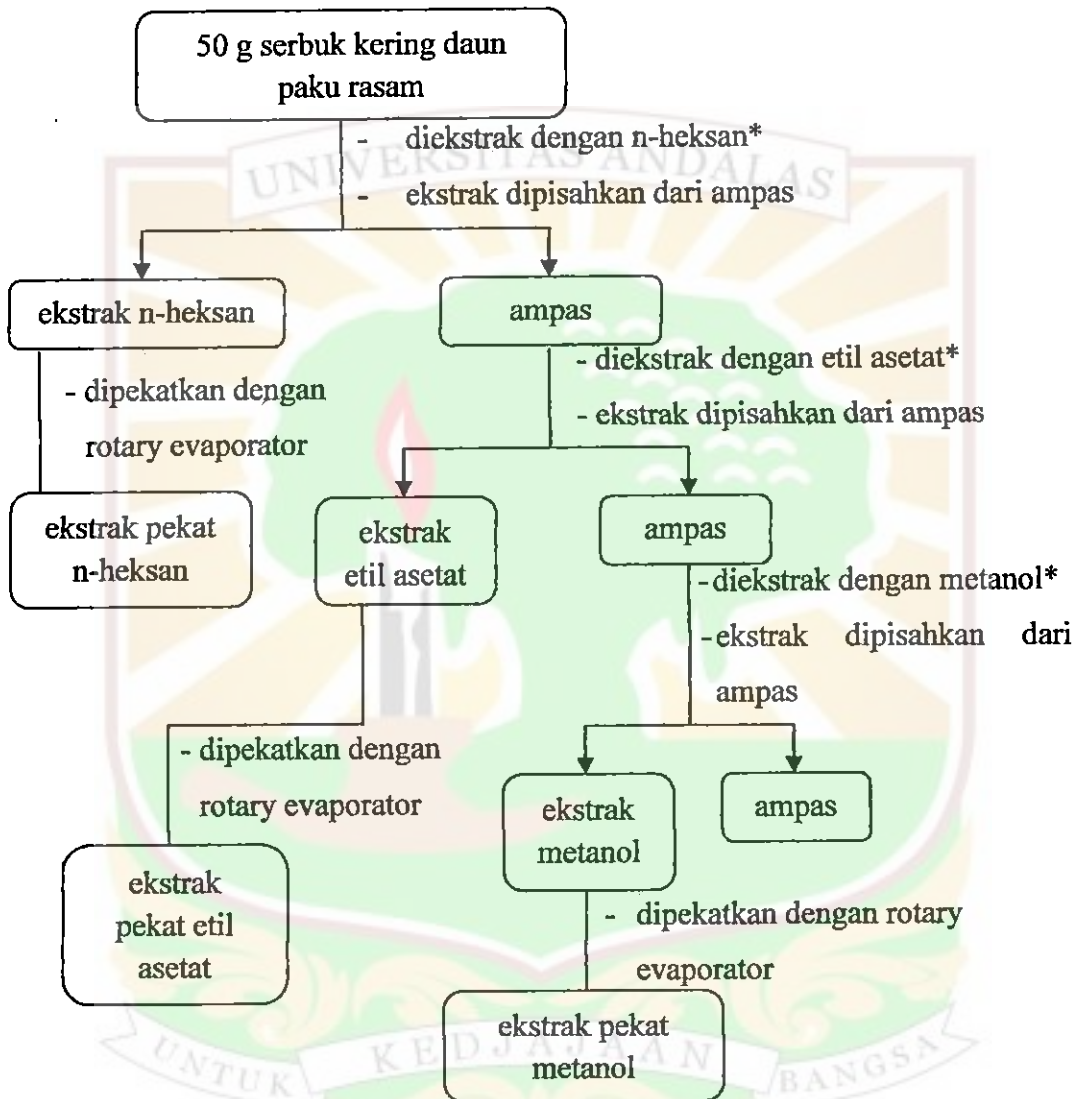
DAFTAR PUSTAKA

1. Johnston, M. *et al.* *A review of the south-east Queensland bush harvested floricultural species*. The University of Queensland. Australia. 2004. 122-123.
2. Zakaria, Z.A. *et al.* In vitro cytotoxic and antioxidant properties of the aqueous, chloroform and methanol extracts of *Dicranopteris linearis* leaves. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10 (2). 2010. 273-282.
3. Zakaria, Z.A. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *Dicranopteris linearis* leaves in experimental animal models. *J. Nat Med.* Vol 62. 2008. 179-187.
4. Raja, D.P. *et al.* Chemical and chemotaxonomical studies on *Dicranopteris* species. *Chem. Pharm. Bull.* Vol. 43 (10).1995. 1800-1803.
5. Suryana. Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Paku Terrestrial dan Epifit di Kawasan PLTP Kamojang Kab. Garut Jawa Barat. *Jurnal Biotika*. Vol 7 (1). 2009. 20-26.
6. Darma, I.D.P dan Peneng, I.N. Inventarisasi Tumbuhan Paku di Kawasan Taman Nasional Laiwangi-Wanggameti Sumba Timur, Waingapu, NTT. *Biodiversitas*. Vol. 8 (3). 2007. 242-248.
7. Xiao-Li Li. *et al.* Terpenoids from two *Dicranopteris* species. *Helvetica Chimica Acta*. Vol. 91. 2008. 856-861.
8. Darus, F.M *et al.* Fern tree (*Gleichenia linearis*) as metal sorbent for lead ions removal. *Proceeding of 17th Analysis Chemistry Malaysia Symposium*. 2004. 694-698.
9. Jaganath, I.B and Crozier, A. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*, edited by Cesar G. Fraga. John Wiley & Sons, Inc. 2010. 5-21.
10. Davies, K.M and K.E. *Molecular Biology and Biotechnology of Flavonoid Biosynthesis in Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application* edited by Ø.M. Andersen and K.R. Markham. CRC Press Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW. 2006. 145-150.
11. Lenny, S. Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp. *USU Repository*. 2006. 4-6.
12. Tesso, H. *Isolation and Structure Elucidation of Natural Products from Plants*. Dissertation. University of Hamburg. 2005. 15-16.
13. Bell, C.E. *et al.* *Organic Chemistry Laboratory: Standard and Microscale Experiment*; 2nd edition. Saunders College Publishing, San Diego, CA. 1997. 17-23.

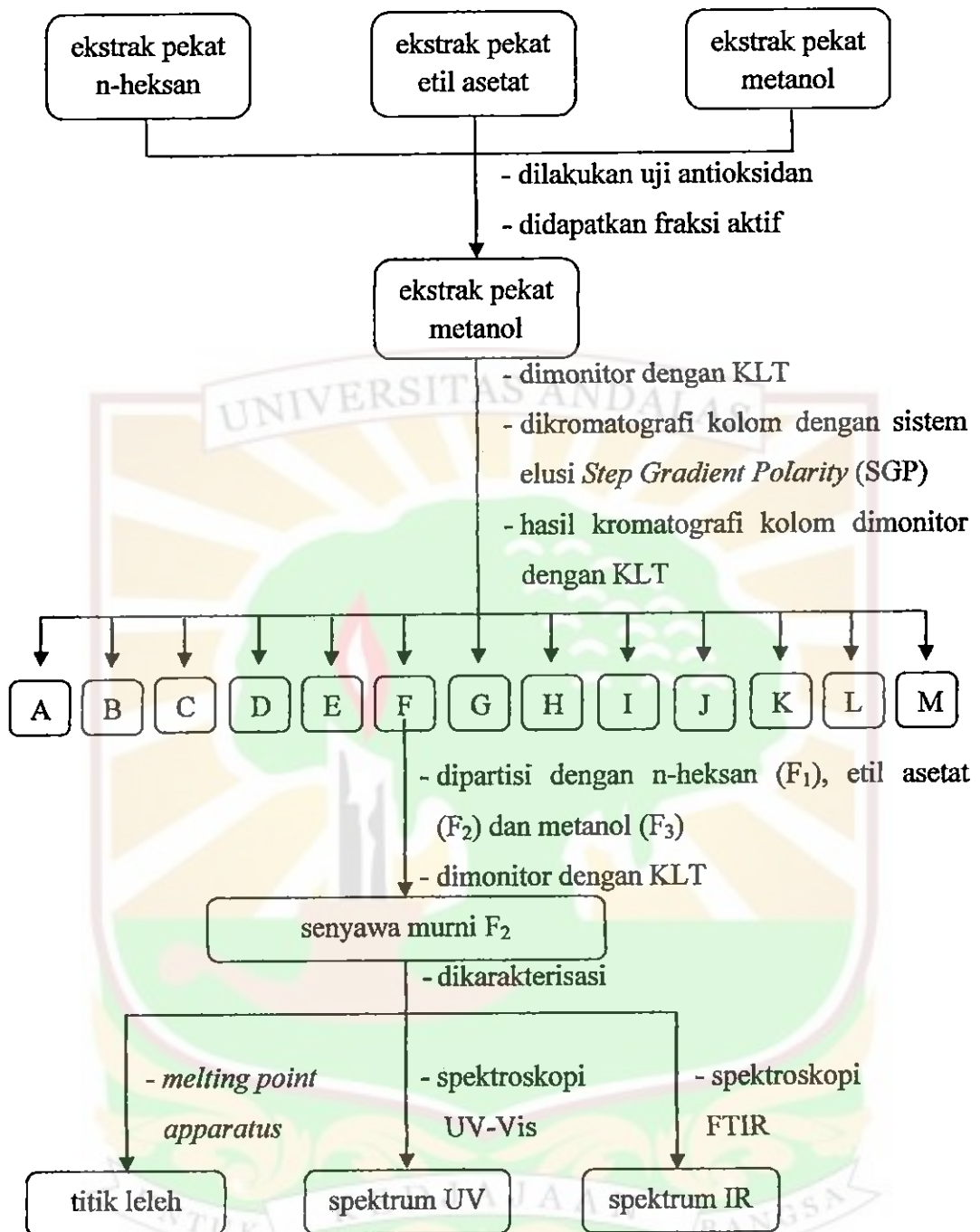
14. McMurry, J. *Organic Chemistry Seventh Edition*. Thomson Learning, Inc. Belmont, CA, USA. 2008. 422-425, 500-502.
15. Buhler, D.R and Miranda, C. *Antioxidant Activities of Flavonoids*. Department of Environmental and Molecular Toxicology, Oregon State University. 2000. (<http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html>, diakses tanggal 12/04/2012).
16. Art Presser. *Antioxidants: Our Defense Against Free Radicals*. Huntington College of Health Sciences. 2009. 1-4.
17. Prakash, A. *et al. Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories, 9000 Plymouth Ave North, Minneapolis, Minnesota 55427. (http://www.medlabs.com/Downloads/Antiox_acti_.pdf, diakses tanggal 12/04/2012).
18. Sasidharan, S. *et al. In Vitro Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effects of Lentinula edodes against Paracetamol-Induced Hepatotoxicity. Molecules*. Vol. 15. 2010. 4478-4489.
19. Kuncahyo, I dan Sunardi. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi, L*) terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH). *Seminar Nasional Teknologi*. 2007.
20. Markham, K.R. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, terjemahan K. Padmawinata. ITB. Bandung. 1981. 39-47.
21. Adfa, M. Isolasi Senyawa Flavonoid Aktif Berkhasiat Sitotoksik Dari Daun Kemuning (*Murraya paniculata L. Jack*). *Jurnal Gradien*. Vol. 3 (2). 2007. 262-266.
22. Wijono, S.H. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid Pada Daun Katu (*Sauropus androgynus (L.) Merr*). *Makara Sains*. Vol. 7 (2). 2003. 51-64.
23. Astiti, A dan Setiawan, M.A. Senyawa golongan flavonoid pada ekstrak n-butanol kulit batang bungur (*Lagerstroemia speciosa Pers.*). *Jurnal Kimia FMIPA Universitas Udayana*. Bukit Jimbaran. Vol. 2 (2). 2008. 111-116.
24. Andayani, R. *et. al. Penentuan aktivitas antioksidan, kadar fenolat total dan likopen pada buah tomat (Solanum lycopersicum L)*. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol. 13 (1). 2008. 31-37.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak aktif daun paku rasam sebagai antioksidan

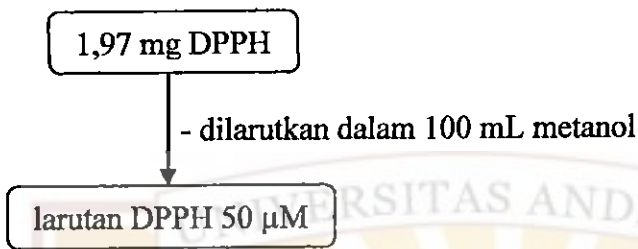


Keterangan: * dilakukan sampai 6 kali, masing-masing ekstrak kemudian digabung menjadi satu

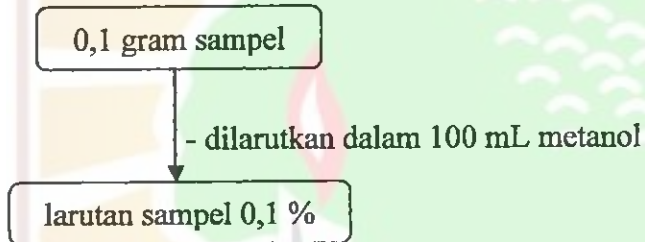


Lampiran 2. Skema kerja uji antioksidan terhadap ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam

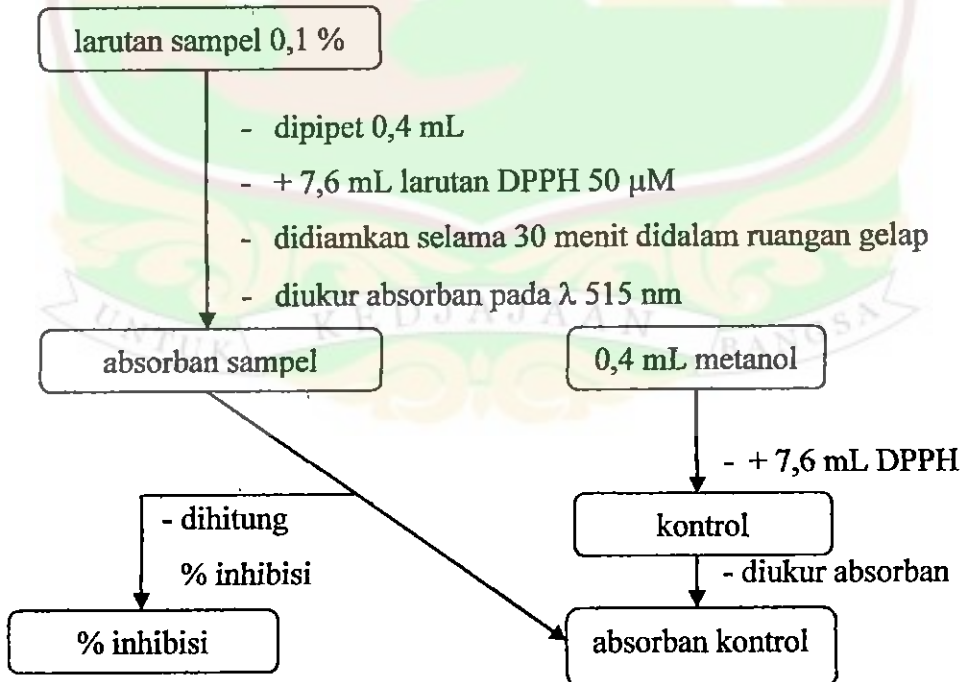
a. Pembuatan larutan DPPH



b. Pembuatan larutan sampel



c. Pengujian antioksidan



Lampiran 3. Perhitungan persen inhibisi aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol dari daun paku rasam

Rumus:

$$\text{persen inhibisi} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

a. larutan sampel ekstrak n-heksan 0,1 %

$$\text{persen inhibisi} = \frac{0,250 - 0,247}{0,250} \times 100 \% = 1,2 \%$$

b. larutan sampel ekstrak etil asetat 0,1 %

$$\text{persen inhibisi} = \frac{0,250 - 0,112}{0,250} \times 100 \% = 55,2 \%$$

c. larutan sampel ekstrak metanol 0,1 %

$$\text{persen inhibisi} = \frac{0,250 - 0,016}{0,250} \times 100 \% = 93,6 \%$$