

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Penentuan Struktur Senyawa Hasil Pemisahan

Fraksi *n*-heksana:etil asetat (1:3) daun *Cryptocarya ferrea* dipisahkan dengan menggunakan kromatografi vakum cair (KVC) dan kromatografi radial (kromatotron) menghasilkan satu senyawa isolat murni. Penentuan struktur terhadap senyawa hasil isolasi ditentukan dengan menganalisis data spektrum UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR.

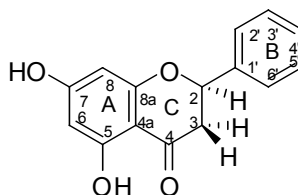
Senyawa isolat I (14,2 mg) yang diperoleh berupa kristal putih. Senyawa ini diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV (Lampiran 5). Data spektrum UV senyawa isolat menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 217 nm dan 285 nm. Panjang gelombang 217 nm adalah panjang gelombang yang dimiliki pelarut (metanol), sedangkan panjang gelombang maksimum senyawa isolat adalah pada 285 nm (50 ppm, metanol). Pada spektrum UV ini hanya terdeteksi pita II saja. Hal ini menandakan adanya gugus kromofor benzoil ( $\lambda$  270-290 nm) sehingga dapat diidentifikasi bahwa senyawa isolat adalah senyawa golongan senyawa flavanon atau senyawa flavan. Kemudian senyawa isolat ditambahkan dengan pereaksi geser NaOH 0,1 M dan terjadi pergeseran batokromik, yaitu panjang gelombang senyawa isolat menjadi 332 nm. Hal ini menandakan adanya gugus –OH bebas pada senyawa isolat.

Senyawa isolat ini kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektroskopi IR (Lampiran 6). Data spektrum IR (KBr) menunjukkan adanya beberapa gugus fungsi, antara lain serapan untuk regang ikatan -OH yang menunjukkan -OH yang mengalami ikatan hidrogen ( $V_{max}$  3400  $\text{cm}^{-1}$ ), serapan untuk regang ikatan -C-H aromatik ( $V_{max}$  3085,27  $\text{cm}^{-1}$ ), serapan untuk regang ikatan -C=O yang menunjukkan -C=O keton yang mengalami ikatan hidrogen dengan -OH pada C-5 ( $V_{max}$  1631,85  $\text{cm}^{-1}$ ), serapan untuk regang ikatan -C=C aromatik ( $V_{max}$  1589,41  $\text{cm}^{-1}$ ), serapan untuk regang ikatan -C-O ( $V_{max}$  1256,68  $\text{cm}^{-1}$ ), dan tekuk ikatan -C-H metil dan metilen ( $V_{max}$  2924,21  $\text{cm}^{-1}$  dan 1434,14  $\text{cm}^{-1}$ ).

Data spektrum  $^1\text{H-NMR}$  (Lampiran 7) menghasilkan dua sinyal proton singlet (s) pada pergeseran kimia ( $\delta_{\text{H}}$ ) 11,97 ppm menunjukkan sinyal proton gugus -OH yang memiliki ikatan hidrogen dengan -C=O pada posisi 4 (1H, 5-OH) ; 5,97 ppm menunjukkan sinyal proton H-6 dan H-8. Tiga sinyal proton dengan multiplisitas doublet doublet (dd) pada  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm menunjukkan sinyal proton H-2 yang memiliki kopling dengan H-3 pada  $\delta_{\text{H}}$  2,71 dan 3,00 (1H,  $J = 10,3$  Hz, 13,15 Hz) ; 2,71 ppm (1H,  $J = 16,75$  Hz) menunjukkan sinyal proton H-3 (*cis*) ; 3,00 ppm (1H,  $J = 17,2$  Hz) menunjukkan sinyal proton H-3 (*trans*). H-3 memiliki kopling visinal pada  $\delta_{\text{H}}$  5,35 (H-2) dan memiliki kopling geminal. Pada spektrum ini juga memiliki sinyal proton dengan multiplisitas multiplet (*m*) pada  $\delta_{\text{H}}$  7,35 - 7,38 ppm yang menunjukkan proton aromatik pada cincin B (5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6').

Data spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR (Lampiran 8) menghasilkan 15 sinyal karbon yang meliputi satu metilen, delapan metin dan 6 atom karbon kuartener. Sinyal karbon metilen pada pergeseran kimia ( $\delta_{\text{C}}$ ) 43,13 ppm (posisi C-3). Sinyal karbon metin pada  $\delta_{\text{C}}$ 78,92 ppm (posisi C-2),  $\delta_{\text{C}}$ 95,42 ppm (posisi C-8),  $\delta_{\text{C}}$ 96,91 ppm (posisi C-6),  $\delta_{\text{C}}$ 125,98 ppm (posisi C-2', C-6'),  $\delta_{\text{C}}$ 128,53 ppm (posisi C-4'), dan  $\delta_{\text{C}}$ 128,63 ppm (posisi C-3', C-5'). Sinyal karbon kuartener pada  $\delta_{\text{C}}$ 102,49 ppm (posisi C-4a),  $\delta_{\text{C}}$ 138,36 ppm (posisi C-1'),  $\delta_{\text{C}}$ 162,88 ppm (posisi C-8a),  $\delta_{\text{C}}$ 164,12 ppm (posisi C-5),  $\delta_{\text{C}}$ 166,15 ppm (posisi C-7), dan  $\delta_{\text{C}}$ 195,37 ppm (posisi C-4, -C=O).

Berdasarkan data analisis yang ada, maka struktur senyawa isolat diduga merupakan senyawa 5,7-dihidroksiflavanon atau senyawa pinosembrin.



**Gambar 26.** Struktur Senyawa Isolat: Pinosembrin

Untuk memperkuat dugaan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa pinosembrin, maka data spektrum  $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR dibandingkan dengan data literatur senyawa pinosembrin yang telah diisolasi dari *Boesenbergia rotunda* (Tabel 1 dan Tabel 2).

**Tabel 1.** Perbandingan  $^1\text{H-NMR}$  Senyawa Isolat dengan Literatur (Ching *et al.*, 2007)

Posisi H	Data Hasil Senyawa Isolat (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (ppm)	Data Literatur Senyawa 5,7-dihidroksiflavanon atau Pinosembrin (400 MHz, MeOD) (ppm)
2	5.33 (1H, <i>dd</i> , 13.15Hz)	5.33 (1H, <i>dd</i> , 12.84 Hz)
3- <i>cis</i>	2.71 (1H, <i>dd</i> , 16.75Hz)	2.67 (1H, <i>dd</i> , 16.96 Hz)
3- <i>trans</i>	3.00 (1H, <i>dd</i> , 17.2 Hz)	2.98 (1H, <i>dd</i> , 17.40 Hz)
5	11.97 (1H, <i>s</i> , 5-OH)	12.00 (1H, <i>s</i> , 5-OH)
6	5.97 (2H, <i>s</i> )	5.87 (2H, <i>d</i> )
8	5.97 (2H, <i>s</i> )	5.87 (2H, <i>d</i> )
2'-6'	7.35 - 7.38 (5H, <i>m</i> )	7.34 (5H, <i>m</i> )

**Tabel 2.** Perbandingan  $^{13}\text{C-NMR}$  Senyawa Isolat dengan Literatur (Ching *et al.*, 2007)

Posisi C	Data Hasil Senyawa Isolat (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (ppm)	Data Literatur Senyawa 5,7-dihidroksiflavanon atau Pinosembrin (100 MHz, MeOD) (ppm)
2	78.92	80.4
3	43.12	44.1
4	195.37	197.3
4a	102.49	103.3
5	164.12	165.4
6	96.61	96.2
7	166.15	168.3
8	95.42	97.2
8a	162.88	164.6
1'	138.36	140.3
2',6'	125.97	127.3
3',4',5'	128.63-128.54	129.6-129.7

Hasil perbandingan data  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  menunjukkan pergeseran kimia yang hampir sama antara data senyawa isolat dengan data literatur sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa isolat merupakan senyawa 5,7-dihidroksiflavanon atau pinosembrin.

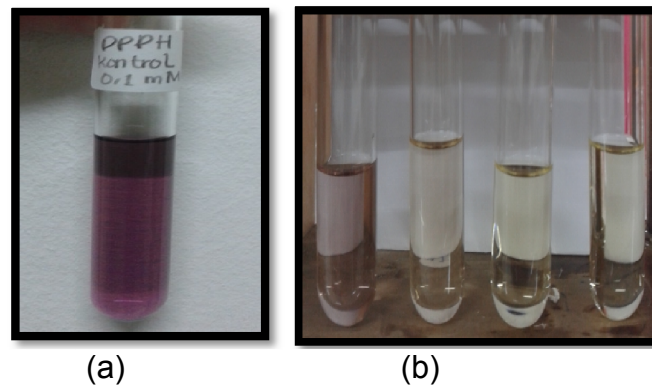
## **B. Uji Aktivitas Antioksidan**

### **1. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode DPPH**

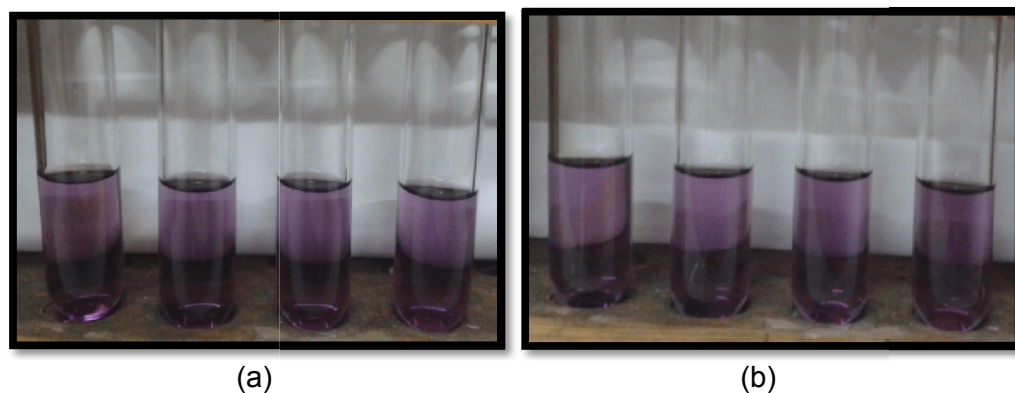
Metode DPPH merupakan suatu metode uji aktivitas antioksidan yang paling sering digunakan karena sederhana, mudah, cepat, sensitif, dan hanya membutuhkan sedikit sampel. Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan terhadap senyawa hasil isolasi metabolit sekunder dari fraksi *n*-heksana:etil asetat (1:3).

Proses pada metode ini, 1 mL senyawa isolat dan standar yang direaksikan dengan 3 mL DPPH 0,1mM mengalami perubahan warna larutan setelah dilakukan inkubasi selama 30 menit. Perubahan warna dari ungu pekat menjadi kuning terjadi akibat radikal DPPH bereaksi dengan senyawa isolat atau standar tersebut. Senyawa isolat dan standar yang berperan sebagai antioksidan tersebut akan mendonasikan elektronnya kepada radikal 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yang berwarna ungu sehingga radikal tersebut menjadi senyawa dalam bentuk yang lebih stabil, yakni 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) yang berwarna kuning. Kemudian diukur intensitas

warna larutan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang ( $\lambda$  517 nm). Semakin banyak elektron dari senyawa yang berikatan dengan DPPH maka intensitas warna akan semakin menurun. Hal inilah yang menunjukkan bahwa semakin cerah warna larutan, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidan dari senyawa isolat tersebut.



**Gambar 27.** Intensitas Warna Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH : (a) Larutan DPPH (Kontrol) ; (b) Larutan DPPH + BHT Setelah Inkubasi



**Gambar 28.** Intensitas Warna Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH : (a) Larutan DPPH + Senyawa Isolat Sebelum Inkubasi ; (b) Larutan DPPH + Senyawa Isolat Setelah Inkubasi

Berdasarkan gambar di atas, dapat dilihat bahwa pada standar BHT mengalami perubahan warna yang signifikan setelah inkubasi. Hal ini menandakan banyaknya elektron dari standar yang berikatan dengan radikal DPPH, sedangkan pada senyawa isolat tidak terlihat perubahan warna yang signifikan. Hal ini diduga bahwa hanya sedikit elektron dari senyawa isolat yang berikatan dengan radikal DPPH. Data hasil pengukuran absorbansi ditunjukkan pada tabel 3.

**Tabel 3.** Data Absorbansi dan Aktivitas Antioksidan pada Metode DPPH

Larutan	Konsentrasi (ppm)	Abs		Abs rata-rata	Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH (%)
		A1	A2		
Kontrol				0.877	
Isolat I	12.5	0.65	0.65	0.650	25.88
	25	0.642	0.642	0.642	26.60
	50	0.628	0.628	0.628	28.39
	100	0.608	0.608	0.608	30.67
BHT	12.5	0.377	0.377	0.377	57.01
	25	0.327	0.326	0.327	62.77
	50	0.167	0.167	0.167	80.96
	100	0.06	0.06	0.060	93.16

Berdasarkan data yang diperoleh pada tabel 3, dapat dilihat bahwa semakin besar konsentrasi sampel, semakin rendah nilai absorbansinya. Nilai absorbansi yang rendah dari campuran reaksi menandakan terjadinya penangkapan aktivitas radikal yang tinggi (Gulcin, 2003). Penurunan nilai

absorbansi ini diakibatkan bereaksinya radikal DPPH dengan atom hidrogen yang terkandung dalam isolat sehingga DPPH menjadi senyawa non radikal.

Berdasarkan tabel di atas, terlihat juga bahwa aktivitas antioksidan

BHT > Senyawa Isolat

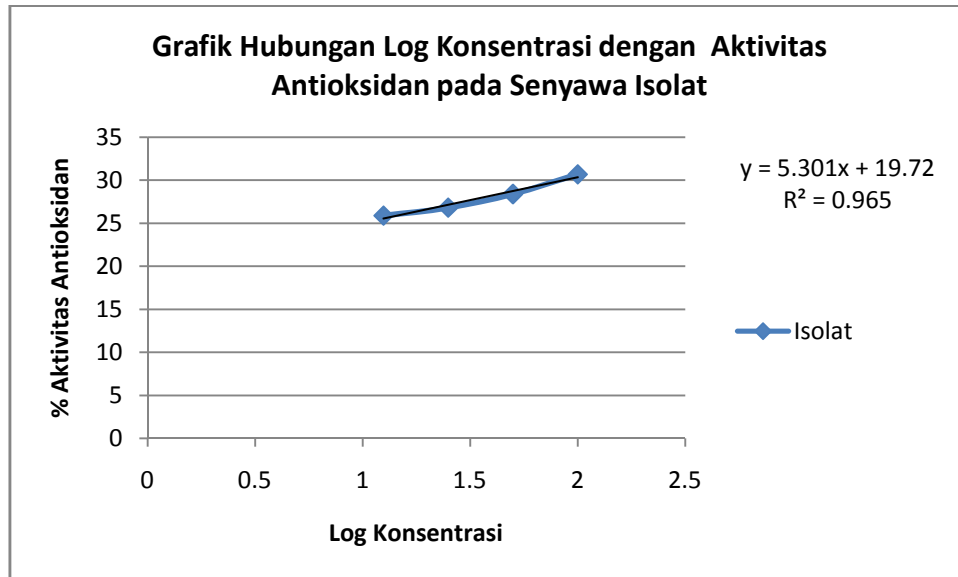
Aktivitas antioksidan dapat diketahui dari nilai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menandakan bahwa semakin besar potensi senyawa sebagai antioksidan. Kisaran kekuatan potensi antioksidan berdasarkan nilai  $IC_{50}$  terangkum pada tabel 4.

**Tabel 4.** Kisaran Kekuatan Potensi Antioksidan

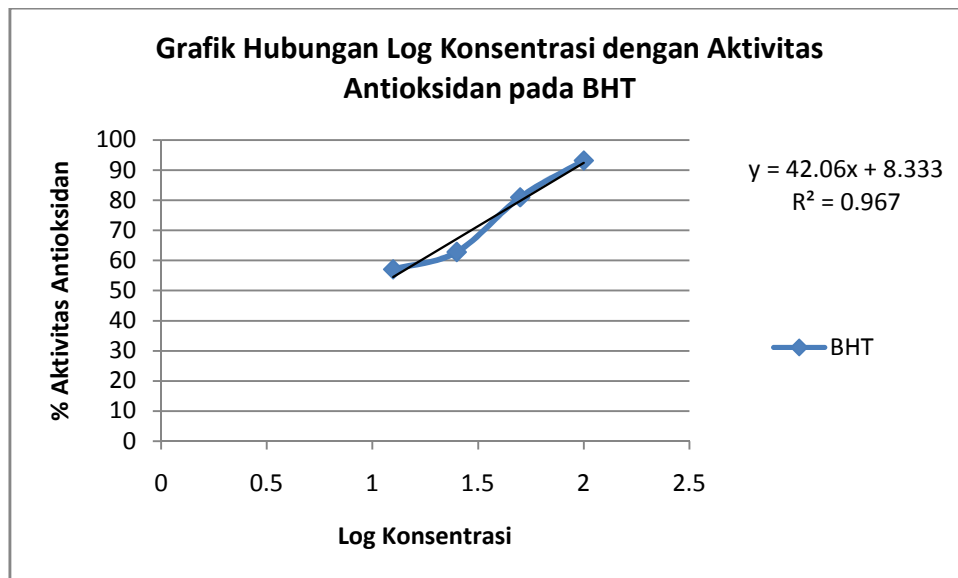
<b>Kisaran Nilai <math>IC_{50}</math></b>	<b>Kekuatan Potensi Antioksidan</b>
< 50	Sangat Kuat Berpotensi
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Tidak Berpotensi

Berdasarkan persamaan regresi yang didapat dari grafik hubungan antara persentase aktivitas antioksidan dengan konsentrasi, maka dapat diketahui nilai  $IC_{50}$  dari setiap larutan standar dan senyawa isolat, yaitu sebagai berikut:





**Gambar 29.** Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Aktivitas Antioksidan pada Senyawa Isolat



**Gambar 30.** Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Aktivitas Antioksidan pada BHT

Perbandingan nilai  $IC_{50}$  antara senyawa isolat dengan standar antioksidan ditunjukkan pada tabel 5.

**Tabel 5.** Perbandingan Nilai  $IC_{50}$  pada Isolat dan Standar pada Metode DPPH

<b>Sampel</b>	<b><math>IC_{50}</math> (ppm)</b>
Isolat (pinosembrin)	515382.64
BHT	9.79

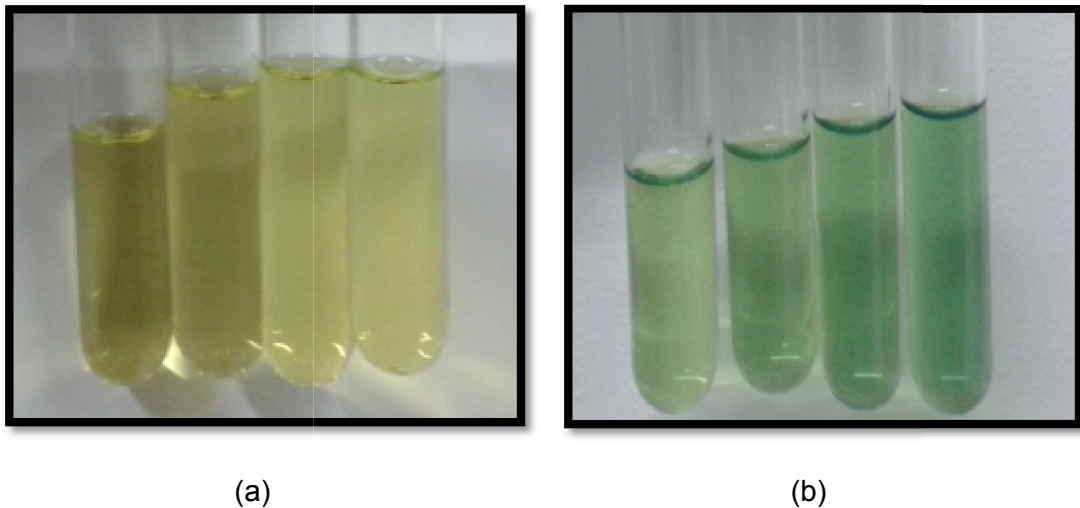
Berdasarkan data pada tabel di atas, dapat diketahui bahwa BHT memiliki potensi yang sangat kuat sebagai antioksidan ( $IC_{50} < 50$  ppm) sedangkan isolat tidak memiliki potensi sebagai antioksidan ( $IC_{50} > 200$  ppm).

## **2. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode *Reducing Power***

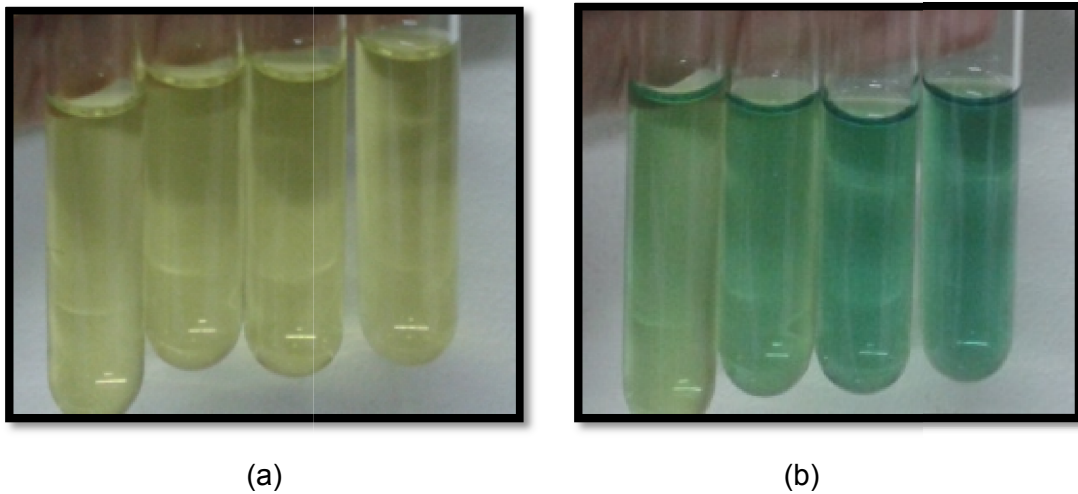
Uji aktivitas antioksidan yang kedua yakni dengan menggunakan metode *reducing power*. Metode ini dapat mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan yang potensial. Aktivitas antioksidan berkaitan dengan sifat reduksi yang dimiliki setiap standar dan senyawa isolat. Aktivitas antioksidan dari reduktor akan memecah rantai radikal dengan pemberian atom hidrogen. Adanya reduktan (antioksidan) dalam sampel yang diuji akan menghasilkan reduksi kompleks  $Fe^{3+}$  menjadi bentuk  $Fe^{2+}$  (Nurchayanti *et al.*, 2011).

Proses pada metode ini akan terbentuk kompleks berwarna hijau-biru (*Pearl's Prussian Blue*) setelah penambahan  $FeCl_3$  0,1%. Semakin pekat warna hijau-biru yang terbentuk, semakin besar nilai absorbansi, semakin

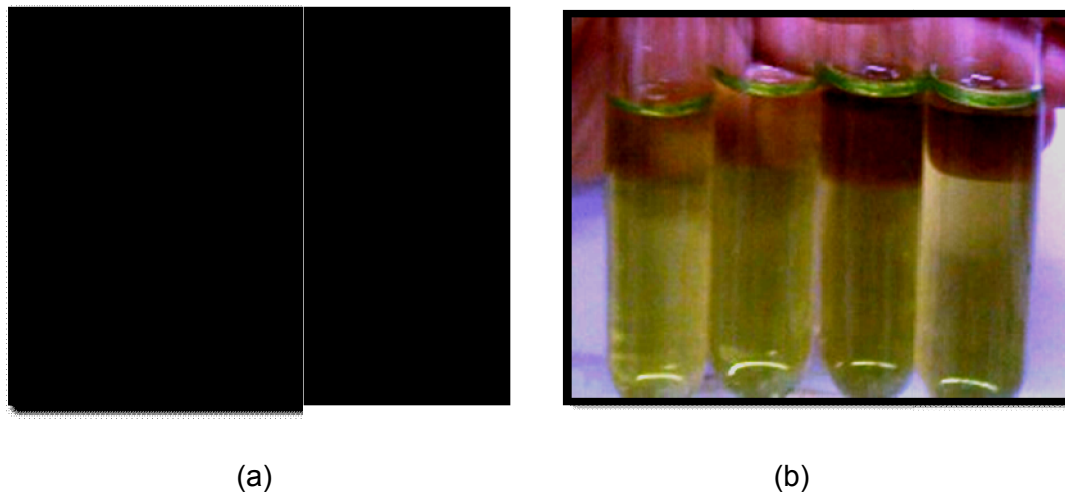
banyak pula kadar  $\text{Fe}^{3+}$  yang tereduksi menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ . Proses reduksi ini diakibatkan karena senyawa isolat yang berperan sebagai antioksidan mampu mendonorkan elektron sehingga membuat  $\text{Fe}^{3+}$  tereduksi. Kekuatan pereduksi dari senyawa antioksidan yang terkandung dalam sampel dapat ditentukan dengan mengukur pembentukan kompleks ini secara spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 700 nm.



**Gambar 31.** Intensitas Warna Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Reducing Power* : (a) Standar BHT Sebelum Penambahan  $\text{FeCl}_3$  ; (b) Standar BHT Setelah Penambahan  $\text{FeCl}_3$



**Gambar 32.** Intensitas Warna Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Reducing Power* : (a) Standar Asam Askorbat Sebelum Penambahan  $\text{FeCl}_3$  ; (b) Standar Asam Askorbat Setelah Penambahan  $\text{FeCl}_3$



**Gambar 33.** Intensitas Warna Larutan Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode *Reducing Power* : (a) Isolat Sebelum Penambahan  $\text{FeCl}_3$  ; (b) Isolat Setelah Penambahan  $\text{FeCl}_3$

Data pengukuran absorbansi dengan metode *reducing power* ditampilkan pada tabel 6.

**Tabel 6.** Data Absorbansi Uji Aktivitas Antioksidan pada Metode *Reducing Power*

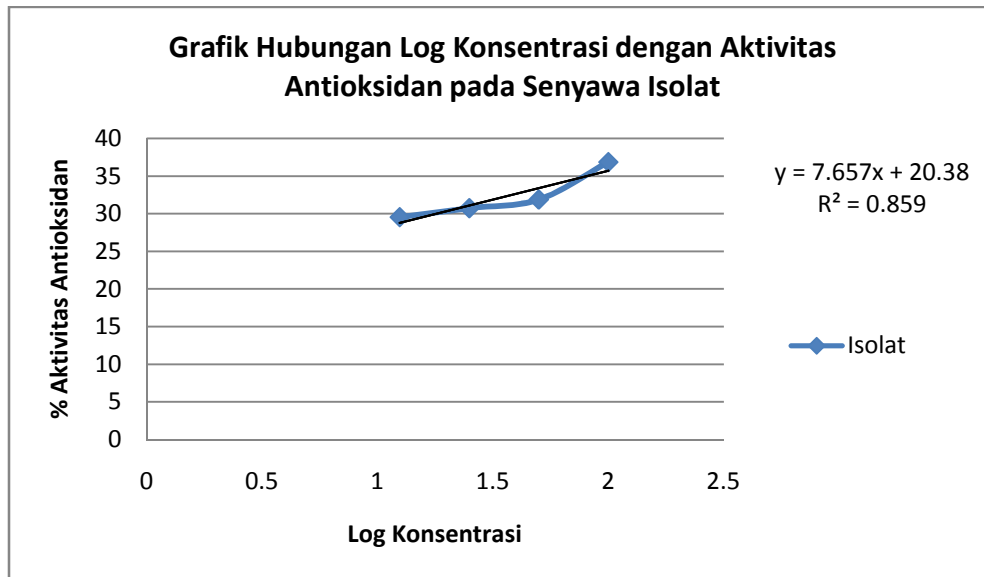
Larutan	Konsentrasi (ppm)	Abs		Abs rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)
		A1	A2		
Kontrol				0.186	
Isolat I	12.5	0.262	0.262	0.262	29.54
	25	0.27	0.27	0.270	30.72
	50	0.272	0.273	0.273	31.87
	100	0.297	0.297	0.297	36.84
BHT	12.5	0.27	0.271	0.271	31.49
	25	0.324	0.324	0.324	42.59
	50	0.441	0.442	0.442	57.82
	100	0.577	0.577	0.577	67.74
Asam Askorbat	12.5	0.409	0.409	0.409	54.69
	25	0.542	0.542	0.541	65.58
	50	0.711	0.713	0.712	73.73
	100	0.845	0.847	0.846	77.80

Berdasarkan data dari tabel 6, semakin tinggi konsentrasi sampel semakin tinggi pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Tingginya nilai absorbansi menunjukkan semakin tinggi pula kemampuan isolat dalam mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$  yang dapat dikorelasikan dengan semakin baik aktivitas antioksidannya. Tabel di atas menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan

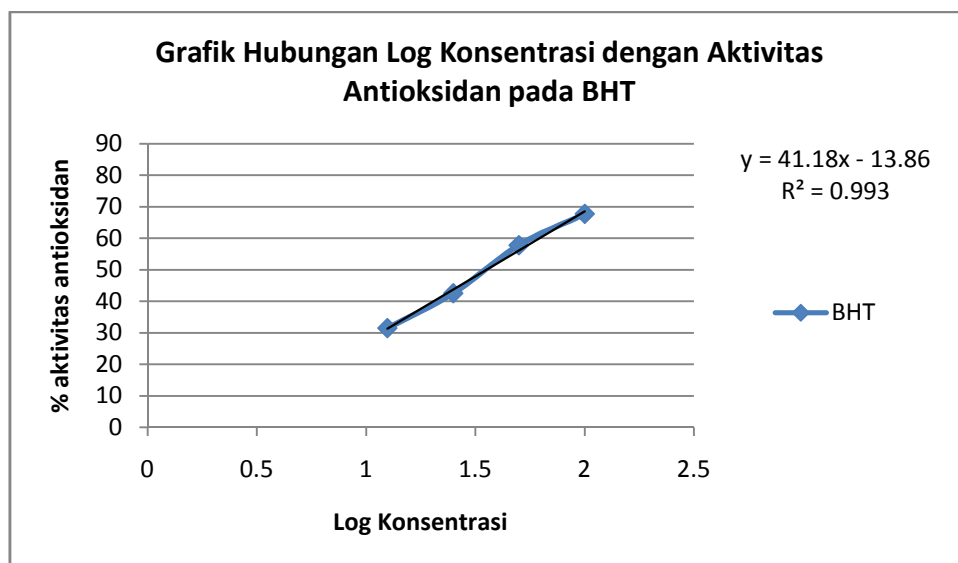
Asam Askorbat > BHT > Senyawa Isolat

Nilai  $\text{IC}_{50}$  perlu ditentukan untuk mengetahui besarnya kemampuan standar dan isolat dalam mereduksi  $\text{Fe}^{3+}$  menjadi  $\text{Fe}^{2+}$ . Penentuan nilai  $\text{IC}_{50}$  diperoleh berdasarkan grafik hubungan antara log konsentrasi sampel pada sumbu X dan % aktivitas antioksidan pada sumbu Y. Nilai  $\text{IC}_{50}$  dari standar

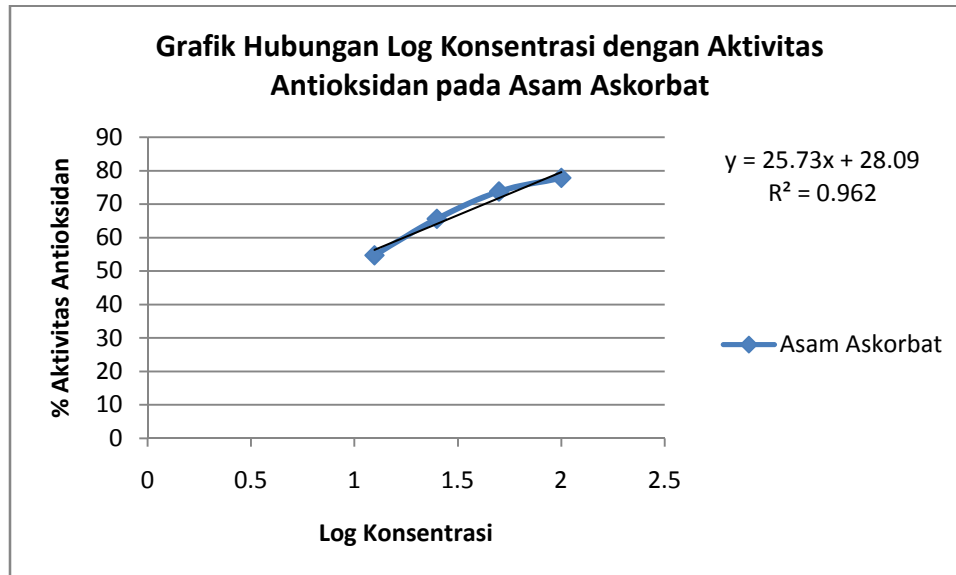
dan senyawa isolat dapat diketahui berdasarkan data dari grafik-grafik berikut.



**Gambar 34.** Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Aktivitas Antioksidan pada Senyawa Isolat



**Gambar 35.** Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Aktivitas Antioksidan pada BHT



**Gambar 36.** Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Aktivitas Antioksidan pada Asam Askorbat

Perbandingan nilai  $IC_{50}$  antara senyawa isolat dengan standar antioksidan ditunjukkan pada tabel 7.

**Tabel 7.** Perbandingan Nilai  $IC_{50}$  pada Isolat dan Standar pada Metode *Reducing Power*

Sampel	$IC_{50}$ (ppm)
Isolat (pinosembrin)	7385.09
BHT	35.54
Asam Askorbat	7.11

Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ nya, semakin besar aktivitas antioksidan dari senyawa tersebut. Berdasarkan tabel diatas, standar BHT memiliki aktivitas antioksidan yang besar, sedangkan senyawa isolat tidak memiliki aktivitas antioksidan.

Uji aktivitas antioksidan pada kedua metode (metode DPPH dan *Reducing Power*) menunjukkan bahwa senyawa isolat tidak memiliki potensi sebagai senyawa antioksidan. Penelitian sebelumnya juga telah diketahui bahwa senyawa pinosembrin yang diisolasi dari buah *Alpinia rafflesiana* tidak memiliki aktivitas antioksidan (Mohamad *et al.*, 2004), sehingga dapat diasumsikan bahwa kemungkinan senyawa isolat dari fraksi *n*-heksana:etil asetat (1:3) daun *Cryptocarya ferrea* tidak memiliki aktivitas antioksidan.