

**IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DARI BUNGA
ANGSRET (*Spathodea campanulata* Beauv.) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

SKRIPSI

Oleh :

SAIFUL ARIPIN

0110920035-92



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007**

**IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DARI BUNGA
ANGSRET (*Spathodea campanulata* Beauv.) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Oleh :

**SAIFUL ARIPIN
0110920035-92**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2007**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DARI BUNGA
ANGSRET (*Spathodea campanulata* Beauv.) DAN UJI
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN**

Oleh :

SAIFUL ARIPIN

0110920035-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal.....
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Masruri, S.Si., M.Si.

NIP. 132 300 223

Dr. Rurini Retnowati, M.Si.

NIP. 131 759 593

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

M. Farid Rahman, S.Si., M.Si.

NIP. 132 158 726

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : SAIFUL ARIPIN
NIM : 0110920035-92
Jurusan : Kimia
Penulisan Skripsi Berjudul : Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Bunga Angsret (*Spathodea campanulata* Beauv.) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di dalam daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima. Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,.....

Yang menyatakan,

Saiful Aripin
NIM. 0110920035-92

IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID DARI BUNGA ANGSRET (*Spathodea campanulata* Beauv.) DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIOKSIDAN

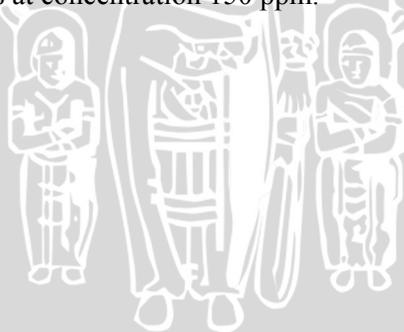
ABSTRAK

Ekstrak bunga *Spathodea campanulata* Beauv. telah digunakan untuk keperluan pengobatan, yaitu sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamasi, antivirus dan antibakteri. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengidentifikasi dan menguji aktivitas antioksidan golongan senyawa flavonoid dari bunga *S. campanulata*. Penelitian ini dilakukan melalui tiga tahapan meliputi isolasi, identifikasi dan uji aktivitas sebagai antioksidan. Isolasi flavonoid dilakukan dengan cara maserasi menggunakan metanol 80% dan dipisahkan dengan cara *flash* kromatografi kolom. Senyawa flavonoid diidentifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dan IR. Uji aktivitas sebagai antioksidan dilakukan dengan metode Lipid Hydroperoxide (LPO) pada temperatur 65 °C. Proses isolasi menghasilkan 6 isolat. Isolat I sampai V mengindikasikan sebagai golongan senyawa flavonoid, yaitu auron, flavanon, flavon dan antosianidin, sedangkan isolat VI tidak mengindikasikan golongan senyawa flavonoid. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa semua isolat mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Isolat IV (antosianidin) mempunyai persentase hambatan peroksida tertinggi yaitu sebesar 57,52% pada konsentrasi 150 ppm.

IDENTIFICATION OF FLAVONOID COMPOUND FROM ANGSRET FLOWER (*Spathodea campanulata* Beauv.) AND ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST

ABSTRACT

Spathodea campanulata Beauv. flower extract was used for medicals, such as antioxidant, anticancer, antiinflammation, antiviral, and antibacterial. The purposes of this research are to identify and to assay of the antioxidant activity of flavonoid compounds from *S. campanulata* flower. This research was carried out by three steps, included isolation, identification and antioxidant activity test. The flavonoid was isolated using maceration method by 80% methanol and separated using *flash* column chromatography. Flavonoid compound was identified by UV-Vis and IR spectrophotometric. Antioxidant activity of flavonoid compound was tested using Lipid Hydroperoxide (LPO) method at 65 °C. The isolation process resulted 6 isolates. Isolates I until V indicated flavonoid compounds, included auron, flavanon, flavon and anthocyanidin, while isolate VI was not indicated flavonoid compound. The result of antioxidant activity test showed that all of isolates had antioxidant activity. The isolate IV (anthocyanidin) had the percentage of highest peroxide inhibition is 57.52% at concentration 150 ppm.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis persembahkan kehadirat Allah SWT, karena atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Bunga Angsret (*Spathodea campanulata Beauv.*) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antioksidan**. Tujuan dari penulisan skripsi ini adalah untuk memperoleh gelar sarjana sains dalam bidang kimia.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada:

1. Masruri, S.Si, M.Si sebagai Dosen Pembimbing I dan Dr. Rurini Retnowati, M.Si sebagai Dosen Pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran serta dengan sabar memberikan bimbingan kepada penulis selama penyusunan skripsi ini.
2. DIKTI yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui program PKMP 2005.
3. Kedua orang tua penulis yang selalu mengiringi penulis dengan doa, perhatian dan kasih sayang.
4. Dr. Atikah, Apt. MSi, Ir. Uswatun Hasanah, MSi, Dra. Tutik Setianingsih, MSi, dan Ari Srihardyastuti, S.Si, M.Kes sebagai Dosen Penguji yang telah membantu menyempurnakan skripsi ini.
5. Heni Endrawati dan Vidyah Kusnaeni sebagai Tim PKM yang telah membantu pekerjaan di laboratorium.
6. Seluruh pihak yang turut membantu hingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.

Akhirnya dengan terbatasnya kemampuan serta pengetahuan penulis, maka penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di masa mendatang. Penulis mengharapkan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Juli 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Klasifikasi <i>Spathodea campanulata</i> Beauv.....	5
2.2 Flavonoid.....	6
2.3 Metode Isolasi	9
2.3.1 Maserasi.....	9
2.3.2 Uji Flavonoid.....	9
2.3.3 Kromatografi Lapis Tipis	10
2.3.4 <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	11
2.4 Metode Identifikasi.....	12
2.4.1 Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	14
2.4.2 Identifikasi dengan Spektrofotometri IR	16
2.5 Antioksidan.....	17
2.6 Radikal Bebas dan Autooksidasi Lipid	18
2.7 Metode Penentuan Konsentrasi Peroksida Pada Minyak Kelapa.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	22
3.2.1 Sampel	22

3.2.2 Bahan	22
3.3 Alat Penelitian	22
3.4 Tahapan Penelitian	23
3.5 Cara Kerja Penelitian.....	23
3.5.1 Preparasi Sampel	23
3.5.2 Maserasi dengan Pelarut Metanol.....	23
3.5.3 Uji Flavonoid.....	23
3.5.4 Tahap Isolasi Senyawa Hasil Maserasi.....	24
a. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	24
b. Pemisahan dengan <i>Flash</i> Kromatografi Kolom.....	24
3.5.5 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi.....	25
a. Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis	25
b. Identifikasi dengan Spektrofotometri IR	25
3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan.....	25
a. Preparasi Sampel Minyak Kontrol	25
b. Preparasi Sampel Minyak dengan Penambahan Isolat.....	26
c. Preparasi Sampel Minyak dengan Penambahan Butil Hidroksi Toluen	26
3.5.7 Penentuan Konsentrasi Peroksida.....	26
3.5.8 Analisis Data.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1 Preparasi Sampel	28
4.2 Maserasi dengan Pelarut Metanol.....	28
4.3 Uji Flavonoid.....	29
4.4 Isolasi Golongan Senyawa Flavonoid Hasil Maserasi.....	30
4.4.1 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis	30
4.4.2 Pemisahan dengan <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	31
4.5 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi.....	32
4.5.1 Isolat I	34
4.5.2 Isolat II.....	36
4.5.3 Isolat III	39
4.5.4 Isolat IV	42

4.5.5 Isolat V	44
4.5.6 Isolat VI	46
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Hasil Isolasi	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	57



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Pohon dan Bunga <i>S. campanulata</i>	5
Gambar 2.2 Struktur Dasar Flavonoid.....	6
Gambar 2.3 Klasifikasi Golongan Flavonoid.....	7
Gambar 2.4 Jalur Biosintesis Flavonoid.....	8
Gambar 2.5 Reaksi Flavonoid dengan HCl dan Serbuk Magnesium	10
Gambar 2.6 Reaksi Flavonol dengan Amonia.....	11
Gambar 2.7 Reaksi Apigenin dengan Pereaksi Geser NaOH.....	15
Gambar 2.8 Reaksi Fisetin dengan Pereaksi Geser AlCl ₃ /HCl	15
Gambar 2.9 Reaksi Luteolin dengan Pereaksi Geser NaOAc	16
Gambar 2.10 Reaksi Luteolin dengan Pereaksi Geser NaOAc/H ₃ BO ₃	16
Gambar 2.11 Reaksi Pembentukan Trigliserida dari gliserol dan asam lemak	20
Gambar 4.1 Interpretasi Struktur pada Isolat I Berdasarkan Warna Pita pada <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	34
Gambar 4.2 Interpretasi Struktur pada Isolat III Berdasarkan Warna Pita pada <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	39
Gambar 4.3 Interpretasi Struktur pada Isolat IV Berdasarkan Warna Pita pada <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	42
Gambar 4.4 Pengaruh Konsentrasi Isolat Terhadap Konsentrasi Peroksida	49
Gambar 4.5 Mekanisme Penghambatan Flavonoid Terhadap Peroksida	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Interpretasi Warna Noda pada Kromatogram dengan Sinar UV-Vis (Harborne, 1996).....	12
Tabel 2.2 Penafsiran Warna Noda pada Kromatogram dengan Sinar UV-Vis (Markham, 1988).....	13
Tabel 4.1 Nilai R_f Ekstrak Bunga <i>S. campanulata</i>	30
Tabel 4.2 Warna dan Berat Isolat Hasil <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	32
Tabel 4.3 Hasil Identifikasi Isolat Bunga <i>S. campanulata</i> Berdasarkan Warna Pita pada <i>Flash</i> Kromatografi Kolom	33
Tabel 4.4 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat I.....	35
Tabel 4.5 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat I.....	35
Tabel 4.6 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat II	37
Tabel 4.7 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat II	37
Tabel 4.8 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat III	40
Tabel 4.9 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat III.....	40
Tabel 4.10 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat IV	42
Tabel 4.11 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat IV.....	43
Tabel 4.12 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat V	44
Tabel 4.13 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat V	45
Tabel 4.14 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat VI.....	47
Tabel 4.15 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat VI.....	47
Tabel 4.16 Konsentrasi Peroksida yang Dihambat oleh Masing-Masing Isolat dalam persen	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Keterangan Identifikasi	57
Lampiran 2. Diagram Kerja Isolasi Bunga <i>S. campanulata</i> <i>Beauv.</i>	58
Lampiran 3. Diagram Kerja Uji Aktivitas Antioksidan	62
Lampiran 4. Panjang Gelombang Maksimum dari Isolat Bunga <i>S. campanulata</i> Sebelum dan Sesudah Penambahan Pereaksi Geser	65
Lampiran 5. Spektra UV-Vis dari Isolat Bunga <i>S.</i> <i>campanulata</i> Sebelum dan Sesudah Penambahan Pereaksi Geser	66
Lampiran 6. Spektra dan Bilangan Gelombang IR dari Isolat Bunga <i>S. campanulata</i>	72
Lampiran 7. Spektra dan Bilangan Gelombang IR dari Beberapa senyawa Flavonoid	75
Lampiran 8. Interpretasi Spektra IR Berdasarkan Bilangan Gelombang	79
Lampiran 9. Absorbansi Kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$	82
Lampiran 10. Konsentrasi Peroksida Sampel	83
Lampiran 11. Uji Statistik	84
Lampiran 12. Gambar Penelitian	94

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Radikal bebas merupakan suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan, sehingga bersifat reaktif dan tidak stabil. Radikal bebas akan mencari pasangan elektron untuk melengkapi jumlah elektron yang tidak berpasangan, apabila menyerang molekul pembentuk sel dan bereaksi akan menyebabkan berbagai macam penyakit degeneratif, antara lain penyakit jantung, diabetes, stroke dan penyakit kanker (Felten, 2003).

Secara biologis, tubuh manusia rentan terhadap radikal bebas. Radikal bebas di dalam tubuh manusia terbentuk secara terus-menerus, sebagai akibat dari proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi dan respon terhadap pengaruh dari luar tubuh seperti polusi udara, sinar ultraviolet dan asap rokok (Trilaksani, 2003).

Dampak negatif dari radikal bebas dapat dihambat dengan senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya reaksi oksidasi radikal bebas (Felten, 2003).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibedakan menjadi dua yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami (Trilaksani, 2003). Antioksidan sintetik mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dan mudah didapatkan (Madhavi *et al.*, 1996), misal Butil Hidroksi Toluena (BHT). Senyawa tersebut dapat meracuni tikus percobaan dan bersifat karsinogenik (Indriati *dkk.*, 2002). Oleh sebab itu diperlukan senyawa antioksidan yang lebih aman yaitu antioksidan alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam.

Flavonoid merupakan salah satu golongan senyawa bahan alam yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Flavonoid dapat berpotensi sebagai antioksidan karena struktur flavonoid memiliki gugus katekol yang dapat mendelokalisesi elektron radikal bebas (Amic *et al.*, 2003).

Flavonoid terdapat pada berbagai bagian tumbuhan, seperti akar, batang, daun dan bunga (Markham, 1988). Salah satu senyawa

flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan dan merupakan pigmen penyusun warna kemerah-merahan pada bunga adalah antosianin (Abbas, 2003). Bunga angsret (*S. Campanulata*) merupakan bunga yang berwarna merah dan kuning (Gilman dan Watson, 1994). Berdasarkan warna tersebut diduga bunga *S. campanulata* mengandung senyawa antosianin yang merupakan golongan flavonoid.

Metode pemisahan flavonoid telah dilakukan dengan cara *flash* kromatografi kolom (*Vacuum Liquid Chromatography/ VLC*) yaitu untuk memisahkan senyawa naringenin dan narirutin. Pemilihan metode *flash* kromatografi kolom karena metode ini dapat memisahkan senyawa flavonoid dengan cepat, murah dan menghasilkan pemisahan senyawa dengan kemurnian yang tinggi (Raman *et al.*, 2004).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak bunga *S. campanulata* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antikanker, antiinflamasi (Olugbade, 2005), antivirus dan antibakteri (Hudson *et al.*, 2000). Berdasarkan penelitian Dewi (2004) uji aktivitas antioksidan senyawa flavonoid secara *in vitro* dapat dilakukan dengan menentukan jumlah peroksida pada minyak kelapa. Menurut Cecilia (2003) senyawa flavonoid dapat menghambat pembentukan peroksida secara optimum pada penyimpanan minyak kelapa dalam oven pada temperatur 65 °C selama 24 jam.

Penelitian-penelitian tersebut masih dilakukan pada ekstrak bunga *S. campanulata* dan belum dilakukan uji aktivitas antioksidan pada isolat hasil pemisahan dengan *flash* kromatografi kolom serta belum dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan IR.

Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang maserasi bunga *S. campanulata* menggunakan pelarut metanol 80%, pemisahannya menggunakan metode *flash* kromatografi kolom, identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan IR, serta uji aktivitasnya sebagai antioksidan.

1.2 Perumusan Masalah

Perumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Golongan senyawa flavonoid apakah yang terkandung dalam isolat bunga *S. campanulata*
2. Melalui studi *in vitro*, sejauh mana aktivitas antioksidan golongan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat bunga *S. campanulata*

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. Sampel yang digunakan adalah bunga *S. campanulata* yang terdapat di lingkungan Universitas Brawijaya Malang.
2. Bagian bunga *S. campanulata* yang digunakan adalah bagian mahkota bunga yang berwarna merah.
3. Golongan senyawa flavonoid hasil isolasi diidentifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dan IR.
4. Senyawa flavonoid yang digunakan sebagai antioksidan adalah senyawa flavonoid hasil pemisahan dengan *flash* kromatografi kolom.
5. Uji aktivitas antioksidan senyawa flavonoid hasil isolasi didasarkan pada metode yang dilakukan oleh Mihaljevic *et al.* (1996).
6. Antioksidan sintesis yang digunakan sebagai bahan pembanding adalah BHT.
7. Jenis minyak yang digunakan sebagai bahan uji antioksidan adalah minyak kelapa perdagangan merk "Ikan Dorang".

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui golongan senyawa flavonoid yang terkandung dalam isolat bunga *S. campanulata*.
2. Menguji aktivitas antioksidan golongan senyawa flavonoid hasil isolasi yang terkandung dalam isolat bunga *S. campanulata*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi ilmiah untuk studi lebih lanjut mengenai pemurnian dan identifikasi senyawa flavonoid yang terkandung pada bunga *S. campanulata* dan mengembangkan antioksidan alami dari bunga *S. campanulata* sebagai alternatif pengganti antioksidan sintesis.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi *Spathodea campanulata* Beauv.

Menurut Gilman dan Watson (1994) Tumbuhan angret (*S. campanulata*) merupakan tumbuhan yang berasal dari Afrika. Tumbuhan ini dapat tumbuh di daerah tropis dan dapat tumbuh subur pada daerah dengan ketinggian di atas 1219 m dari permukaan laut. Di Indonesia tumbuhan ini ditanam sebagai tanaman hias dan peneduh atau sebagai tumbuhan liar. Nama umum tanaman ini adalah pohon tulip Afrika. Di Indonesia disebut sebagai tanaman air mancur atau angret.

S. campanulata merupakan tanaman famili Bignoniaceae, dengan ciri-ciri pohonnya tinggi besar, dengan tinggi mencapai 24 meter, tapi lebih banyak yang tumbuh berukuran lebih kecil, batangnya berongga, memiliki bunga berwarna merah dan kuning (Gilman dan Watson, 1994). Pohon dan bunga *S. campanulata* disajikan pada Gambar 2.1.



Pohon *S. campanulata*



Bunga *S. campanulata*

Gambar 2.1 Pohon dan Bunga *S. campanulata*

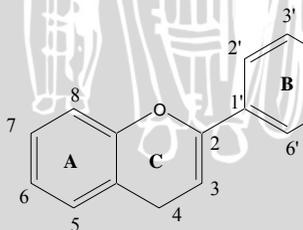
Klasifikasi tanaman *S. campanulata*, adalah sebagai berikut (USDA, 1996):

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae
Ordo	: Scrophulariales
Famili	: Bignoniaceae
Genus	: <i>Spathodea</i> Beauv.
Species	: <i>Spathodea campanulata</i> Beauv.

Tanaman *S. campanulata* memiliki efek fisiologis sebagai tanaman obat. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa daun dan bunga *S. campanulata* memiliki aktivitas sebagai antimalaria (Amusan *et al.*, 1996), antioksidan, antikanker, antiinflamasi (Olugbade, 2005), antimikroba dan antivirus (Hudson *et al.*, 2000).

2.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa golongan fenolik dengan struktur dasar C₆-C₃-C₆ yang terdiri dari 2 cincin aromatis yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ke tiga. Cincin diberi tanda A, B, dan C. Atom karbon diberi nomor dengan angka biasa untuk cincin A dan C, sedangkan cincin B dinomori dengan angka beraksen. Struktur dasar flavonoid disajikan pada Gambar 2.2 (Markham, 1988).



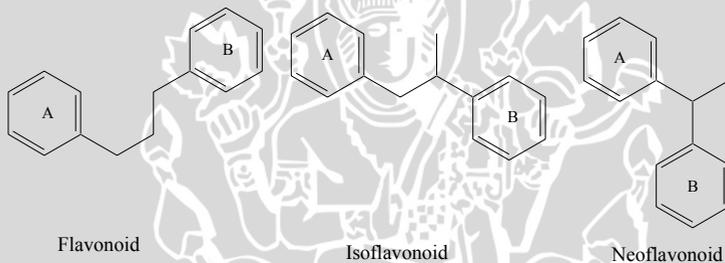
Gambar 2.2 Struktur Dasar Flavonoid

Dua persen dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan (kira-kira 1×10^9 ton/per tahun) diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan dengannya. Flavonoid tersebar pada

daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, buah dan biji (Markham, 1988).

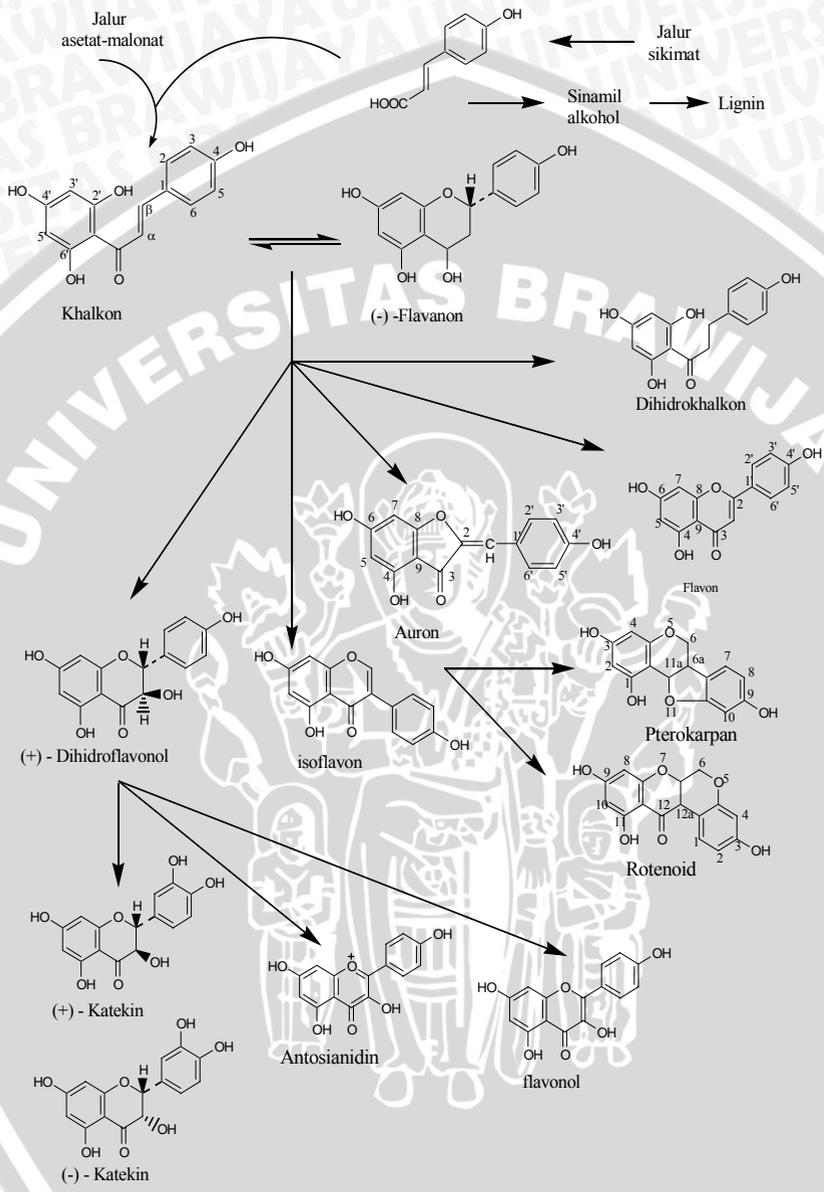
Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran dan jarang sekali ditemukan flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan. Campuran flavonoid terdiri dari flavonoid yang berbeda golongan, misalnya antosianin yang terdapat pada bunga hampir selalu disertai oleh flavon atau flavonol, karena flavon merupakan ko-pigmen yang diperlukan untuk membentuk warna antosianin secara penuh dalam jaringan bunga (Harborne, 1996).

Secara umum senyawa flavonoid memiliki kerangka dasar karbon yang hampir sama. Menurut Lenny (2006), flavonoid diklasifikasikan menjadi tiga golongan yaitu flavonoid, isoflavonoid, dan neoflavonoid. Klasifikasi golongan flavonoid disajikan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Klasifikasi Golongan Flavonoid

Struktur flavonoid dibentuk dari 2 jalur biosintesis yaitu jalur asetat malonat dan jalur sikimat. Cincin A dibentuk dari 3 unit asetat melalui jalur asetat malonat, sedangkan cincin B dibentuk dari asam *p*-kumarat melalui jalur sikimat. Golongan flavonoid yang pertama kali terbentuk dari bertemunya kedua jalur biosintesis tersebut ialah khalkon. Golongan flavonoid terbentuk melalui berbagai tahap yang disebabkan oleh enzim yang menghasilkan penambahan atau pengurangan gugus fungsi melalui reaksi hidroksilasi, metilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid, isoprenilasi gugus hidroksil, dimerisasi (pembentukan biflavonoid), pembentukan bisulfat, dan glikosilasi gugus hidroksil (pembentukan flavonoid *O*-glikosida) atau inti flavonoid (pembentukan flavonoid *C*-glikosida). Jalur biosintesis flavonoid disajikan pada Gambar 2.4 (Markham, 1988).



Gambar 2.4 Jalur Biosintesis Flavonoid

2.3 Metode Isolasi

2.3.1 Maserasi

Maserasi atau perendaman merupakan proses ekstraksi dengan cara merendam sampel dengan pelarut yang sesuai sehingga ada waktu kontak yang cukup antara pelarut dengan bahan yang diekstrak. Flavonoid merupakan senyawa polar, sehingga flavonoid akan lebih mudah larut dalam pelarut polar, seperti etanol, metanol atau air (Harborne, 1996). Adanya flavonoid glikosida cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam pelarut air, sehingga campuran pelarut metanol dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk golongan flavonoid glikosida (Markham, 1988).

Berdasarkan penelitian Iswantini *dkk.* (2005) dan Pourmorad *et al.* (2006), metode maserasi untuk mengisolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan merendam sampel yang telah dibersihkan dan diiris tipis-tipis dalam metanol selama sehari semalam. Perendaman dilakukan secara berulang-ulang sampai hasil uji terhadap adanya flavonoid negatif. Hasil dari maserasi dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

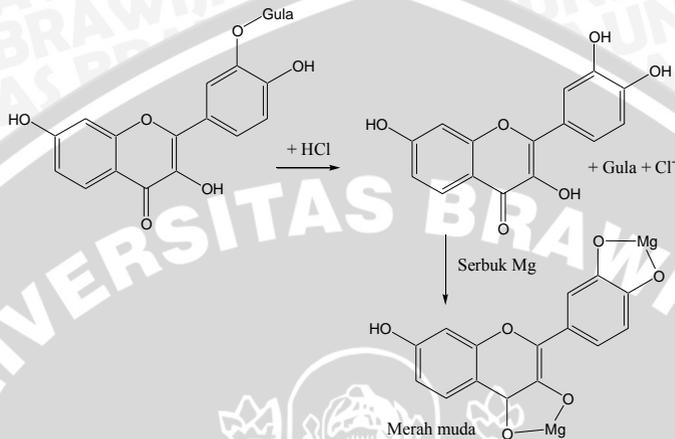
2.3.2 Uji Flavonoid

Uji Flavonoid merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui adanya flavonoid pada suatu sampel tanaman. Pada umumnya flavonoid di alam terdapat sebagai flavonoid *O*-glikosida yaitu satu atau lebih gugus hidroksil flavonoid terikat pada glukosa dengan ikatan yang tidak tahan terhadap asam (Markham, 1988).

Uji Flavonoid dilakukan dengan metode penambahan serbuk magnesium pada ekstrak kasar suatu sampel yang telah diencerkan dengan akuades dan ditambah dengan HCl 37%. Penambahan HCl pada sampel berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid glikosida menjadi aglikon flavonoid (Dewi, 2004).

Adanya golongan flavonoid dalam suatu sampel ditunjukkan dengan perubahan warna dari coklat menjadi merah atau merah muda. Perubahan warna tersebut diakibatkan terbentuknya kompleks antara senyawa flavonoid dengan serbuk magnesium. Reaksi

flavonoid dengan HCl dan serbuk magnesium disajikan pada Gambar 2.5 (Dewi, 2004):



Gambar 2.5 Reaksi Flavonoid dengan HCl dan Serbuk Magnesium

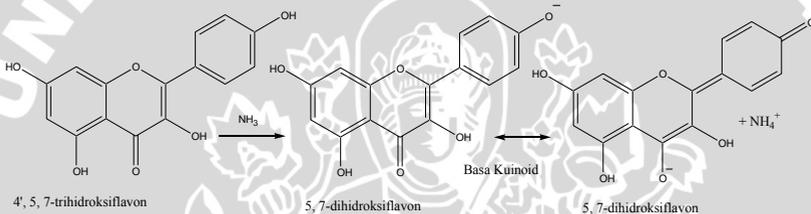
2.3.3 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan metode pemisahan dua campuran senyawa atau lebih berdasarkan kecepatan migrasi dari masing-masing komponennya pada fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu jenis dari kromatografi cair-padat yaitu fase gerak berupa cairan dan fase diam berupa padatan. Fase gerak berupa medium pengangkut yang sering disebut sebagai eluen, sedangkan fase diam berupa padatan yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium dengan ketebalan 0,1 mm sampai 0,3 mm. Fase diam yang sering digunakan yaitu selulosa, silika dan alumina (Day dan Underwood, 2001).

Eluen yang digunakan dalam kromatografi lapis tipis pada pemisahan golongan flavonoid, adalah lapisan atas dari campuran pelarut n-butanol : CH_3COOH : air (4:1:5) (disingkat BAA). Eluen ini diambil bagian atasnya dengan tujuan sebagai sarana untuk meningkatkan kadar air pada lapisan n-butanol, sehingga eluen menjadi lebih polar. Eluen yang digunakan untuk pemisahan golongan flavonoid selain BAA adalah forestal yaitu campuran pelarut CH_3COOH : HCl : air dengan perbandingan (30:3:1) Harborne (1996). Iswantini *dkk.* (2004) menggunakan eluen

kloroform:metanol untuk memisahkan golongan flavonoid. Perbandingan yang digunakan yaitu (7:3) secara bergradien dengan meningkatkan kepolarannya.

Noda pada kromatogram hasil elusi diuapi dengan uap amonia untuk meningkatkan kepekaan deteksi sehingga noda dapat terlihat dengan lebih jelas. Hal ini disebabkan oleh suatu perubahan warna yang berkaitan dengan struktur senyawa kimia yang bersangkutan. Perubahan warna tersebut terjadi karena flavonoid bereaksi dengan amonia (suatu basa) membentuk garam atau struktur kuinoid pada senyawa flavonoid yang bermuatan dan mengalami resonansi (Robinson, 1995). Contoh reaksi antara senyawa flavonoid dengan amonia disajikan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Reaksi Flavonol dengan Amonia

2.3.4 Flash Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan kromatografi cair-padat dengan fase gerak berupa cairan dan fase diam berupa padatan. Fase gerak berupa eluen yang dialirkan melalui kolom yang berisi fase diam. Fase diam berupa padatan yang diisikan pada tabung gelas. Fase diam yang digunakan untuk pemisahan flavonoid yaitu silika gel G-60 atau selulosa asetat (Sastrohamidjojo, 2002).

Prinsip pemisahan dengan kromatografi kolom yaitu pemisahan komponen suatu campuran yang didasarkan pada adsorpsi komponen pada fase diam dan dipengaruhi oleh kelarutan komponen pada fase gerak (Sastrohamidjojo, 2002). Campuran yang akan dipisahkan diletakkan di bagian atas kolom yang berada dalam tabung kaca. Fase gerak dibiarkan mengalir berdasarkan gaya gravitasi atau dengan memberikan tekanan. Kromatografi kolom dengan memberikan tekanan pada aliran fase gerak ini dikenal dengan *flash* kromatografi kolom. Cuplikan akan bergerak dengan

laju yang berbeda, kemudian akan memisah dan dikumpulkan dalam bentuk fraksi (Gritter *et al.*, 1991).

Pemisahan komponen dari campuran ditandai dengan terbentuknya pita-pita warna, dimana setiap pita mengandung satu atau lebih komponen. Jika senyawa yang dipisahkan tak berwarna maka eluat yang keluar dipantau dengan menampung eluat menjadi sejumlah fraksi-fraksi dengan volume tertentu dan dipantau dengan KLT. Berbeda halnya dengan senyawa berwarna yang dipisahkan berdasarkan pita warna yang terbentuk (Gritter *et al.*, 1991).

Pita-pita warna pada kromatogram merupakan salah satu petunjuk untuk mengidentifikasi senyawa golongan flavonoid. Interpretasi warna noda pada kromatogram dengan sinar UV-Vis disajikan pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Interpretasi Warna Noda pada Kromatogram dengan Sinar UV-Vis (Harborne, 1996)

Warna tampak	Warna dengan sinar UV		Golongan flavonoid yang mungkin
	Tanpa amonia	Dengan amonia	
Jingga Merah Merah senduduk	Jingga redup, merah atau merah senduduk	Biru	Antosianidin 3-glikosida
	Fluoresensi merah kuning atau merah jambu	Biru	Antosianidin 3,5-diglikosida
Kuning murup	Coklat tua atau hitam	Coklat tua atau hitam	6-hidroksi flavonol dan flavon; khalkon glikosida
		Merah tua atau jingga murup	Khalkon
	Kuning murup atau hijau kuning	Jingga murup merah	Auron
Kuning pucat	Coklat tua	Kuning atau coklat kuning Kuning kunyit-hijau coklat	Flavonol glikosida flavon glikosida, biflavonil, dan flavon
Nihil	Merah senduduk tua	Coklat lemah	Isoflavon dan flavonol
	Biru lemah	Biru kuat	5-desoksiisoflavon dan 7,8-dihidroksi flavanon
	Merah senduduk tua	Kuning pucat atau hijau kuning	Flavanon dan flavanonol 7-glikosida

Tabel 2.2 Penafsiran Warna Noda pada Kromatogram dengan Sinar UV-Vis (Markham, 1988)

Warna dengan sinar UV		Golongan flavonoid yang mungkin
Tanpa amonia	Dengan amonia	
Lembayung gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. 5-OH flavon atau flavonol 3-O dan 4'-OH b. 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan atau tanpa perubahan warna	a. Flavon atau flavonol 3-O, 5-OH tetapi tanpa 4'-OH b. 6- atau 8-OH flavon dan flavonol 3-O serta 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavanon dan flavanon 5-OH d. Khalkon 2'-atau 6'-OH tetapi tanpa 2- atau 4-OH
	Biru muda	5-OH flavanon
	Merah atau jingga	Khalkon 2- dan/atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hijau-biru	a. Flavon dan flavanon 5-OH b. Flavonol tanpa 5-OH tetapi ada 3-OH
	Perubahan atau tanpa perubahan warna	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Tak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning atau fluoresensi jingga	Perubahan atau tanpa perubahan warna	Flavonol 3-OH bebas dan ada atau tanpa 5-OH bebas
Fluoresensi kuning	Jingga atau merah	Auron 4'-OH bebas dan 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, hijau-biru, atau hijau	Perubahan atau tanpa perubahan warna	a. Auron tanpa 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Merah jingga redup atau merah senduduk	Biru	Antosianidin 3-glikosida
Merah jambu atau fluoresensi kuning	Biru	Antosianidin 3, 5-diglikosida

2.4 Metode Identifikasi

2.4.1 Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis

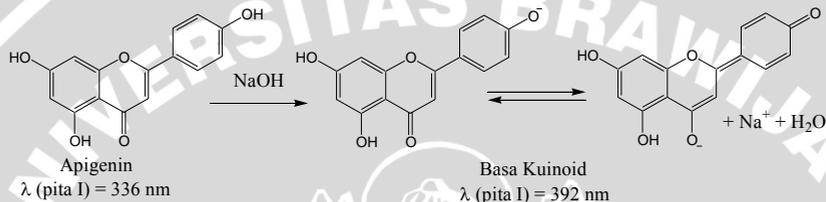
Prinsip identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis yaitu didasarkan pada absorpsi senyawa di daerah UV-Vis yang disebabkan oleh transisi elektronik. Senyawa-senyawa organik memiliki gugus fungsi yang dapat mengabsorpsi radiasi sinar UV-Vis. Gugus fungsi yang dapat mengabsorpsi sinar UV-Vis disebut sebagai kromofor, sedangkan gugus yang tidak dapat mengabsorpsi radiasi sinar UV-Vis, tetapi dapat menggeser panjang gelombang maksimum dan intensitas serapan disebut sebagai auksokrom. Proses absorpsi cahaya UV-Vis berkaitan dengan promosi elektron dari satu orbital molekul dengan tingkat energi elektronik tertentu ke orbital molekul lain dengan tingkat energi elektronik yang lebih tinggi. Transisi elektronik yang terjadi pada molekul organik adalah $\sigma \rightarrow \sigma^*$ atau $n \rightarrow \sigma^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$ atau $n \rightarrow \pi^*$ (Silverstein, 1991).

Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi, sehingga menghasilkan pita serapan kuat pada daerah spektra UV-Vis (Harborne, 1996). Spektra flavonoid umumnya mempunyai dua pita absorpsi utama yaitu pita I berada pada daerah 300-400 nm yang merupakan karakter absorpsi dari cincin B, sedangkan pita II terletak pada daerah 240-290 nm yang merupakan karakter absorpsi dari cincin A (Nollet, 1996).

Penambahan substituen nukleofilik pada flavonoid mampu mendonorkan elektron pada cincin aromatik, seperti halnya gugus hidroksi atau metoksi biasanya menyebabkan pergeseran batokromik yang kuat sebesar 10-15 nm untuk pita serapan yang terasosiasi dengan pita tersebut. Adanya konjugasi antara dua cincin seperti dalam flavon, flavonol, isoflavon, khalkon dan auron mempengaruhi puncak, bentuk, dan intensitas serapan kedua pita, walaupun hanya dengan penambahan substituen pendonor elektron pada satu cincin saja (Nollet, 1996).

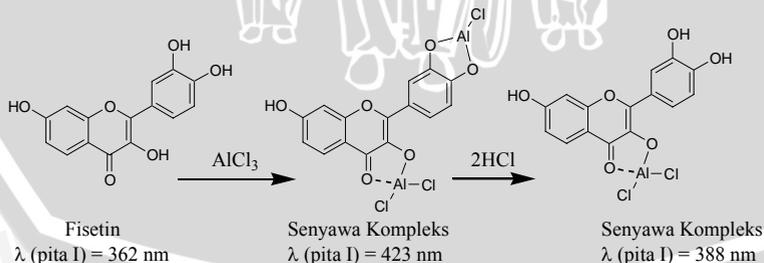
Untuk membantu proses identifikasi, digunakan beberapa pereaksi geser yang dapat memberikan informasi tentang keberadaan gugus fungsi. Beberapa pereaksi geser yang digunakan antara lain NaOH, AlCl₃, HCl, Natrium asetat (NaOAc), dan H₃BO₃ (Markham, 1988).

Penambahan pereaksi geser natrium metoksida akan menghasilkan golongan flavonoid yang terionisasi. Pereaksi geser NaOH 2 M dalam air merupakan pereaksi yang cocok untuk menggantikan pereaksi geser natrium metoksida (Markham, 1988), misalnya pereaksi geser NaOH yang ditambahkan pada senyawa apigenin menghasilkan basa kuinoid yang memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum 336 nm. Reaksi apigenin dengan Pereaksi Geser NaOH disajikan pada Gambar 2.7.



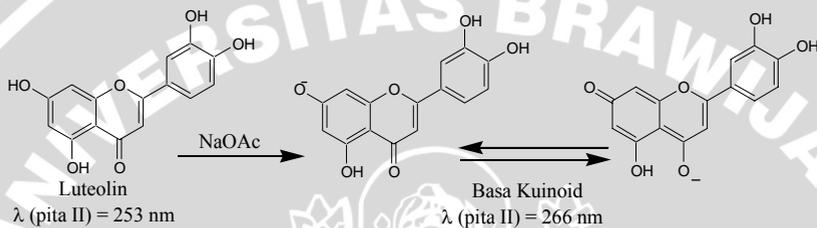
Gambar 2.7 Reaksi Apigenin dengan Pereaksi Geser NaOH

Pereaksi geser AlCl_3 dapat membentuk kompleks yang tahan asam antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga dan membentuk kompleks yang tak tahan asam dengan gugus orto-dihidroksil pada flavonoid. Penambahan HCl pada larutan metanol yang sudah mengandung AlCl_3 akan mendekomposisi kompleks yang telah terbentuk antara AlCl_3 dengan gugus orto-dihidroksil flavonoid. Adanya pergeseran batokromik yang teramati pada pita I atau pita II relatif terhadap spektra flavonoid dalam metanol mengindikasikan keberadaan gugus 3- dan/atau 5-hidroksil, misalnya penambahan pereaksi geser AlCl_3 pada fisetin akan menghasilkan senyawa kompleks dan terdekomposisi dengan adanya HCl. Reaksi fisetin dengan pereaksi geser AlCl_3/HCl disajikan pada Gambar 2.8 (Mabry *et al.*, 1970).



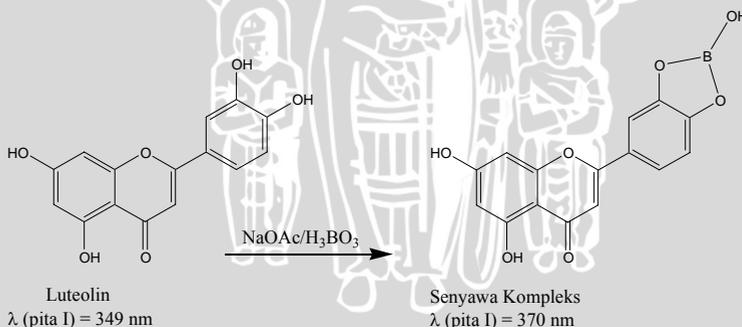
Gambar 2.8 Reaksi Fisetin dengan Pereaksi Geser AlCl_3/HCl

Pereaksi geser NaOAc menyebabkan pengionan pada gugus hidroksil yang paling asam. Pereaksi geser NaOAc digunakan untuk mendeteksi adanya gugus 7-hidroksil bebas (atau yang setara) yang ditunjukkan dengan terjadinya pergeseran batokromik, misalnya penambahan NaOAc pada luteolin akan menghasilkan suatu basa kuinoid yang memberikan serapan pada panjang gelombang 266 nm. Reaksi luteolin dengan pereaksi geser NaOAc disajikan pada Gambar 2.9 (Markham, 1988).



Gambar 2.9 Reaksi Luteolin dengan Pereaksi Geser NaOAc

Keberadaan NaOAc pada larutan H_3BO_3 akan membentuk kompleks dengan gugus orto-dihidroksil pada inti flavonoid, misalnya penambahan pereaksi geser NaOAc/ H_3BO_3 akan membentuk senyawa kompleks yang memberikan serapan pada panjang gelombang 370 nm. Reaksi luteolin dengan pereaksi geser NaOAc/ H_3BO_3 disajikan pada Gambar 2.10 (Markham, 1988).



Gambar 2.10 Reaksi Luteolin dengan Pereaksi Geser NaOAc/ H_3BO_3

2.4.2 Identifikasi dengan Spektrofotometri IR

Spektra IR suatu molekul merupakan serapan hasil transisi antara tingkat energi getaran yang berlainan. Senyawa organik

ataupun anorganik pada umumnya memiliki ikatan kovalen. Senyawa yang memiliki ikatan kovalen umumnya akan menyerap berbagai frekuensi radiasi elektromagnetik dalam daerah spektra IR. Frekuensi radiasi elektromagnetik ini akan menghasilkan pita absorpsi yang akan dijadikan sebagai dasar dalam penafsiran spektra IR (Sastrohamidjojo, 1996).

Spektra flavonoid antara golongan yang satu dengan yang lain memiliki pita serapan yang hampir sama. Secara umum pola serapan flavonoid disebabkan oleh gugus -OH , C=O dan C-O . Pola serapan -OH pada daerah vibrasi $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, serapan C=O pada $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ dan serapan C-O pada $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (Jubaidi, 1997). Spektra dan bilangan gelombang IR beberapa jenis flavonoid disajikan pada Lampiran 6 (Kinugasa *et al*, 2006).

2.5 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi radikal bebas. Antioksidan dapat menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan elektronnya pada radikal bebas, sehingga radikal bebas akan menjadi stabil. Antioksidan bersifat tidak reaktif sehingga tidak menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel (Trilaksani, 2003).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami (Trilaksani, 2003).

1. Antioksidan Sintetik

Antioksidan sintetik yaitu antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk digunakan pada makanan yaitu Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat, Tersier Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis (Trilaksani, 2003).

2. Antioksidan Alami

Antioksidan alami yaitu antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstraksi bahan alam. Sebagian besar senyawa antioksidan alami berasal dari tumbuhan. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tumbuhan, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji, dan serbuk sari (Trilaksani, 2003).

Senyawa antioksidan alami dari tumbuhan umumnya adalah senyawa golongan fenolik atau polifenolik yang terdiri dari golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, dan khalkon. Sementara dari turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain (Trilaksani, 2003).

Penggunaan senyawa antioksidan memiliki dua aspek yang harus diperhatikan yaitu keperluan teknologi dan efek toksik dari antioksidan. Perbedaan aktivitas antioksidan dari setiap senyawa tergantung pada struktur kimianya yang dapat mempengaruhi sifat fisiknya seperti volatilitas, kelarutan, dan stabilitasnya terhadap pemanasan. BHT merupakan salah satu senyawa antioksidan golongan fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik. BHT akan memiliki efek antioksidan yang lebih baik jika dimanfaatkan bersama dengan BHA (Madhavi *et al.*, 1996).

Secara umum, senyawa yang digunakan sebagai antioksidan harus memenuhi persyaratan sebagai berikut Trilaksani (2003):

1. Aman dalam penggunaan (tidak berbahaya bagi kesehatan)
2. Tidak menimbulkan warna atau rasa yang tidak diinginkan
3. Efektif untuk digunakan pada konsentrasi rendah
4. Memiliki kemampuan antioksidan yang baik
5. Mudah diperoleh
6. Harganya murah

2.6 Radikal Bebas dan Autooksidasi Lipid

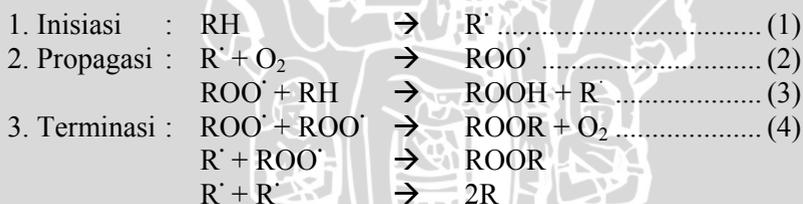
Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan, sehingga bersifat reaktif dan tidak stabil. Radikal bebas akan mencari pasangan elektron untuk melengkapi jumlah elektronnya (Felten, 2003).

Radikal bebas tidak selalu berdampak buruk, jika dihasilkan dalam batas kemampuan antioksidan seluler. Radikal bebas dapat membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh kita. Namun bila dihasilkan melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka radikal bebas tersebut akan menyerang sel itu sendiri (Trilaksani, 2003).

Autooksidasi merupakan suatu reaksi oksidasi dengan mekanisme yang dikatalisis oleh senyawa itu sendiri. Senyawa yang mengandung ikatan rangkap rentan terhadap oksidasi. Lipid dan minyak nabati seringkali mengandung ikatan rangkap. Autooksidasi suatu lipid menghasilkan campuran produk yang dapat menimbulkan ketengikan (Madhavi *et al.*, 1996).

Mekanisme autooksidasi lipid berjalan melalui dua tahap. Selama tahap pertama, oksidasi berjalan lambat dengan laju kecepatan seragam. Tahap pertama ini sering disebut periode induksi. Oksidasi pada periode induksi ini berlangsung beberapa waktu sampai pada waktu tertentu yaitu ketika reaksi memasuki tahap kedua yang mempunyai laju oksidasi dipercepat. Laju pada oksidasi tahap kedua beberapa kali lebih cepat dari laju oksidasi tahap pertama. Umumnya lemak dan minyak mulai terasa tengik pada awal tahap kedua. Asam lemak yang memiliki ikatan rangkap lebih banyak (misal asam linoleat) bereaksi lebih cepat dibanding yang berikatan rangkap lebih sedikit (misal asam oleat) sehingga periode induksinya lebih pendek (Madhavi *et al.*, 1996).

Menurut Madhavi *et al.* (1996), mekanisme autooksidasi lipid terdiri dari tiga tahap, yaitu :



Keterangan : RH = lemak/minyak tak jenuh
R[·] = radikal asam lemak
ROO[·] = radikal peroksida
ROOH = peroksida asam lemak

1. Inisiasi

Tahap inisiasi yaitu tahap pembentukan radikal asam lemak (1) bila lipida dikenai energi eksternal seperti panas, cahaya, ion logam, oksigen dan energi radiasi. Reaksi ini terjadi pada grup metilen yang berdekatan dengan ikatan rangkap.

2. Propagasi

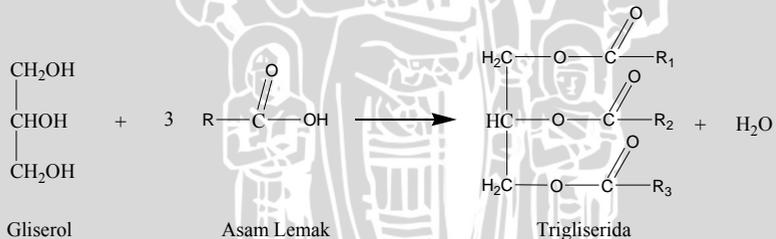
Tahap propagasi yaitu tahap pembentukan radikal peroksida (2), yang selanjutnya akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru (3). Reaksi ini terjadi sangat cepat dengan energi aktivitas hampir nol, sehingga konsentrasi hidroperoksida jauh lebih besar daripada konsentrasi radikal lipid.

3. Terminasi

Tahap terminasi yaitu tahap terjadinya reaksi antar radikal bebas membentuk kompleks bukan radikal (4). Pada tahap ini, hidroperoksida yang sangat tidak stabil terpecah menjadi senyawa organik berantai pendek seperti aldehid, keton, alkohol dan asam.

2.7 Metode Penentuan Konsentrasi Peroksida pada Minyak Kelapa

Minyak kelapa merupakan senyawa yang tidak larut dalam air. Komponen utama penyusun minyak kelapa adalah trigliserida yang merupakan ester dari gliserol dengan tiga molekul asam lemak. Reaksi pembentukan trigliserida dari gliserol dan asam lemak disajikan pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Reaksi Pembentukan Trigliserida dari gliserol dan asam lemak

Uji aktivitas senyawa-senyawa hasil isolasi sebagai antioksidan didasarkan pada kemampuannya untuk menghambat pembentukan peroksida pada minyak kelapa yang telah dipanaskan dalam oven pada temperatur 65 °C. Metode ini dikenal dengan nama lipid hydroperoxide (LPO). Menurut Madhavi *et al.* (1996), jumlah peroksida yang dihasilkan dari pemanasan minyak pada temperatur 65 °C selama 6-8 hari setara dengan jumlah peroksida yang

dihasilkan minyak pada temperatur kamar selama 46-67 hari. Dalam penelitiannya, Cecilia (2003) membuktikan bahwa senyawa flavonoid dapat menghambat pembentukan peroksida secara optimum pada penyimpanan minyak kelapa dalam oven selama 24 jam.

Hidroperoksida atau peroksida yang dihasilkan dari oksidasi lipid dapat ditentukan secara tidak langsung melalui pembentukan kompleks besi (III) tiosianat. Pengukuran hidroperoksida secara kuantitatif dilakukan melalui reaksi redoks dengan menggunakan ion besi (II). Peroksida bersifat sangat tidak stabil dan mudah mengoksidasi ion besi (II) menjadi ion besi (III). Banyaknya ion besi (III) yang dihasilkan dapat dideteksi dengan menggunakan ion tiosianat sebagai kromogen (Mihaljevic *et al.*, 1996).

Reaksi Pembentukan kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ (Mihaljevic *et al.*, 1996):



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, sedangkan identifikasi sampel dengan menggunakan spektrofotometri inframerah (IR) dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Pebruari-Juni 2006.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah bunga dari tanaman *S. campanulata* yang diperoleh dari lingkungan kampus Universitas Brawijaya Malang

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah akuades, metanol teknis, n-heksana teknis, kloroform pa, silika gel, NaOH pa, AlCl₃ pa, HCl pekat, NaOAc pa, H₃BO₃ pa, minyak kelapa merk “Ikan Dorang”, butil hidroksi toluen, besi (II) sulfat heptahidrat pa, amonium tiosianat pa, dan besi (III) klorida.

3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain pisau, neraca analitik, shaker, *rotary evaporator* pengurangan tekanan, oven, botol semprot, gelas beaker, erlenmeyer, pengaduk gelas, corong gelas, gelas arloji, pipet tetes, gelas ukur, pipet ukur, labu ukur, tabung reaksi, corong pisah, botol sampel, bola hisap, pipa kapiler, pinset, plat KLT silika-aluminium F₂₅₄ (ketebalan 0.2 mm), lampu UV, seperangkat alat *flash* kromatografi kolom, seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis merk Simadzu 1601, dan seperangkat alat spektrofotometri IR merk JASCO FT/IR-5300.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi Sampel
2. Maserasi dengan Pelarut Metanol
3. Uji Flavonoid
4. Isolasi Senyawa Hasil Maserasi
 - a. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis
 - b. Pemisahan dengan *Flash* Kromatografi Kolom
5. Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi
 - a. Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis
 - b. Identifikasi dengan Spektrofotometri IR
6. Uji Aktivitas Antioksidan
 - a. Preparasi Sampel Minyak Kontrol
 - b. Preparasi Sampel Minyak Dengan Penambahan Isolat
 - c. Preparasi Sampel Minyak Dengan Penambahan BHT
 - d. Penentuan Konsentrasi Peroksida
7. Analisis Data.

3.5 Cara Kerja Penelitian

3.5.1 Preparasi Sampel

Sampel bunga *S. campanulata* diambil dari pohonnya dan dipilih yang sudah mekar dan berwarna merah. Sampel dibersihkan dari kotoran yang menempel, diambil bagian mahkotanya, dipotong kecil-kecil (± 2 mm) kemudian ditimbang.

3.5.2 Maserasi dengan Pelarut Metanol

Sampel bunga *S. campanulata* dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan metanol 80% (metanol:air = 4:1) (perbandingan jumlah sampel dengan volume pelarut yaitu 1:10) dan didiamkan selama 24 jam kemudian disaring. Residu yang diperoleh kemudian dimaserasi lagi sampai filtrat yang diperoleh tidak berwarna. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

3.5.3 Uji Flavonoid

Ekstrak bunga *S. campanulata* diambil 0,01 g, diencerkan dengan 5 mL akuades, ditambah dengan 5 mL HCl 37%, kemudian

ditambah 0,1 g serbuk magnesium, dan diamati perubahan warna yang terjadi pada larutan campuran tersebut.

3.5.4 Tahap Isolasi Senyawa Hasil Maserasi

a. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak bunga *S. campanulata* ditotolkan 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler, dikeringkan, dimasukkan ke dalam bejana pengembang dan dielusi sepanjang 5,5 cm. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:metanol dengan komposisi (9:1, 8:2, 7:3, dan 6:4 v/v). Plat tersebut kemudian dikeluarkan dan diuapi dengan uap amonia. Deteksi noda pada kromatogram dilakukan dengan mengamati noda di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm kemudian dihitung R_f masing-masing noda.

b. Pemisahan dengan *Flash* Kromatografi Kolom

Kolom yang digunakan berupa tabung gelas dengan panjang 13 cm dan diameter 2,5 cm, kolom gelas silinder dihubungkan dengan erlenmeyer yang terhubung dengan pompa vakum. Kolom diisi dengan 60 gram serbuk silika gel 230-400 mesh. Silika gel dimasukkan ke dalam kolom gelas silinder sedikit demi sedikit dan dilakukan dalam keadaan vakum. Kolom gelas silinder yang telah diisi dengan silika gel kemudian dialiri dengan eluen kloroform:metanol (9:1) sampai kolom benar-benar padat dan tidak ada retakan.

Sampel Ekstrak bunga *S. campanulata* sebanyak 6 gram dicampur dengan silika gel 60-70 mesh kemudian digerus sampai halus, kemudian dimasukkan dengan pelan-pelan pada bagian atas kolom yang sudah dipersiapkan sebelumnya. Sampel tersebut kemudian dielusi menggunakan eluen kloroform:metanol dengan komposisi (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 dan 5:5 v/v) secara bergradien dengan meningkatkan polaritasnya. Fraksi ditampung berdasarkan pola pemisahan yang terbentuk.

Setiap fraksi yang diperoleh dipekatkan, kemudian ditotolkan pada kertas kromatografi dan dielusi sepanjang 8 cm menggunakan eluen kloroform:metanol = 7:3 dan n-heksana:etil asetat = 7:3.

3.5.5 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

a. Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis

Empat mL isolat dimasukkan dalam kuvet untuk diamati spektra serapannya pada panjang gelombang 200-800 nm. Identifikasi dilanjutkan dengan penambahan pereaksi geser dan diamati pergeseran spektranya. Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut :

1. Isolat yang diduga sebagai golongan senyawa flavonoid dilarutkan dalam metanol, diamati spektranya pada panjang gelombang 200-800 nm.
2. Isolat dari tahap 1 ditambah tiga tetes larutan NaOH 2M, dikocok hingga homogen dan diamati spektra yang dihasilkan. Untuk mengetahui apakah ada penguraian, spektra diamati lagi setelah kira-kira lima menit.
3. Serbuk NaOAc ditambahkan secara berlebih (100 mg) pada isolat, kemudian campuran tersebut dikocok dan diamati spektranya. Pada tahap ini juga diamati apakah cuplikan terurai dengan berjalannya waktu. Setelah itu ditambah dengan 100 mg serbuk H_3BO_3 , larutan tersebut dikocok dan diamati spektranya.
4. Enam tetes pereaksi $AlCl_3$ 5% dalam metanol ditambahkan pada isolat dan dicampur sampai homogen kemudian diamati spektranya, selanjutnya ditambahkan tiga tetes HCl, dicampur dan diamati spektranya

b. Identifikasi dengan Spektrofotometri IR

Isolat hasil pemisahan dengan *flash* kromatografi kolom dipekatan dengan *rotary evaporator* pengurangan tekanan. Isolat diteteskan pada pelet KBr, kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometri JASCO-FT/IR-5300.

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Preparasi Sampel Minyak Kontrol

Sepuluh mL minyak kelapa dimasukkan tabung reaksi, kemudian dipanaskan dalam oven pada temperatur 65 °C selama 24 jam.

b. Preparasi Sampel Minyak dengan Penambahan Isolat

Sepuluh mL minyak kelapa ditambah dengan isolat yang telah dilarutkan dengan metanol, sehingga kadar isolat dalam minyak adalah 50, 100, 150, 200 ppm, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan dalam oven pada temperatur 65 °C selama 24 jam.

c. Preparasi Sampel Minyak dengan Penambahan Butil Hidroksi Toluen

Sepuluh mL minyak kelapa ditambah dengan BHT yang telah dilarutkan dengan metanol, sehingga kadar BHT dalam minyak adalah 50, 100, 150, 200 ppm, kemudian dimasukkan tabung reaksi dan dipanaskan dalam oven pada temperatur 65 °C selama 24 jam.

3.5.7 Penentuan Konsentrasi Peroksida

Sampel hasil perlakuan 3.5.6 diambil 2 mL dilarutkan dalam 4 mL kloroform. Larutan tersebut diambil 2 mL, kemudian ditambah dengan 1,8 mL larutan kloroform-metanol (2:1) dan 0,2 mL kromogen sambil dikocok sehingga tercampur semua. Campuran didiamkan sejenak pada suhu kamar sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan bawah (fasa organik) diambil dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometri UV-Vis. Larutan blanko yang digunakan adalah larutan minyak kelapa yang belum dipanaskan dan diperlakukan dengan cara yang sama. Proses ini dilakukan tiga kali pengulangan.

Data absorbansi yang diperoleh dari hasil pengukuran diplotkan terhadap kurva baku sehingga diperoleh data konsentrasi Fe^{3+} yang sebanding dengan konsentrasi peroksida pada sampel.

3.5.8 Analisis Data.

Hasil analisis menggunakan data kromatogram dan spektrofotometri UV-Vis serta spektrofotometri IR digunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan struktur senyawa hasil isolasi.

Aktivitas antioksidan ditentukan dari besarnya bilangan peroksida yang diperoleh dari pengukuran absorbansi berbagai konsentrasi isolat bunga *S. campanula* terhadap konsentrasi peroksida menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Data bilangan peroksida yang diperoleh dianalisis menggunakan rancangan acak kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan yang diterapkan yaitu dengan penambahan isolat pada berbagai konsentrasi terhadap konsentrasi peroksida. Selanjutnya dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) 5% untuk mengetahui perbedaan nyata dari masing-masing perlakuan tersebut.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel bertujuan untuk menentukan spesies dari sampel bunga yang akan digunakan dan untuk mengoptimalkan proses isolasi. Preparasi sampel meliputi determinasi sampel dan optimalisasi sampel.

Hasil determinasi sampel bunga di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, menunjukkan bahwa bunga tersebut memiliki species *Spathodea campanulata* Beauv. Hasil determinasi disajikan pada Lampiran 1.

Proses preparasi sampel berikutnya yaitu mengambil bagian bagian mahkota bunga yang berwarna merah kekuningan, karena pada bagian tersebut terdapat pigmen antosianin yang merupakan golongan senyawa flavonoid yang akan diisolasi. Sampel bunga yang telah diambil kemudian dibersihkan dan dipotong kecil-kecil (+2 mm) dengan tujuan agar luas permukaannya lebih besar, sehingga proses maserasi berlangsung dengan optimal. Hasil dari preparasi sampel diperoleh sampel bunga *S. campanulata* berwarna merah kekuningan sebanyak 501,31 g

4.2 Maserasi dengan Pelarut Metanol

Tujuan dari maserasi yaitu untuk mendapatkan ekstrak kasar dari sampel bunga. Metode maserasi dilakukan untuk memberikan waktu kontak yang lebih lama antara sampel bunga dengan pelarut metanol dan agar senyawa-senyawa golongan flavonoid yang diinginkan tidak teroksidasi.

Proses maserasi pada penelitian ini dilakukan selama 24 jam. Hasil maserasi tersebut disaring dengan kertas saring, menghasilkan filtrat yang berupa cairan berwarna kuning kecoklatan dan residu yang berwarna kuning pucat. Residu hasil penyaringan dimaserasi ulang seperti perlakuan sebelumnya. Hasil dari maserasi yang ke tiga diperoleh filtrat yang tidak berwarna. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa golongan flavonoid yang terdapat pada bunga sebagian besar telah terekstrak dan larut dalam pelarut metanol.

Pelarut metanol 80% digunakan sebagai pelarut untuk maserasi karena golongan senyawa flavonoid pada umumnya terikat pada gula sehingga akan lebih mudah larut dalam pelarut campuran metanol:air, sehingga campuran pelarut (metanol:air = 4:1) merupakan pelarut yang baik untuk mengekstraksi golongan flavonoid. Selain itu, metanol memiliki titik didih yang cukup rendah ($64,5^{\circ}\text{C}$), sehingga akan lebih mudah untuk memisahkannya.

Proses maserasi ini berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu suatu senyawa akan larut pada pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sama atau hampir sama, sehingga senyawa polar akan larut pada pelarut yang polar dan senyawa non polar akan larut pada pelarut non polar. Senyawa flavonoid merupakan senyawa polar sehingga akan mudah terlarut dalam pelarut metanol yang bersifat polar.

Filtrat yang diperoleh dari proses maserasi dipekatan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Pemekatan ini bertujuan untuk memisahkan pelarut metanol dengan ekstrak bunga *S. campanulata*. Hasil dari pemekatan ini diperoleh ekstrak bunga *S. campanulata* yang berupa cairan pekat berwarna coklat kemerahan. Ekstrak ini didiamkan selama 24 jam untuk mengendapkan lilin dan lemak. Campuran ini kemudian dipisahkan dengan cara didekantasi. Hasil dari dekantasi diperoleh dekantat yang merupakan ekstrak sebanyak 51,18 gram yang berarti kadar ekstrak dalam sampel sebesar 10,21 % (b/b).

4.3 Uji Flavonoid

Tujuan dari uji flavonoid yaitu untuk mengetahui adanya senyawa-senyawa golongan flavonoid pada ekstrak kasar bunga *S. campanulata*. Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan HCl pada sampel, kemudian ditambahkan serbuk magnesium.

Hasil dari uji flavonoid pada ekstrak kasar bunga *S. campanulata* menunjukkan reaksi positif terhadap adanya senyawa golongan flavonoid. Hal ini ditunjukkan dengan perubahan warna dari kuning kecoklatan menjadi merah muda. Hasil uji pendahuluan adanya flavonoid disajikan pada lampiran 12. Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid

menjadi aglikonnya, sedangkan penambahan magnesium berfungsi untuk membentuk senyawa kompleks yang berwarna merah muda.

4.4 Isolasi Golongan Senyawa Flavonoid Hasil Maserasi

4.4.1 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

Tujuan dari pemisahan dengan KLT yaitu untuk mendapatkan eluen yang sesuai yang akan digunakan pada pemisahan dengan *flash* kromatografi kolom. Pemisahan dengan KLT dilakukan dengan menggunakan plat KLT silika-aluminium F₂₅₄ (ketebalan 0,2 mm) sebagai fase diam dan kloroform:metanol sebagai fase gerak (eluen). Pemilihan eluen kloroform:metanol didasarkan pada sifat golongan senyawa flavonoid dalam ekstrak bunga *S. campanulata* yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda, sehingga untuk memisahkan senyawa-senyawa tersebut dibutuhkan eluen yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda. Eluen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kloroform:metanol. Komposisi eluen kloroform:metanol yang digunakan yaitu 9:1, 8:2, 7:3, dan 6:4.

Hasil elusi ekstrak bunga *S. campanulata* yaitu berupa noda pada kromatogram. Noda pada kromatogram kemudian diuapi dengan uap amonia untuk meningkatkan kepekaan deteksi sehingga noda dapat terlihat dengan lebih jelas. Noda pada kromatogram yang sudah diuapi dengan uap amonia kemudian dideteksi di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Hasil dari deteksi dengan lampu UV diperoleh jumlah noda dan harga R_f yang berbeda-beda pada setiap kromatogram. Gambar kromatogram ekstrak bunga *S. campanulata* yang dideteksi dibawah lampu UV disajikan pada Lampiran 12. Berdasarkan gambar kromatogram ekstrak bunga *S. campanulata* pada Lampiran 12, harga R_f masing masing noda dapat dihitung. Hasil perhitungan harga R_f pada masing-masing noda disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Nilai R_f Ekstrak Bunga *S. campanulata*

Noda	R_f (Eluen kloroform : methanol)			
	9 : 1	8 : 2	7 : 3	6 : 4
1	0,18	0,18	0,55	0,45
2	-	0,45	0,73	0,73
3	-	0,73	0,85	0,85
4	-	0,91	-	-

Berdasarkan nilai R_f ekstrak bunga *S. campanulata* pada Tabel 4.1, eluen yang sesuai untuk pemisahan dengan cara *flash* kromatografi kolom yaitu kloroform:metanol (8:2), karena dengan eluen kloroform:metanol (8:2) dihasilkan pemisahan yang lebih baik dibandingkan dengan eluen yang lain. Pemisahan dengan eluen kloroform:metanol (8:2) menghasilkan 4 noda yang terpisah dengan baik, sedangkan dengan eluen kloroform:metanol (9:1) dihasilkan 1 noda; (7:3) dan (6:4) dihasilkan 3 noda.

4.4.2 Pemisahan dengan *Flash* Kromatografi Kolom

Tujuan dari *flash* kromatografi kolom yaitu untuk mendapatkan eluat yang lebih banyak sehingga dapat digunakan untuk keperluan analisis dan uji aktivitas sebagai antioksidan. Prinsip pemisahan senyawa dengan *flash* kromatografi kolom yaitu didasarkan pada migrasi suatu senyawa yang dipengaruhi oleh adsorpsinya pada fase diam dan kelarutannya pada fase gerak.

Sampel yang dicampur dengan silika gel dan digerus sampai halus bertujuan untuk mengabsorpsikan sampel pada silika gel tersebut, sehingga sampel akan mudah untuk dielusi. Sampel dielusi secara bergradien dengan meningkatkan kepolarannya bertujuan agar diperoleh pemisahan yang lebih baik. Hal ini karena sampel yang memiliki kepolaran yang berbeda-beda akan larut dalam eluen yang memiliki kepolaran sama atau hampir sama dengan eluen. Pada penelitian ini sampel yang kepolarannya rendah akan terelusi lebih dulu kemudian diikuti dengan sampel yang kepolarannya lebih tinggi sesuai dengan peningkatan kepolaran dari eluen.

Hasil elusi pada *flash* kromatografi kolom diperoleh 5 pita warna yang berbeda. Gambar warna pita hasil *flash* kromatografi kolom disajikan pada Lampiran 12. Setiap warna pita pada *flash* kromatografi kolom dielusi dan ditampung, kemudian dipekatkan untuk mendapatkan berat konstan. Hasil dari pemekatan ini diperoleh lima isolat dengan berat dan warna yang berbeda. Warna dan berat isolat hasil *flash* kromatografi kolom disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Warna dan Berat Isolat Hasil *Flash* Kromatografi Kolom

Isolat	Warna	Berat isolat (gram)	Kadar isolat (%)
1	Hijau kekuningan	0,06	1,00
2	hijau	0,19	3,17
3	biru	0,29	4,83
4	Merah jingga	0,71	11,83
5	merah jingga redup	1,96	31,67

Setiap isolat yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan menggunakan eluen yang berbeda kepolarannya. Tujuan dari pemisahan ini yaitu untuk mengetahui bahwa isolat yang diperoleh merupakan satu komponen noda. Hasil dari pemisahan menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan satu komponen noda. Hal ini ditunjukkan dengan tidak terjadinya pemisahan isolat bunga *S. campanulata* pada kromatogram. Gambar kromatogram isolat bunga *S. campanulata* dengan menggunakan eluen kloroform:metanol (7:3) dan n-heksana: etil asetat (7:3) disajikan pada Lampiran 12.

4.5 Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Hasil *flash* kromatografi kolom dianalisis berdasarkan warna pita yaitu dengan membandingkannya dengan literatur. Interpretasi warna noda pada kromatogram dengan sinar UV-Vis disajikan pada Tabel 2.1 dan Tabel 2.2. Berdasarkan Tabel 2.1 dan Tabel 2.2, warna pita yang terlihat pada *flash* kromatografi kolom diidentifikasi sebagai golongan senyawa flavonoid. Hasil identifikasi isolat bunga *S. campanulata* berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Tabel 4.3.

Hasil identifikasi berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom merupakan langkah awal dalam penentuan struktur senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak bunga *S. campanulata*. Hasil dari identifikasi ini masih memberikan banyak kemungkinan golongan senyawa flavonoid, sehingga diperlukan metode identifikasi lebih lanjut dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri IR.

Tabel 4.3 Hasil Identifikasi Isolat Bunga *S. campanulata* Berdasarkan Warna Pita pada *Flash* Kromatografi Kolom

Isolat	warna	Golongan Falvonoid yang Mungkin
I	Hijau Kekuningan	a. Auron yang tidak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
II	Hijau	a. Auron yang tidak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
III	Biru	a. Flavon dan flavanon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-O-glikosida b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersubstitusi pada 3-OH
IV	Merah jingga	a. Antosianidin 3-glikosida b. Antosianidin 3,5-diglikosida
V	Merah Jingga redup	a. Antosianidin 3-glikosida b. Antosianidin 3,5-diglikosida

Identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan mengukur panjang gelombang maksimum setiap isolat dalam pelarut metanol dan mengamati pergeseran puncak yang terbentuk setelah penambahan pereaksi geser. Pereaksi geser yang digunakan yaitu AlCl_3 , HCl pekat, NaOAc dan H_3BO_3 . Penambahan pereaksi geser berfungsi untuk mengetahui posisi dari gugus hidroksil pada senyawa flavonoid.

Identifikasi menggunakan spektrofotometri IR dilakukan dengan meneteskan setiap isolat pada pelet KBr dan diamati spektranya. Identifikasi menggunakan spektrofotometri IR berfungsi untuk menentukan gugus fungsi dalam senyawa flavonoid.

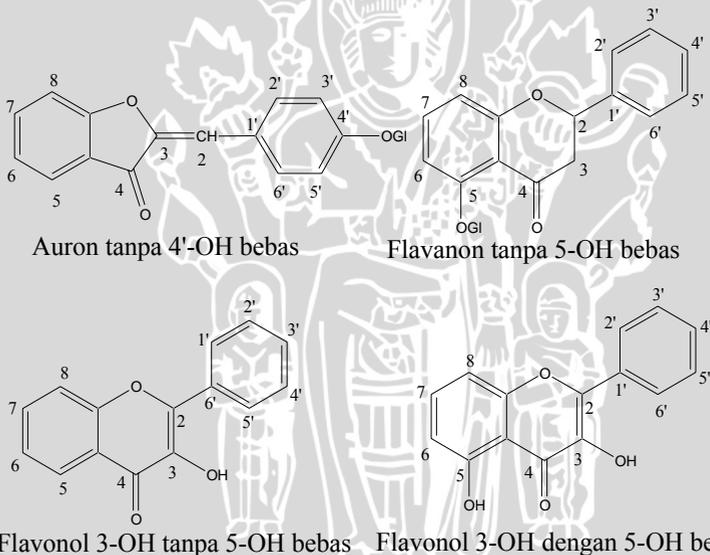
Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum dari isolat bunga *S. campanulata* sebelum dan sesudah penambahan pereaksi geser dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis disajikan pada

Lampiran 4, sedangkan spektra dan bilangan gelombang IR dari isolat bunga *S. campanulata* disajikan pada Lampiran 6.

Berdasarkan data pada Lampiran 4 dan Lampiran 6, serta hasil identifikasi isolat bunga *S. campanulata* berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom pada Tabel 4.3, setiap isolat diidentifikasi sebagai berikut:

4.5.1 Isolat I

Isolat I berwarna hijau kekuningan diinterpretasi sebagai auron yang tidak mengandung 4'-OH bebas atau flavanon tanpa 5-OH bebas atau flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas. Interpretasi struktur pada isolat I berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Interpretasi Struktur pada Isolat I Berdasarkan Warna Pita pada *Flash* Kromatografi Kolom

Identifikasi dilanjutkan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Tujuannya yaitu untuk menentukan posisi -OH dan gugus fungsi pada isolat I. Hasil interpretasi panjang gelombang

maksimum spektra UV-Vis disajikan pada Tabel 4.4, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.4 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat I

Isolat + Perekasi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
+MeOH	398,5 ; 378	262 ; 220	-
+NaOH	360,5 ; 292	262 ; 220,5	- ada 4'-OH
+AlCl ₃	396	262 ; 220	- tidak ada 3 dan 5-OH
+AlCl ₃ + HCl	315,5	262	- ada 3' dan 4'-OH atau 4' dan 5'-OH
+NaOAc	397,5	262 ; 220	- tidak ada 7-OH
+NaOAc + H ₃ BO ₃	397,5	262 ; 220	- Tidak ada 7 dan 6 atau 7 dan 8 -OH

Tabel 4.5 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat I

Frekuensi (cm ⁻¹)	Interpretasi
- 3441,32 pita lebar	- OH stretching
- 2928,21 dan 2852,98	- C=H stretching
- 2363,01 overtone	- cincin aromatis
- 1637,71	- C=O
- 1514,26 dan 1460,25	- C=H Bending
- 1275,06 dan 1167,04	- C-O-C eter siklis
- 1118,81	- OH sekunder

Berdasarkan pada Tabel 4.4, panjang gelombang maksimum dari isolat I dalam pelarut metanol untuk pita I yaitu 398,5 dan 378 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum untuk pita II yaitu 262 dan 220 nm. Panjang gelombang maksimum pada kedua pita tersebut disebabkan oleh adanya gugus kromofor $-C=C-$ dan $-C=O$ yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$.

Penambahan pereaksi geser NaOH akan menyebabkan pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang. Pada isolat I, panjang gelombang maksimumnya mengalami pergeseran ke arah yang lebih pendek sebesar 38 nm dan 86 nm setelah ditambah pereaksi geser NaOH. Hal ini mengindikasikan tidak adanya $-OH$ pada posisi 4' atau masih terdapat gugus $-OH$ yang berikatan glikosida dengan gula.

Penambahan pereaksi geser AlCl₃ pada larutan isolat I dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran yang berarti pada panjang gelombang maksimumnya. Tidak adanya pergeseran panjang

gelombang maksimum karena tidak terbentuknya kompleks AlCl_3 antara -OH pada posisi 3 atau 5 dengan gugus keton yang berdekatan atau tidak terbentuk kompleks AlCl_3 dengan -OH yang bersebelahan (posisi *orto* pada 3' dan 4'). Tidak terbentuknya kompleks tersebut menunjukkan tidak adanya 3-OH, 5-OH, 3'-OH dan 4'-OH atau disebabkan adanya gugus -OH yang masih berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3, 5, 3' dan 4'.

Penambahan pereaksi geser HCl pada larutan isolat I dalam metanol yang sudah mengandung AlCl_3 menyebabkan pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih pendek sebesar 62,5 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih pendek menunjukkan masih adanya gugus -OH yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3' dan 4'.

Penambahan pereaksi geser NaOAc pada larutan isolat I dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini menunjukkan tidak adanya gugus -OH pada posisi 7 atau masih adanya gugus -OH yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 7.

Penambahan pereaksi geser H_3BO_3 pada larutan isolat I dalam metanol yang sudah mengandung NaOAc tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak adanya -OH posisi *orto*.

Berdasarkan Tabel 4.5, terdapat pita serapan lebar pada vibrasi $3441,32 \text{ cm}^{-1}$ yang merupakan serapan khas dari vibrasi -OH Gugus -OH pada flavonoid tersebut merupakan -OH sekunder yang ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah $1118,81 \text{ cm}^{-1}$. Untuk gugus karbonil ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah $1637,71 \text{ cm}^{-1}$. Adanya cincin aromatis ditunjukkan oleh pita serapan overtone pada daerah $2363,01 \text{ cm}^{-1}$, yang diperkuat dengan pita serapan pada daerah $1514,26 \text{ cm}^{-1}$.

Berdasarkan interpretasi tersebut, Golongan flavonoid yang mungkin untuk isolat I adalah flavonoid golongan auron yang tidak mengandung 4'-OH bebas atau flavanon tanpa 5-OH bebas.

4.5.2 Isolat II

Isolat II berwarna hijau diinterpretasi sebagai auron yang tidak mengandung 4'-OH bebas atau flavanon tanpa 5-OH bebas atau flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas. Interpretasi struktur pada isolat II berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4.1.

Identifikasi dilanjutkan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Hasil interpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis disajikan pada Tabel 4.6, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.6 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat II

Isolat + Pereaksi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
+MeOH	316,5	259,5	-
+NaOH	363,5 ; 298,5	269	- ada 4'-OH
+AlCl ₃	313,5	261 ; 220	- tidak ada 3 dan 5-OH
+AlCl ₃ + HCl	317	259,5 ; 220	- tidak ada 3' dan 4'-OH atau 4' dan 5'-OH
+NaOAc	375 ; 302	261 ; 220	- ada 7-OH
+NaOAc + H ₃ BO ₃	314	259 ; 220	- Tidak ada 7 dan 6 atau 7 dan 8 -OH

Tabel 4.7 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat II

Frekuensi (cm ⁻¹)	Interpretasi
- 3425,89 pita lebar	- OH stretching
- 2947,50 dan 2837,54	- C-H stretching
- 2361,08 dan 2037,01 overtone	- cincin aromatis
- 1691,72	- C=O
- 1608,78; 1516,19; dan 1452,53	- C-H Bending
- 1375,37 dan 1277,00	- C-O-C eter siklis
- 1168,97 dan 1032,01	- OH sekunder

Berdasarkan pada Tabel 4.6, panjang gelombang maksimum dari isolat II dalam pelarut metanol untuk pita I yaitu 316,5 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum untuk pita II yaitu 259,5 nm. Panjang gelombang maksimum pada kedua pita tersebut disebabkan oleh adanya gugus kromofor $-C=C-$ dan $-C=O$ yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$.

Penambahan pereaksi geser NaOH mengakibatkan pergeseran panjang gelombang maksimum sebesar 47 nm ke arah yang lebih panjang mengindikasikan adanya gugus hidroksil pada posisi 4'-OH. Pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang setelah penambahan NaOH karena terjadi perluasan sistem konjugasi -C=C-.

Penambahan AlCl₃ pada larutan isolat II dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran yang berarti pada panjang gelombang maksimumnya. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum karena tidak terbentuk kompleks AlCl₃ antara -OH pada posisi 3 atau 5 dengan gugus keton yang berdekatan atau tidak terbentuk kompleks AlCl₃ dengan -OH yang bersebelahan (posisi *orto* pada 3' dan 4'). Tidak terbentuknya kompleks AlCl₃ menunjukkan tidak adanya 3-OH, 5-OH, 3'-OH dan 4'-OH atau disebabkan masih adanya gugus -OH yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3, 5, 3' dan 4'.

Penambahan HCl pada larutan isolat II dalam metanol yang sudah mengandung AlCl₃ tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks antara AlCl₃ dengan dihidroksi pada posisi 3' dan 4' karena masih adanya gugus -OH yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3' dan 4'.

Penambahan NaOAc pada larutan isolat II dalam metanol menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum sebesar 58,5 nm ke arah yang lebih panjang. Adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena adanya -OH pada posisi 7. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang karena terjadi perluasan sistem konjugasi -C=C-.

Penambahan H₃BO₃ pada larutan isolat II dalam metanol yang sudah mengandung NaOAc tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks pada posisi *orto*.

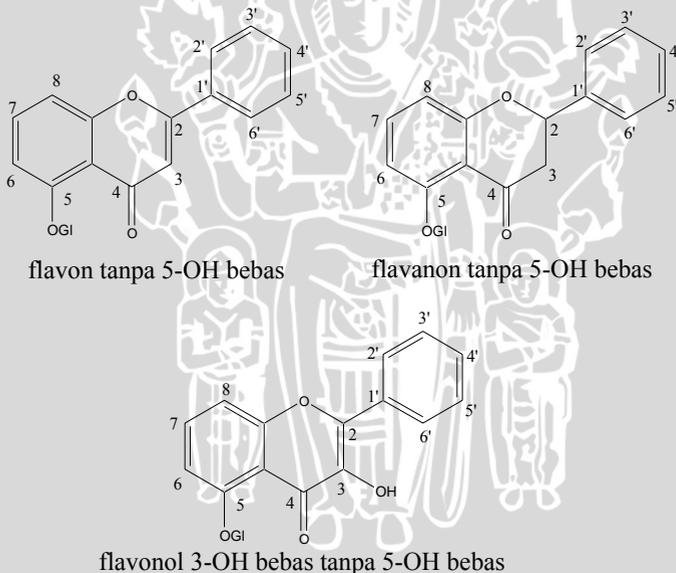
Interpretasi tentang adanya gugus hidroksil bebas pada senyawa flavonoid tersebut diperkuat oleh spektra IR yang menunjukkan pita serapan lebar pada daerah vibrasi 3425,89 cm⁻¹. Gugus hidroksil pada flavonoid tersebut merupakan -OH sekunder

yang ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi 1168,97 dan 1032,01 cm^{-1} . Untuk gugus karbonil ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah 1691,72 cm^{-1} . Adanya cincin aromatis ditunjukkan oleh pita serapan overtone pada daerah 2361,08 dan 2037,01 cm^{-1} dan diperkuat dengan pita serapan pada daerah 1608,78 cm^{-1} .

Berdasarkan hasil interpretasi tersebut, golongan flavonoid yang mungkin untuk isolat II adalah flavonoid golongan flavanon tanpa 5-OH bebas.

4.5.3 Isolat III

Isolat III berwarna biru diinterpretasikan sebagai Flavon dan flavanon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-O-glikosida. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersubstitusi pada 3-OH. Interpretasi struktur pada isolat III berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Interpretasi Struktur pada Isolat III Berdasarkan Warna Pita pada *Flash* Kromatografi Kolom

Identifikasi dilanjutkan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Hasil interpretasi panjang gelombang maksimum spektra

UV-Vis disajikan pada Tabel 4.8, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.9.

Tabel 4.8 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat III

Isolat + Pereaksi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
+MeOH	314,5	262 ; 219,5	-
+NaOH	364,5 ; 296	262 ; 220	- ada 4'-OH
+AlCl ₃	309,5	262 ; 220	- tidak ada 3 dan 5-OH
+AlCl ₃ + HCl	317,5	261,5 ; 220	- tidak ada 3' dan 4'-OH atau 4' dan 5'-OH
+NaOAc	301,5	261,5 ; 220	- ada 7-OH
+NaOAc + H ₃ BO ₃	302	261,5 ; 220	- Tidak ada 7 dan 6 atau 7 dan 8 -OH

Tabel 4.9 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat III

Frekuensi (cm ⁻¹)	Interpretasi
- 3393,09 pita lebar	- OH stretching
- 2928,21	- C=H stretching
- 2359,15 dan 2092,95 overtone	- cincin aromatis
- 1608,78	- C=O
- 1516,19	- C=H Bending
- 1375,37 dan 1275,06	- C-O-C eter siklis
- 1080,23	- OH sekunder

Berdasarkan pada Tabel 4.8, panjang gelombang maksimum dari isolat III dalam pelarut metanol untuk pita I yaitu 314,5 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum untuk pita II yaitu 262 dan 219,5 nm. Panjang gelombang maksimum pada kedua pita tersebut disebabkan oleh adanya gugus kromofor $-C=C-$ dan $-C=O$ yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$.

Penambahan pereaksi geser NaOH mengakibatkan pergeseran panjang gelombang maksimum sebesar 50 nm ke arah yang lebih panjang, mengindikasikan adanya -OH pada posisi 4'-OH. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang setelah penambahan NaOH karena adanya perluasan sistem konjugasi $-C=C-$.

Penambahan pereaksi geser AlCl₃ pada larutan isolat III dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran yang berarti pada panjang gelombang maksimumnya. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum karena tidak terbentuknya kompleks AlCl₃ antara -OH pada posisi 3 atau 5 dengan gugus keton

yang berdekatan atau tidak terbentuk kompleks AlCl_3 dengan $-\text{OH}$ yang bersebelahan (posisi *orto* pada 3' dan 4'). Tidak terbentuknya kompleks tersebut menunjukkan tidak adanya 3-OH, 5-OH, 3'-OH dan 4'-OH atau disebabkan masih adanya gugus $-\text{OH}$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3, 5, 3' dan 4'.

Penambahan HCl pada larutan isolat III dalam metanol yang sudah mengandung AlCl_3 tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum setelah ditambah pereaksi geser HCl karena tidak terbentuk kompleks AlCl_3 dengan $-\text{OH}$ pada posisi *orto* yaitu pada posisi 3' dan 4'. Tidak terbentuknya kompleks AlCl_3 karena pada posisi 3' dan 4' tidak terdapat $-\text{OH}$ atau pada posisi 3' dan 4' masih terdapat gugus $-\text{OH}$ yang berikatan glikosida dengan gula.

Penambahan NaOAc pada larutan isolat III dalam metanol menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih pendek sebesar 13 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih pendek karena tidak adanya 7-OH atau masih terdapat gugus $-\text{OH}$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 7.

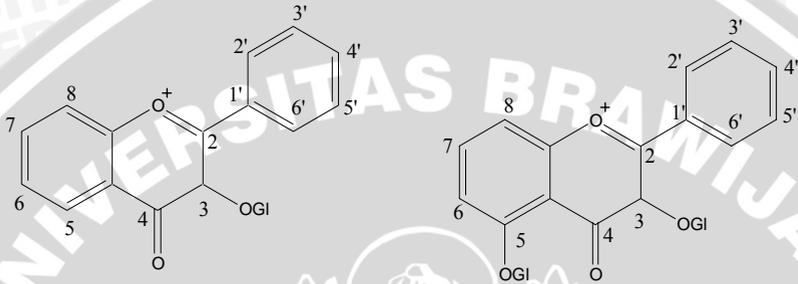
Penambahan H_3BO_3 pada larutan isolat III dalam metanol yang sudah mengandung NaOAc tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks H_3BO_3 dengan $-\text{OH}$ pada posisi *orto*.

Interpretasi tentang adanya gugus hidroksil bebas pada senyawa flavonoid tersebut diperkuat oleh spektra IR yang menunjukkan pita serapan lebar pada daerah vibrasi $3393,09 \text{ cm}^{-1}$. Gugus hidroksil pada flavonoid tersebut merupakan $-\text{OH}$ sekunder yang ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1080,23 \text{ cm}^{-1}$. Untuk gugus karbonil ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1608,78 \text{ cm}^{-1}$. Adanya cincin aromatis ditunjukkan oleh pita serapan overtone pada daerah $2359,15$ dan $2092,95 \text{ cm}^{-1}$ yang diperkuat dengan pita serapan pada daerah vibrasi $1516,19 \text{ cm}^{-1}$.

Berdasarkan hasil interpretasi tersebut, golongan flavonoid yang mungkin untuk isolat III adalah flavonoid golongan flavon atau flavanon tanpa 5-OH bebas.

4.5.4 Isolat IV

Isolat IV berwarna merah jingga diduga sebagai Antosianidin 3-glikosida atau antosianidin 3,5-diglikosida. Interpretasi struktur pada isolat IV berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4.3.



Antosianidin 3-Glikosida

Antosianidin 3,5-diglikosida

Gambar 4.3 Interpretasi Struktur pada Isolat IV Berdasarkan Warna Pita pada *Flash* Kromatografi Kolom

Identifikasi dilanjutkan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Hasil interpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis disajikan pada Tabel 4.10, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.11.

Tabel 4.10 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat IV

Isolat/ +Pereaksi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
+MeOH	315,5	262	-
+NaOH	358 ; 298,5	262 ; 220,5	- ada 4'-OH
+AlCl ₃	315	262	- Tidak ada 3 dan 5-OH
+AlCl ₃ + HCl	345,5	262 ; 221	- ada 3' dan 4'-OH atau 4' dan 5'-OH
+NaOAc	301,5	262 ; 220	- ada 7-OH
+NaOAc + H ₃ BO ₃	301,5	262 ; 220	- Tidak ada 7 dan 6 atau 7 dan 8 -OH

Berdasarkan pada Tabel 4.10, panjang gelombang maksimum dari isolat IV dalam pelarut metanol menunjukkan panjang gelombang maksimum 315,5 nm untuk pita I, sedangkan panjang gelombang maksimum untuk pita II yaitu 262 nm. Panjang

gelombang maksimum pada kedua pita tersebut disebabkan oleh adanya gugus kromofor $-C=C-$ dan $-C=O$ yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$.

Tabel 4.11 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat IV

Frekuensi (cm^{-1})	Interpretasi
- 3466,39	- OH stretching
- 2363,01 dan 2106,46 overtone	- C=H stretching
- 1647,36	- C=O
- 1419,74	- C=H Bending
- 1059,02	- OH sekunder

Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang sebesar 42,5 nm setelah dilakukan penambahan pereaksi geser NaOH mengindikasikan adanya $-OH$ pada posisi 4'. Pergeseran panjang gelombang menjadi lebih besar setelah penambahan NaOH karena terjadi perluasan sistem konjugasi $-C=C-$.

Penambahan $AlCl_3$ pada larutan isolat IV dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran yang berarti pada panjang gelombang maksimumnya. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks $AlCl_3$ dengan gugus keton yang berdekatan atau kompleks $AlCl_3$ dengan $-OH$ yang berdekatan (posisi *orto* pada 3' dan 4'). Tidak terbentuknya kompleks tersebut karena tidak adanya $-OH$ pada posisi 3 dan 5 atau 3' dan 4' atau masih adanya gugus $-OH$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 4, 5, 3' dan 4'.

Penambahan HCl pada larutan isolat IV dalam metanol yang sudah mengandung $AlCl_3$ menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih besar yaitu sebesar 30 nm. Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang karena terjadi perluasan sistem konjugasi $-C=C-$.

Penambahan $NaOAc$ pada larutan isolat IV dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum yang berarti. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak adanya 7-OH atau masih adanya gugus $-OH$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 7.

Penambahan H_3BO_3 pada larutan isolat IV dalam metanol yang sudah mengandung $NaOAc$ tidak menghasilkan pergeseran

panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks H_3BO_3 dengan *orto*-OH.

Interpretasi adanya gugus hidroksil bebas pada senyawa flavonoid tersebut diperkuat oleh spektra IR yang menunjukkan pita serapan lebar pada daerah vibrasi $3466,39\text{ cm}^{-1}$. Gugus hidroksil pada flavonoid tersebut merupakan -OH sekunder yang ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1059,02\text{ cm}^{-1}$. Untuk gugus karbonil ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1647,36\text{ cm}^{-1}$. Adanya cincin aromatis ditunjukkan oleh pita serapan overtone pada daerah $2363,01$ dan $2106,46\text{ cm}^{-1}$.

Berdasarkan hasil analisis data tersebut, golongan flavonoid yang mungkin untuk isolat IV adalah flavonoid golongan antosianidin tanpa 3 dan 5 -OH bebas.

4.5.5 Isolat V

Isolat V berwarna merah jingga redup diduga sebagai Antosianidin 3-glikosida atau antosianidin 3,5-diglikosida. Interpretasi struktur pada isolat V berdasarkan warna pita pada *flash* kromatografi kolom disajikan pada Gambar 4.3.

Identifikasi dilanjutkan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Hasil interpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis disajikan pada Tabel 4.12, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.13.

Tabel 4.12 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat V

Isolat/ +Pereaksi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
Isolat V			
+MeOH	314	262	-
+NaOH	364,5 ; 297,5	262 ; 220,5	- ada 4'-OH
+AlCl ₃	315	262 ; 219,5	- Tidak ada 3 dan 5-OH
+AlCl ₃ + HCl	318	262 ; 219,5	- tidak ada 3' dan 4'-OH atau 4' dan 5'-OH
+NaOAc	300	262	- ada 7-OH
+NaOAc + H ₃ BO ₃	300	262 ; 220	- Tidak ada 7 dan 6 atau 7 dan 8 -OH

Tabel 4.13 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat V

Frekuensi (cm ⁻¹)	Interpretasi
- 3265,78	- OH stretching
- 2945,57	- C=H stretching
- 2363,01 dan 2114,17 overtone	- cincin aromatis
- 1637,71	- C=O
- 1402,38	- C=H Bending
- 1060,94	- OH sekunder

Berdasarkan pada Tabel 4.12, panjang gelombang maksimum dari isolat V dalam pelarut metanol menunjukkan panjang gelombang maksimum 314 nm untuk pita I, sedangkan untuk pita II panjang gelombang maksimumnya yaitu 262 nm. Panjang gelombang maksimum pada kedua pita tersebut disebabkan oleh adanya gugus kromofor $-C=C-$ dan $-C=O$ yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$.

Pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang sebesar 50,5 nm setelah penambahan pereaksi geser NaOH mengindikasikan adanya 4'-OH. Pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih panjang setelah penambahan NaOH karena adanya perluasan sistem konjugasi $-C=C-$.

Penambahan $AlCl_3$ pada larutan isolat V dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran yang berarti pada panjang gelombang maksimumnya. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks $AlCl_3$ dengan $-OH$ pada posisi 3 dan 5 dengan gugus keton yang berdekatan atau $-OH$ pada posisi *orto* 3' dan 4'-OH. Tidak terbentuknya kompleks $AlCl_3$ karena tidak adanya $-OH$ pada posisi 3 dan 5 atau 3' dan 4' atau masih adanya gugus $-OH$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3 dan 5 atau 3' dan 4'.

Penambahan HCl pada larutan isolat V dalam metanol yang sudah mengandung $AlCl_3$ tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum karena tidak terbentuknya kompleks $AlCl_3$ dengan $-OH$ pada posisi *orto* 3' dan 4'. Tidak terbentuknya kompleks $AlCl_3$ karena tidak adanya $-OH$ pada posisi 3' dan 4' atau masih adanya gugus $-OH$ yang berikatan glikosida dengan gula pada posisi 3' dan 4'.

Penambahan NaOAc pada larutan isolat V dalam metanol tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum yang signifikan. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak adanya 7-OH atau masih adanya ikatan glikosida antara gugus -OH dengan gula pada posisi 7.

Penambahan H_3BO_3 pada larutan isolat V dalam metanol yang sudah mengandung NaOAc tidak menghasilkan pergeseran panjang gelombang maksimum. Tidak adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini karena tidak terbentuknya kompleks H_3BO_3 dengan *orto*-OH.

Interpretasi adanya gugus hidroksil bebas pada senyawa flavonoid tersebut diperkuat oleh spektra IR yang menunjukkan pita serapan lebar pada daerah vibrasi $3265,78\text{ cm}^{-1}$. Gugus hidroksil pada flavonoid tersebut merupakan -OH sekunder yang ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1060,94\text{ cm}^{-1}$. Untuk gugus karbonil ditunjukkan oleh pita serapan pada daerah vibrasi $1637,71\text{ cm}^{-1}$. Adanya cincin aromatis ditunjukkan oleh pita serapan overtone pada daerah $2363,01$ dan $2114,17\text{ cm}^{-1}$.

Berdasarkan hasil analisis data tersebut, jenis flavonoid yang mungkin untuk isolat V adalah flavonoid golongan antosianidin tanpa 3 dan 5 OH bebas.

4.5.6 Isolat VI

Isolat VI merupakan padatan dari ekstrak kasar sebelum dilakukan pemisahan dengan *flash* kromatografi kolom. Padatan dari isolat VI berwarna coklat. Identifikasi pada isolat VI dilakukan dengan menginterpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis dan bilangan gelombang spektra IR. Hasil interpretasi panjang gelombang maksimum spektra UV-Vis disajikan pada Tabel 4.14, sedangkan interpretasi bilangan gelombang spektra IR disajikan pada Tabel 4.15.

Berdasarkan interpretasi pada Tabel 4.14, isolat VI tidak mempunyai puncak serapan khas senyawa flavonoid. Berdasarkan spektra UV-Vis tersebut isolat VI tidak termasuk dalam golongan senyawa flavonoid.

Tabel 4.14 Interpretasi Panjang Gelombang Maksimum Spektra UV-Vis pada Isolat VI

Isolat/ +Pereaksi geser	Pita I (nm)	Pita II (nm)	Interpretasi
+MeOH	364,5 ; 299	262 ; 220,5	
+NaOH		262 ; 221	
+AlCl ₃		262 ; 220	
+AlCl ₃ + HCl		262 ; 220	
+NaOAc		262 ; 220,5	
+NaOAc + H ₃ BO ₃		262 ; 220,5	

Tabel 4.15 Interpretasi Bilangan Gelombang Spektra IR pada Isolat VI

Frekuensi (cm ⁻¹)	Interpretasi
- 3418,17	- OH stretching
- 2928,21	- C=H stretching
- 2361,08 dan 2341,79 overtone	- cincin aromatis
- 1608,78	- C=O
- 1508,47 dan 1456,39	- C=H Bending
- 1275,06	- C-O-C eter siklis
- 1167,04 dan 1074,45	- OH sekunder

Berdasarkan analisis dengan spektrofotometri IR diperoleh spektra yang menunjukkan adanya serapan -OH pada daerah 3418,17 cm⁻¹, serapan karbonil pada 1608,78 cm⁻¹. Adanya Overtone pada bilangan gelombang sekitar 2000-1700 yang menunjukkan bahwa isolat VI merupakan senyawa aromatis.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Hasil Isolasi

Aktivitas antioksidan dari masing-masing golongan senyawa flavonoid diamati dengan menentukan konsentrasi peroksida secara tidak langsung melalui pengukuran absorbansi dari kompleks Fe(SCN)₅²⁻. Peroksida yang dihasilkan dari oksidasi minyak kelapa yang telah dipanaskan dalam oven pada temperatur 65 °C selama 24 jam dapat ditentukan secara tidak langsung melalui pembentukan kompleks besi (III) tiosianat. Pengukuran peroksida secara kuantitatif dilakukan melalui reaksi redoks dengan menggunakan ion besi (II).

Peroksida bersifat sangat tidak stabil dan mudah mengoksidasi ion besi (II) menjadi ion besi (III). Banyaknya ion besi (III) yang dihasilkan dapat dideteksi dengan menggunakan ion tiosianat sebagai kromogen, sehingga jumlah peroksida yang

dihasilkan dapat ditentukan dengan mengukur kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$. Reaksi pembentukan kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ (Mihaljevic *et al.*, 1996):

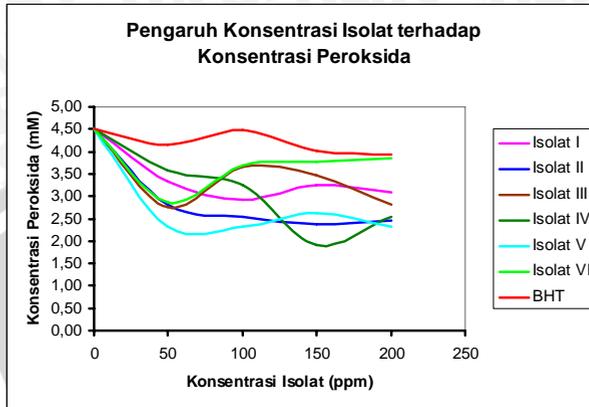


Berdasarkan hasil pengukuran absorbansi kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ dibuat kurva baku antara konsentrasi dengan absorbansinya. Data Absorbansi kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$ dan Kurva baku disajikan pada Lampiran 9. Berdasarkan kurva baku tersebut konsentrasi peroksida ditentukan secara tidak langsung.

Penentuan konsentrasi peroksida secara tidak langsung dilakukan dengan menambahkan masing-masing isolat dan BHT ke dalam minyak kelapa dengan konsentrasi yang bervariasi antara 50, 100, 150, dan 200 ppm. Hal ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari masing-masing konsentrasi isolat dalam menghambat pembentukan peroksida pada minyak kelapa.

Hasil dari penentuan konsentrasi peroksida pada minyak kelapa dari masing-masing isolat dan BHT dibandingkan dengan konsentrasi peroksida dari minyak kontrol, hal ini bertujuan untuk menentukan besarnya persentase penghambatan masing-masing isolat dan BHT tersebut.

Hasil penentuan jumlah peroksida tersebut menunjukkan bahwa golongan senyawa flavonoid hasil isolasi mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan dari masing-masing isolat dapat dilihat dari jumlah peroksida dari minyak kelapa yang dihambat. Semakin banyak jumlah peroksida yang dihambat berarti aktivitasnya sebagai antioksidan semakin tinggi. Besarnya jumlah peroksida yang dihambat akan berbanding terbalik dengan konsentrasi peroksida pada minyak kelapa. Semakin banyak jumlah peroksida yang dihambat maka konsentrasi peroksida pada minyak kelapa akan semakin kecil. Berdasarkan Lampiran 10., maka aktivitas antioksidan dari masing-masing isolat dapat dibuat sebuah grafik hubungan antara konsentrasi isolat dengan konsentrasi peroksida. Gambar 4.4 menunjukkan pengaruh konsentrasi masing-masing isolat terhadap konsentrasi peroksida dalam minyak kelapa.



Gambar 4.4 Pengaruh Konsentrasi Isolat Terhadap Konsentrasi Peroksida

Berdasarkan Gambar 4.4 aktivitas antioksidan masing-masing isolat terlihat lebih baik jika dibandingkan dengan aktivitas antioksidan dari BHT. Besarnya jumlah peroksida yang dihambat oleh masing-masing isolat dalam persen disajikan pada Tabel 4.16. Berdasarkan data pada Tabel 4.16, konsentrasi 150 ppm pada isolat IV memiliki aktivitas penghambatan peroksida tertinggi yaitu sebesar 57,52%.

Tabel 4.16 Konsentrasi Peroksida yang Dihambat oleh Masing-Masing Isolat dalam persen

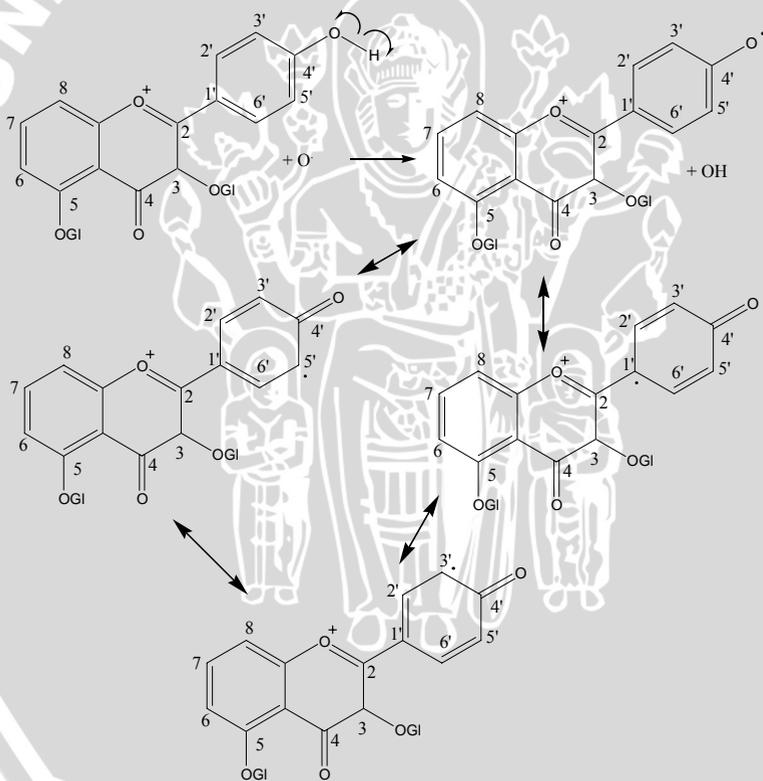
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Peroksida yang Dihambat (%)						
	Isolat I	Isolat II	Isolat III	Isolat IV	Isolat V	Isolat VI	BHT
50	25,88	37,50	38,64	20,51	48,28	36,47	7,75
100	35,23	43,69	18,34	27,76	48,24	18,17	0,25
150	27,80	47,21	22,68	57,52	41,77	16,39	10,63
200	31,60	45,08	37,29	43,66	48,35	14,61	12,30

Berdasarkan Gambar 4.4 dan data pada Tabel 4.16 dapat dianalisis bahwa secara umum semakin tinggi konsentrasi isolat yang ditambahkan pada minyak kelapa maka jumlah peroksida yang dihambat akan semakin besar, tapi pada saat konsentrasi isolat telah mencapai konsentrasi optimum, penambahan konsentrasi isolat mengakibatkan penurunan terhadap jumlah peroksida yang

dihambat. Hal ini disebabkan oleh senyawa yang berperan sebagai antioksidan pada masing-masing isolat akan berubah menjadi prooksidan pada konsentrasi tertentu.

Angka peroksida mengindikasikan tingkat oksidasi lipid. Semakin tinggi angka peroksida maka semakin besar kerusakan lipid yang diakibatkan proses oksidasi. Terjadinya penurunan angka peroksida pada sampel minyak yang telah ditambah isolat mengindikasikan bahwa isolat tersebut aktif sebagai antioksidan.

Aktivitas antioksidan dari masing-masing isolat dipengaruhi oleh struktur senyawa dari isolat tersebut. Secara umum mekanisme penghambatan senyawa flavonoid terhadap peroksida disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Mekanisme Penghambatan Flavonoid Terhadap Peroksida

Golongan senyawa flavonoid yang merupakan senyawa antioksidan dapat berperan dalam menghambat radikal bebas. Radikal bebas yang berasal dari atom oksigen yang memiliki elektron tak berpasangan atau *radical oxygen species* (ROS) akan menyerang senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang diserang oleh ROS akan menghasilkan atom hidrogen dan senyawa flavonoid yang bersifat radikal. Atom hidrogen radikal akan berikatan dengan atom oksigen radikal menghasilkan OH yang lebih stabil. Elektron tak berpasangan pada flavonoid radikal akan terstabilkan dalam sistem aromatis flavonoid, sehingga serangan dari atom oksigen radikal tersebut dapat dihambat dan distabilkan oleh senyawa flavonoid.



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi bunga *S. campanulata* menghasilkan 6 isolat.
2. Identifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan IR mengindikasikan bahwa isolat I sampai V merupakan golongan senyawa flavonoid yaitu golongan auron, flavanon, flavon dan antosianidin, sedangkan isolat VI tidak termasuk golongan senyawa flavonoid.
3. Isolat I-VI mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Isolat IV (Antosianidin) mempunyai persentase hambatan peroksida tertinggi yaitu sebesar 57,52% pada konsentrasi 150 ppm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pemurnian senyawa flavonoid dan identifikasi senyawa flavonoid dari bunga *S. campanulata* menggunakan spektrometri $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$. Penelitian ini membuka peluang untuk dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antioksidan secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A., 2003, **Identifikasi dan Pengujian Stabilitas Pigmen Antosianin Bunga Kana (*Canna coccinea* Mill.) serta Aplikasinya pada Produk Pangan**, IPTUMM, Malang
- Amic, D., D. Davidonic-Amic, D. Beslo, and N. Trnajstic, 2003, **Structure-radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids**, *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61
- Amusan, O. O. G., E. K. Adesogan and J. M. Makinde, 1996, **Antimalarial Principles of *Spathodea campanulata* Stem Bark**, *Phytotherapy Research* 10(8), 692-693
- Arjoso, S., 2001, http://www.litbang.depkes.go.id/publikasi_bpph/maskes_bppk/triulan3/kanker.htm, diakses 19 september 2005
- Cecilia, V., 2003, **Studi Perbandingan Senyawa-Senyawa Kurkuminoid sebagai Antioksidan**, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang
- Day, R. A. dan A. L. Underwood, 1999, **Analisis Kimia Kuantitatif**, edisi keenam, Alih Bahasa Iis Sopyan, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Dewi, A. S., 2004, **Identifikasi dan Studi Aktivitas Antioksidatif Flavonoid dari Ekstrak Etanol 70% Propolis Lebah *Apis mellifera***, *Skripsi*, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang
- Belitz, H. D. and W. Grosch, 1978, **Food Chemistry**, Springer Verlag, Berlin
- Felten, D., 2003, **Cancer, Free Radical and Anti-oxidants**, (online), <http://www.klsdesign.com/antiox/allabout-cancer.html>, diakses 1 Oktober 2005
- Gilman, E. F. and D. G. Watson, 1994, ***Spathodea campanulata* African Tulip-Tree**, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville

- Gritter, R. J., M. B. James and E. S. Arthur, 1991, **Pengantar Kromatografi**, Penerjemah Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Halvorson, G. A., 2000, **Chemopreventive Properties of Phycochemical**, Weltek inc, USA
- Harborne, J. B., 1996, **Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**, Edisi kedua, Alih bahasa: Kosasih Padmawinata, ITB, Bandung
- Hudson, J. B., K. Anail, C. Souzal, K. Akpaganal, G. H. N. Tower, J. T. Amason and M. Gbeassor, 2000, **Investigation Of Medicinal Plants Of Togo For Antiviral And Antimicrobial Activities**, *Pharmaceutical Biology*, 38(1), 40-45
- Indriati, A., S. B. Widjanarko, dan S. Rakhmadiono, 2002, **Analisis Aktivitas Antioksidan pada Jambu Mete (*Anacardium occidentale L.*)**, *Biosain*, 2 (1), 49-57
- Iswantini, D., Purwantiningsih, dan D. Saprudin, 2004, **Kajian Potensi Senyawa Flavonoid Dari Temu Putih Sebagai antikanker Secara Enzimatis**, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Jubaidi, M., 1997, **Isolasi dan Identifikasi senyawa Flavonoid pada Bunga Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)**, Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang
- Kinugasa, S., K. Tanabe, and T. Tamura, 2006, **Spectral Database for Organic Compounds SDBS**, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan
- Lenny, S., 2006, **Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida, dan Alkaloida**, Karya Ilmiah, Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatra Utara, Medan
- Mabry, T. J., K. R. Markham, and M. B. Thomas, 1970, **Systematic Identification Of Flavonoid**, Springer-Verlag, New York

- Madhavi, D. L., S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe, 1996, **Food Antioxidant: Technological, Toxicological and Health Perspectives**, Marcell Dekker, Inc., New York, 65-108
- Markham, K. R., 1988, **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, Terjemahan Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung
- Mihaljevic, B. and B. Katuzim-Razem, 1996, **The Reevaluation of the Ferric Thiocyanate Assay for Lipid Hydroperoxide with Special Consideration of the Mechanism Aspects of the Response**, Free Radic. Biol. Med., 21, 63-53
- Nollet, L. M. L., 1996, **Handbook Of Food Analysis**, Volume 1, Marcel Dekker Inc., New York.
- Olugbade, T. A., 2005, **Natural Options For The Development Of Pharmaceutical Industries In Nigeria**, Obafemi Awolowo University Press Limited Ile-Ife, Nigeria.
- Pourmorad, F., S. J. Hosseinimehr, and N. Shahabimajd, 2006, **Antioxidant Activity, Phenol And Flavonoid Contents Of Some Selected Iranian Medicinal Plants**, African Journal of Biotechnology, 5 (11), 1142-1145
- Raman, G., G. K. Jayaprakasha, J. Brodbelt, M. Cho, and B. S. Patil, 2004, **Isolation of Structurally Similar Citrus Flavonoids by Flash Chromatography**, Analitical Letters, 37, 3005-3016
- Sastrohamidjojo, H., 1996, **Spektroskopi Inframerah**, Liberty, Yogyakarta
- Sastrohamidjojo, H., 2002, **Kromatografi**, Liberty, Yogyakarta
- Silverstein, R. M., G. C. Bassler and T. C. Morrill, 1991, **Spectrometric Identification of Organic Compound**, 5th edition, John Wiley and Sons Inc., New York
- Trilaksani, W., 2003, **Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan**, Institut Pertanian Bogor, Bogor
- USDA, 1996, **Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Spathodea* Beauv.**, <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SPCA2>, diakses tanggal 12 oktober 2006

World Health Organization (WHO), 2003, **Global Cancer Rates could Increase by 50% to 15 Milion in 2020**,
<http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/>,
diakses 1 Oktober 2005

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Keterangan Identifikasi



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS MIPA JURUSAN BIOLOGI
LABORATORIUM TAKSONOMI & STRUKTUR PERKEMBANGAN TUMBUHAN
Jl. Veteran Telp. (0341) 575840, 575841-575842 Pes. 313, Fax. (0341) 554403 Malang 65145

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

Nomor : 023

Ketua Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, dengan ini menerangkan bahwa spesimen tanaman yang dibawa oleh :

Nama : SAIFUL ARIPIN
NIM : 0110920035
Fak./Jurusan : MIPA/KIMIA
Institusi : Universitas Brawijaya

Berdasarkan pada pustaka dan buku "*Thonner's Analitical Key of The Families of Flowering Plants*" karangan R. GEESINK dan buku "*Flora of Java*" karangan C.A. BACKER jilid : II (1963) halaman : 540 adalah :

Familia/Suku : BIGNONIACEAE
Marga : Spathodea Beauv.
Spesies : Spathodea campanulata Beauv.

Demikian, Surat Keterangan Identifikasi ini dibuat untuk dipergunakan seperlunya.

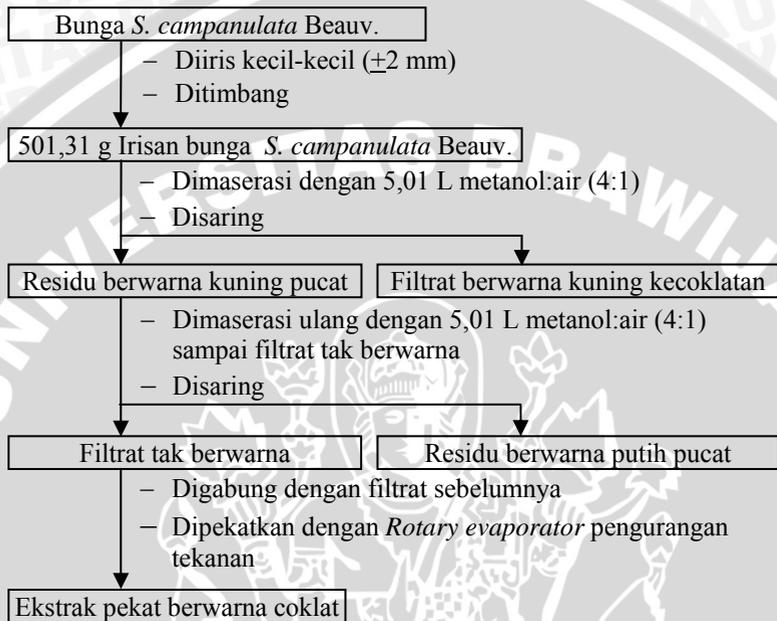


Malang 24 Agustus 2005
Ketua Laboratorium

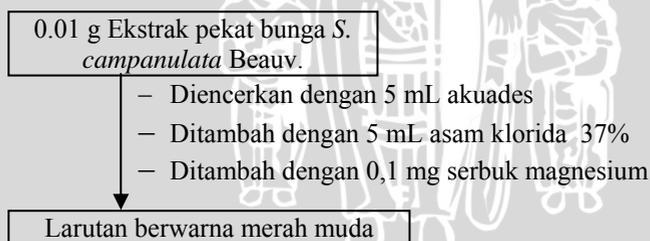

Drs. JATI BATORO, MS.i
NIP. 131 574 861

Lampiran 2. Diagram Kerja Isolasi Bunga *S. Campanulata* Beauv.

a. Maserasi Bunga *S. campanulata* Beauv.



b. Uji Pendahuluan



c. Pemisahan dengan KLT

Ekstrak pekat bunga *S. campanulata* Beauv.

- Ditotolkan pada plat dengan menggunakan pipa kapiler
- Dimasukkan ke dalam bejana pengembang
- Dielusi dengan larutan pengembang kloroform: metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4) sepanjang 5,5 cm
- Diuapi dengan uap amonia
- Diamati noda yang terbentuk di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm

Kromatogram

d. Pemisahan dengan Flash Kromatografi Kolom

6 g Ekstrak pekat bunga *S. campanulata* Beauv.

- Diadsorbsikan pada silika gel 70-230 mesh
- Dimasukkan ke dalam kolom
- Dielusi dengan larutan pengembang kloroform: metanol secara bergradien (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5)
- Ditampung berdasarkan warnanya
- Dipekatkan

Eluat pekat (isolat)

e. Pembuatan Larutan stok 1000 ppm

0,05 g eluat pekat

- Dilarutkan dengan metanol
- Diencerkan sampai tanda batas pada labu takar 50 mL

Eluat 1000 ppm

f. Pembuatan Larutan Isolat 100 ppm

1 mL eluat 1000 ppm

- Diencerkan dengan metanol sampai tanda batas pada labu takar 10 mL

Eluat 100 ppm

g. Karakterisasi dengan Spektrofotometri UV-Vis

➤ Isolat Tanpa Pereaksi Geser

Eluat 100 ppm

- Diambil sebanyak 4 mL
- Dimasukkan Kuvet
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm

spektra UV-Vis

➤ Isolat dengan Pereaksi Geser NaOH 2 M

Eluat 100 ppm

- Diambil dengan pipet
- Dimasukkan kuvet
- Ditambah 3 tetes NaOH 2 M
- Ditambah dengan eluat 100 ppm sampai tanda batas
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm

spektra UV-Vis

➤ Isolat dengan Pereaksi Geser AlCl_3 5% dan HCl

Eluat 100 ppm

- Diambil dengan pipet
- Dimasukkan kuvet
- Ditambah 6 tetes AlCl_3 5%
- Ditambah dengan eluat 100 ppm sampai tanda batas
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm
- Ditambah 3 tetes HCl
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm

spektra UV-Vis

➤ Isolat dengan Pereaksi Geser CH_3COONa dan H_3BO_3

Eluat 100 ppm

- Diambil dengan pipet
- Dimasukkan kuvet
- Ditambah 0,1 g CH_3COONa
- Ditambah dengan eluat 100 ppm sampai tanda batas
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm
- Ditambah 0,1 g H_3BO_3
- Diamati spektranya pada λ 200-800 nm

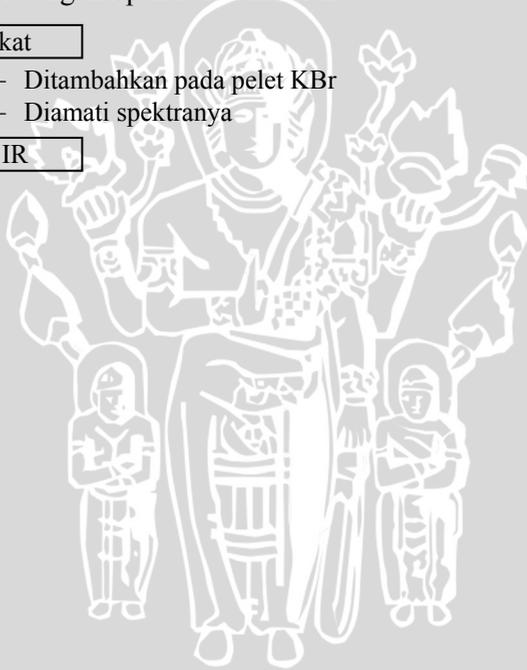
spektra UV-Vis

h. Karakterisasi dengan Spektrofotometri IR

Eluat pekat

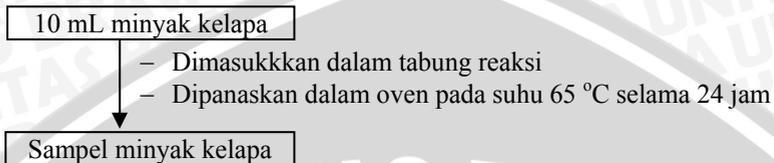
- Ditambahkan pada pelet KBr
- Diamati spektranya

spektra IR

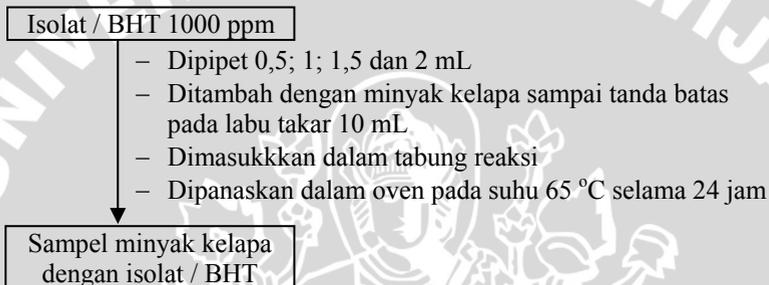


Lampiran 3. Diagram Kerja Uji Aktivitas Antioksidan

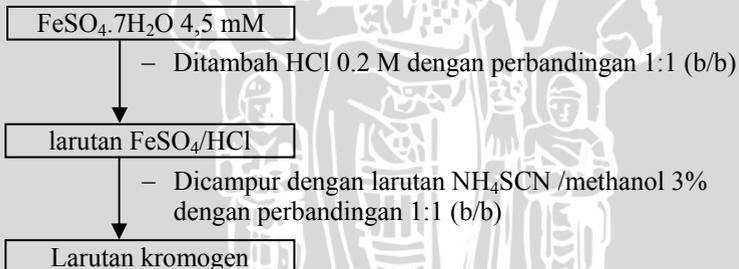
a. Preparasi Sampel Minyak Kontrol



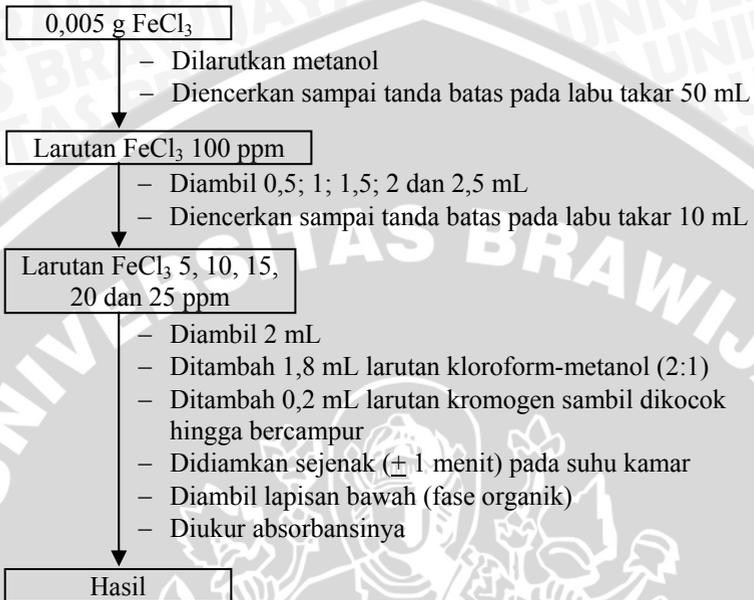
b. Preparasi Sampel Minyak dengan Penambahan Isolat dan BHT



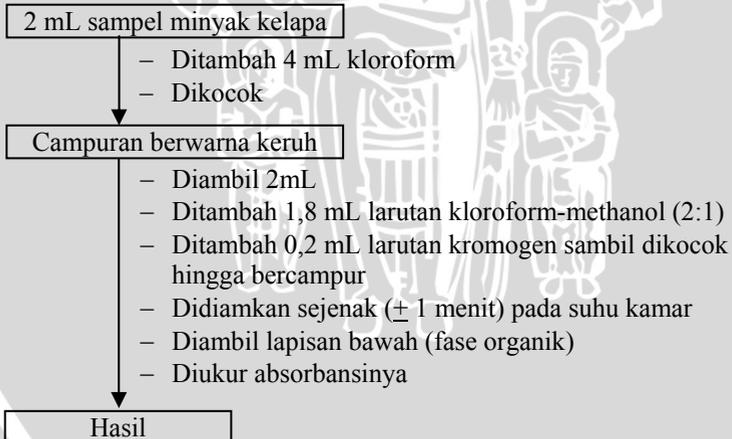
c. Pembuatan Larutan Kromogen



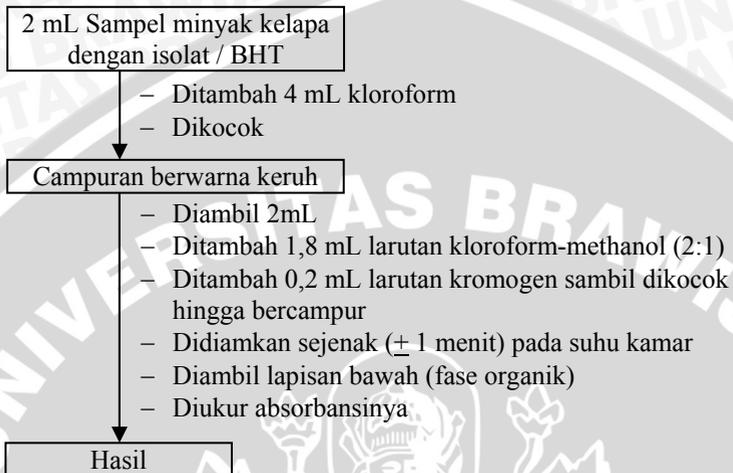
d. Pembuatan Kurva Baku dari Komplek $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$



e. Penentuan Konsentrasi Peroksida pada Sampel Minyak Kelapa



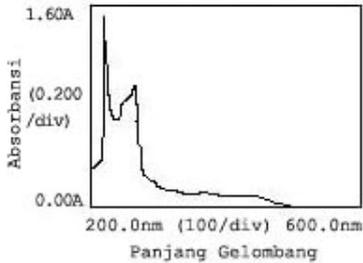
f. Penentuan Konsentrasi Peroksida pada Sampel Minyak Kelapa dengan Penambahan Isolat dan BHT



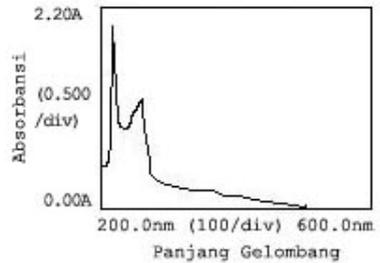
Lampiran 4. Panjang Gelombang Maksimum dari Isolat Bunga *S. campanulata* Sebelum dan Sesudah Penambahan Pereaksi Geser

Isolat	Panjang gelombang maksimum					
	MeOH	MeOH + NaOH	MeOH + AlCl ₃	MeOH + AlCl ₃ /HCl	MeOH + NaOAc	MeOH + NaOAc/H ₃ BO ₃
I	398.5 378 262 220	360.5 292 262 220.5	396 - 262 220	315.5 - 262 -	397.5 - 262 220	397.5 - 262 220
II	316.5 - 259.5 -	363.5 298.5 269 -	313.5 - 261 220	317 - 259.5 220	375 302 261 220	314 - 259 220
III	314.5 - 262 219.5	364.5 296 262 220	309.5 - 262 220	317.5 - 261.5 220	301.5 - 261.5 220	302 - 261.5 220
IV	315.5 - 262 -	358 298.5 262 220.5	315 - 262 -	345.5 - 262 221	301.5 - 262 220	301.5 - 262 220
V	314 - 262 -	364.5 297.5 262 220.5	315 - 262 219.5	318 - 262 219.5	300 - 262 -	300 - 262 220
VI	- - 262 220.5	364.5 299 262 221	- - 262 220	- - 262 220	- - 262 220.5	- - 262 220.5

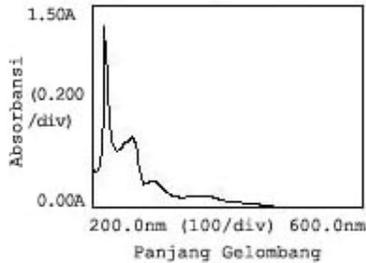
Lampiran 5. Spektra UV-Vis dari Isolat Bunga *S.campanulata* Sebelum dan Sesudah Penambahan Pereaksi Geser



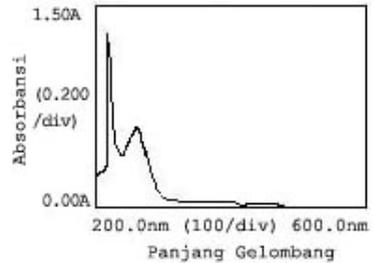
Isolat I (Metanol)



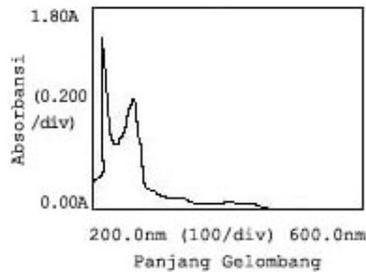
Isolat I (Metanol) + AlCl_3 + HCl



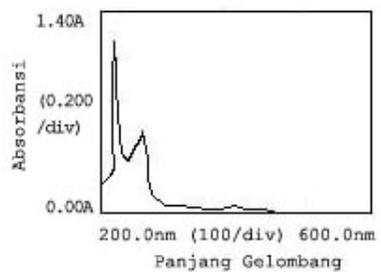
Isolat I (Metanol) + NaOH



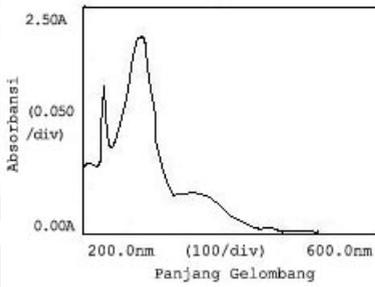
Isolat I (Metanol) + NaOAc



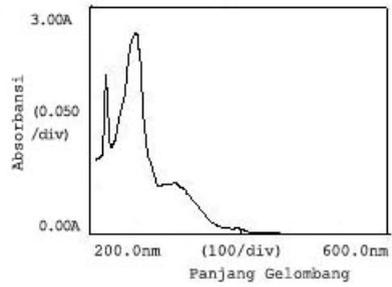
Isolat I (Metanol) + AlCl_3



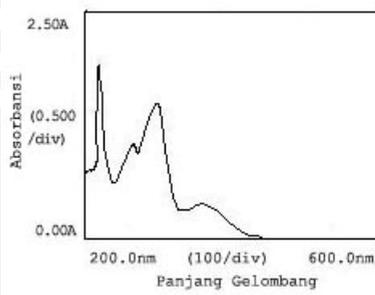
Isolat I (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4



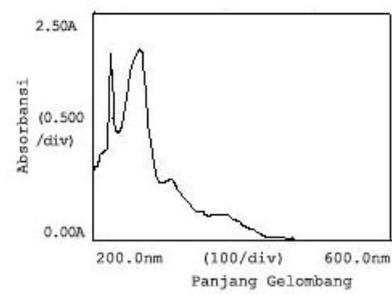
Isolat II (Metanol)



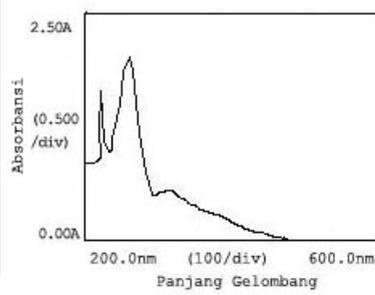
Isolat II (Metanol) + $AlCl_3$ + HCl



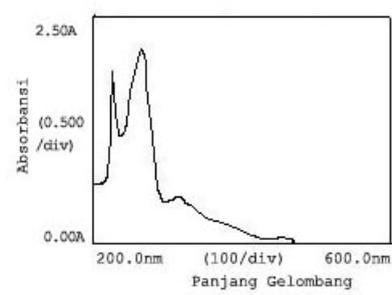
Isolat II (Metanol) + NaOH



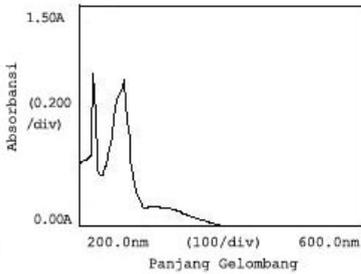
Isolat II (Metanol) + NaOAc



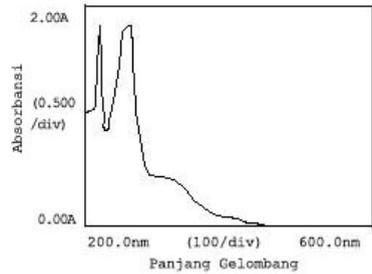
Isolat II (Metanol) + $AlCl_3$



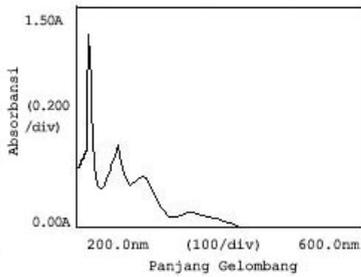
Isolat II (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4



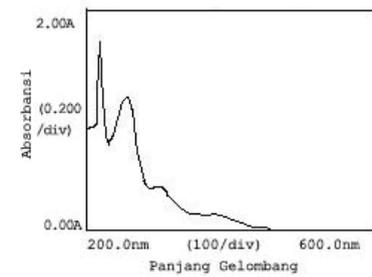
Isolat III (Metanol)



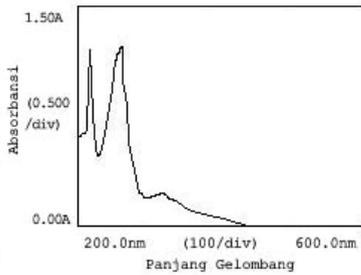
Isolat III (Metanol) + AlCl_3 + HCl



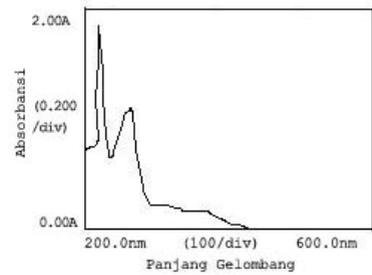
Isolat III (Metanol) + NaOH



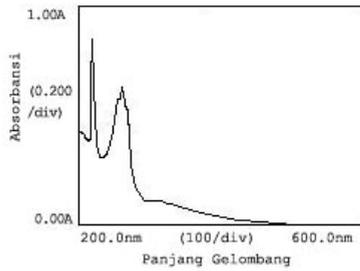
Isolat III (Metanol) + NaOAc



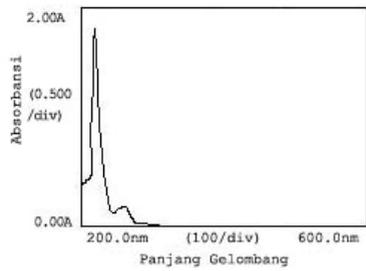
Isolat III (Metanol) + AlCl_3



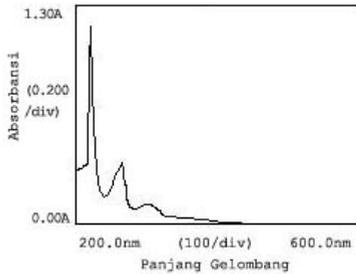
Isolat III (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4



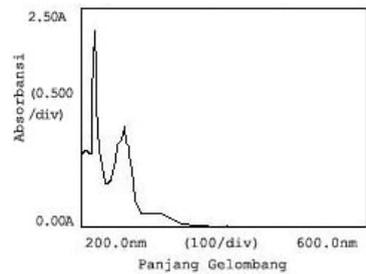
Isolat IV (Metanol)



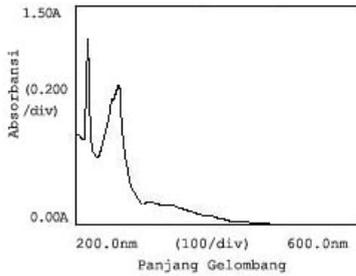
Isolat IV (Metanol) + AlCl_3 + HCl



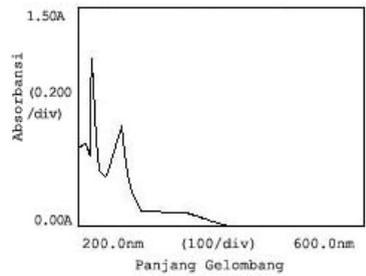
Isolat IV (Metanol) + NaOH



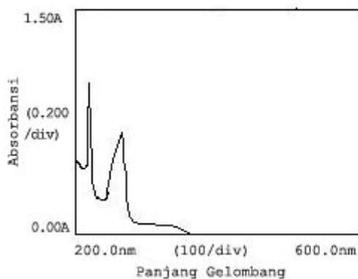
Isolat IV (Metanol) + NaOAc



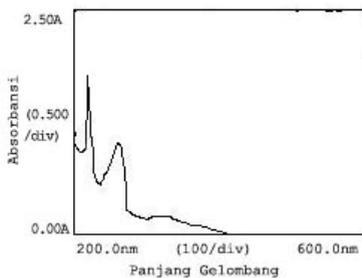
Isolat IV (Metanol) + AlCl_3



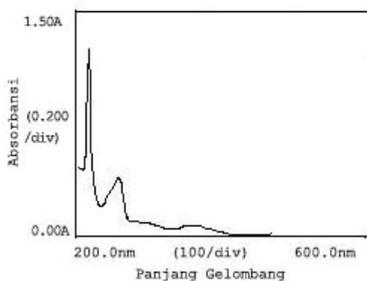
Isolat IV (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4



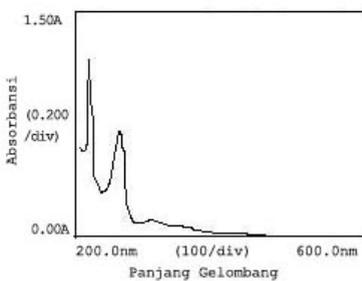
Isolat V (Metanol)



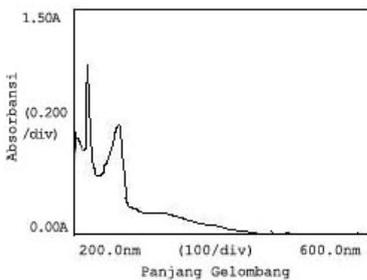
Isolat V (Metanol) $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$



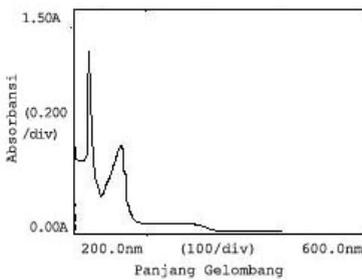
Isolat V (Metanol) + NaOH



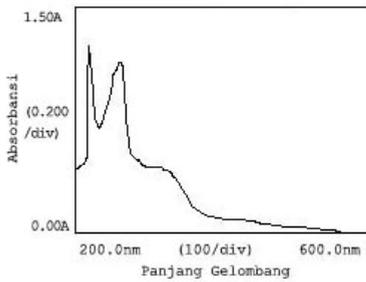
Isolat V (Metanol) + NaOAc



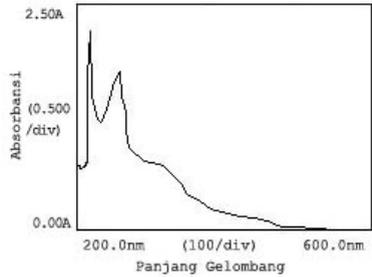
Isolat V (Metanol) + AlCl_3



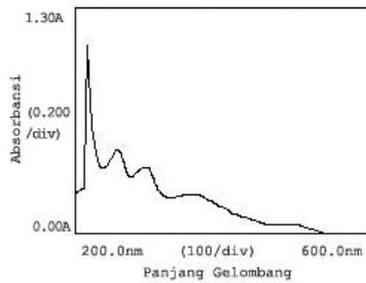
Isolat V (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4



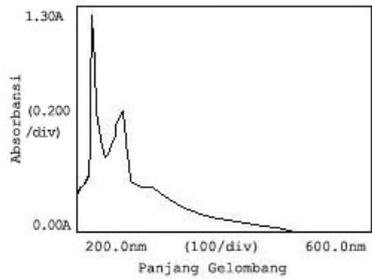
Isolat VI (Metanol)



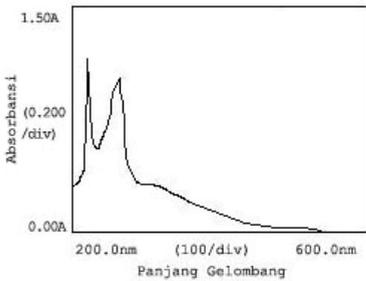
Isolat VI (Metanol) + AlCl_3 + HCl



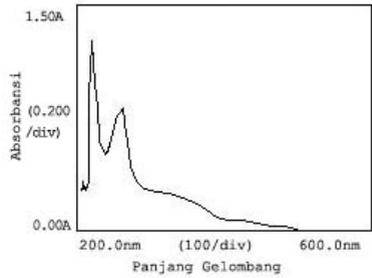
Isolat VI (Metanol) + NaOH



Isolat VI (Metanol) + NaOAc

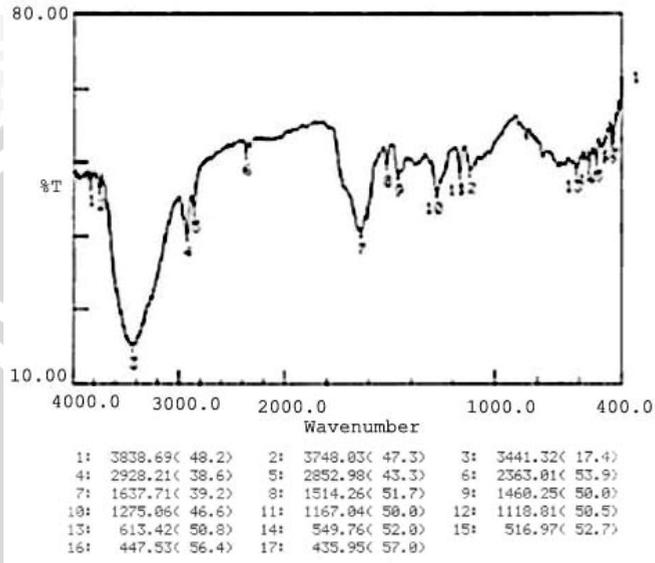


Isolat VI (Metanol) + AlCl_3

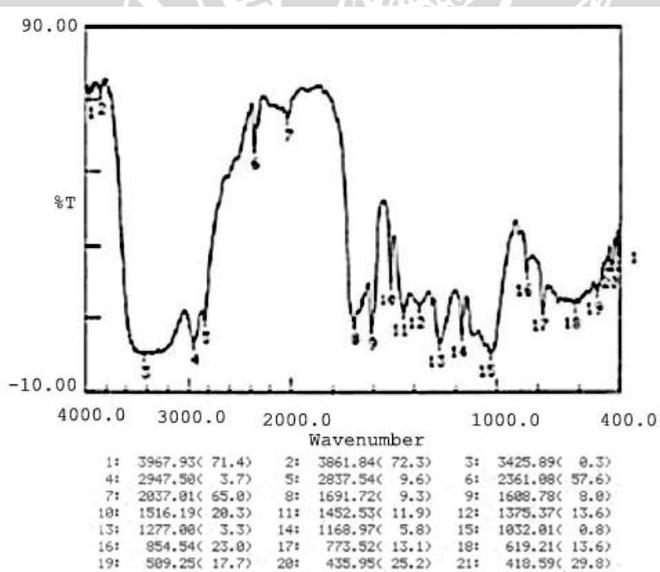


Isolat VI (Metanol) + NaOAc + H_3BO_4

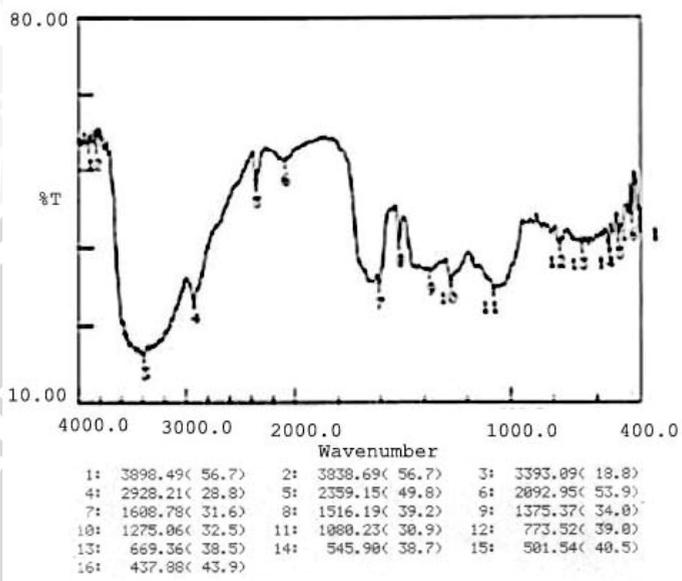
Lampiran 6. Spektra dan Bilangan Gelombang IR dari Isolat Bunga *S. campanulata*



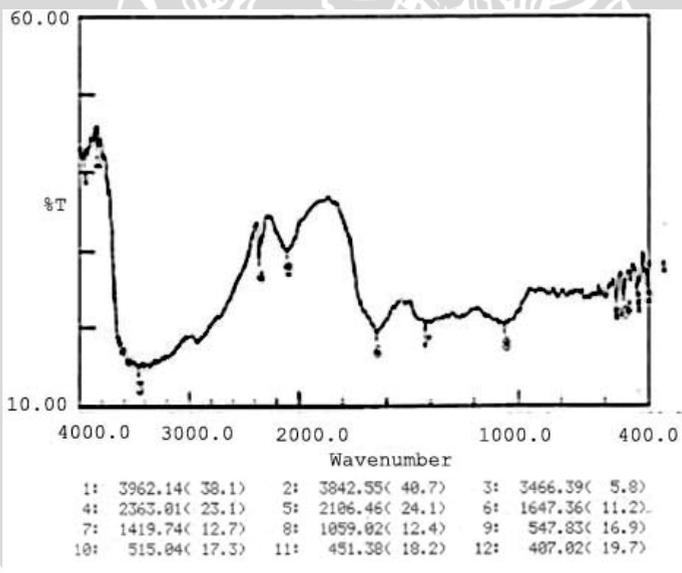
Isolat I



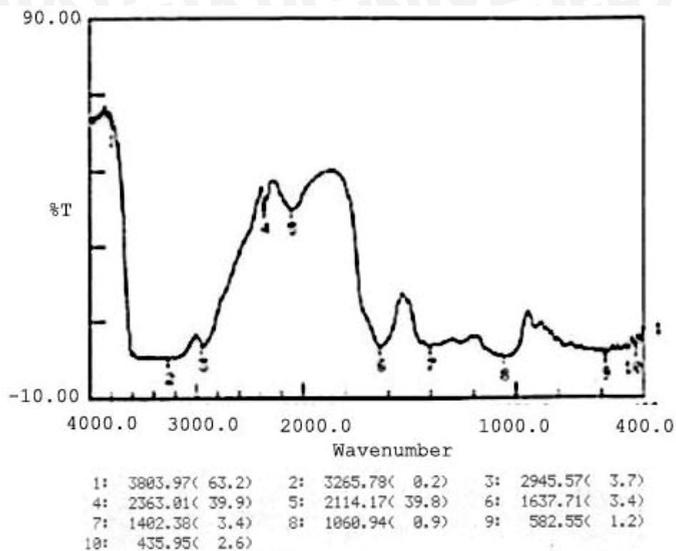
Isolat II



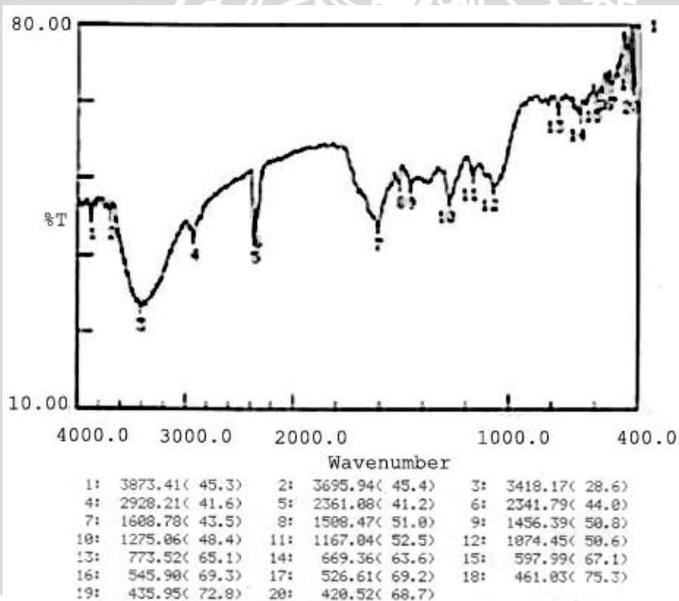
Isolat III



Isolat IV



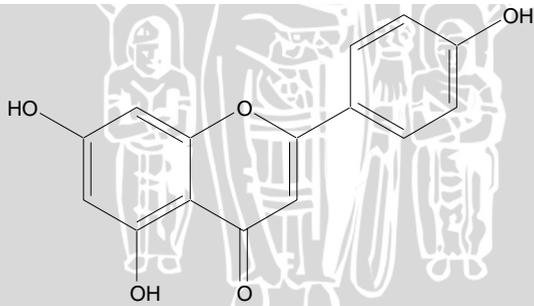
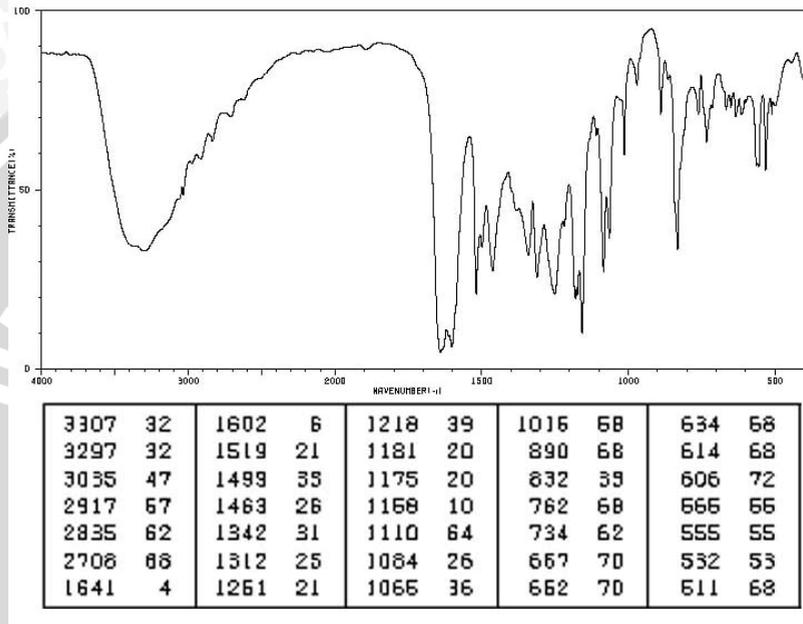
Isolat V



Isolat VI

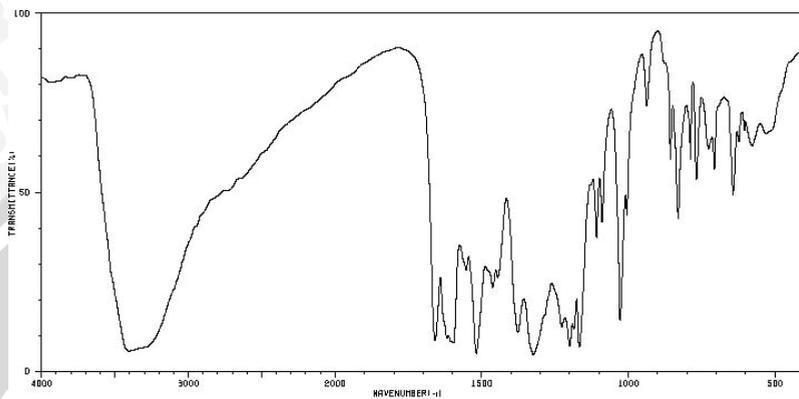
Lampiran 7. Spektra dan Bilangan Gelombang IR dari Beberapa senyawa Flavonoid (Kinugasa *et al*, 2006)

a. Spektra dan Bilangan Gelombang IR Naringenin

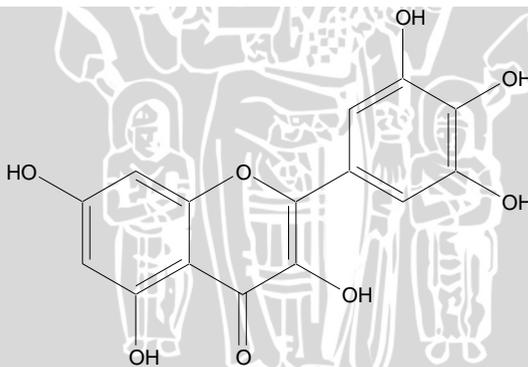


Naringenin

b. Spektra dan Bilangan Gelombang IR Mirisetin

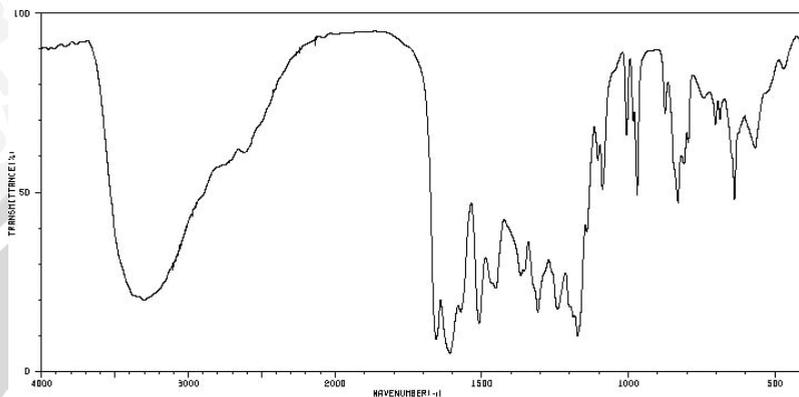


1660	8	1377	10	1089	41	769	62	630	64
1603	8	1324	4	1028	14	727	60	518	64
1596	7	1227	12	1005	42	707	55		
1554	27	1200	7	938	72	644	47		
1519	5	1187	12	856	57	623	62		
1464	23	1168	6	830	42	604	66		
1446	26	1109	36	788	67	678	60		

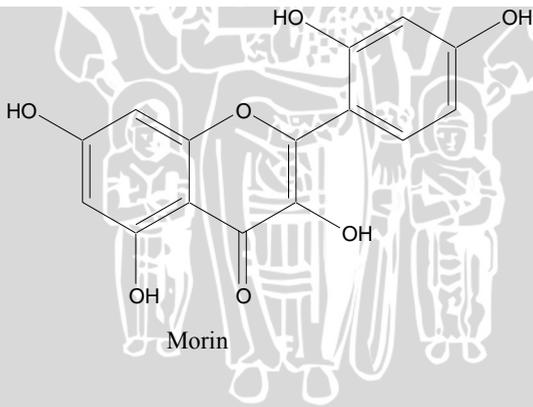


Mirisetin

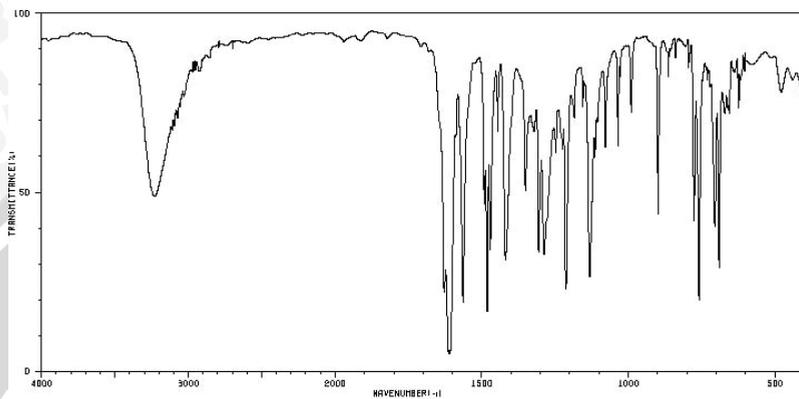
c. Spektra dan Bilangan Gelombang IR Morin



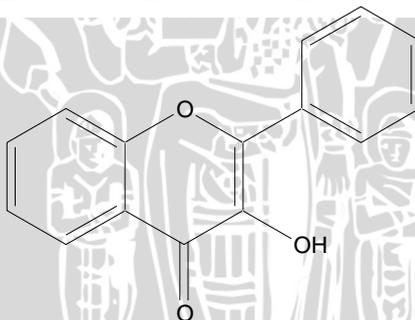
3299	19	1463	22	1174	9	876	70	639	46
3106	27	1367	26	1143	37	831	44	568	60
1855	8	1360	27	1104	57	811	55	471	61
1608	4	1366	26	1088	49	796	62		
1572	16	1309	16	1006	64	743	74		
1510	12	1242	17	983	86	704	66		
1464	23	1188	14	970	47	688	68		



d. Spektra dan Bilangan Gelombang IR Flavonol

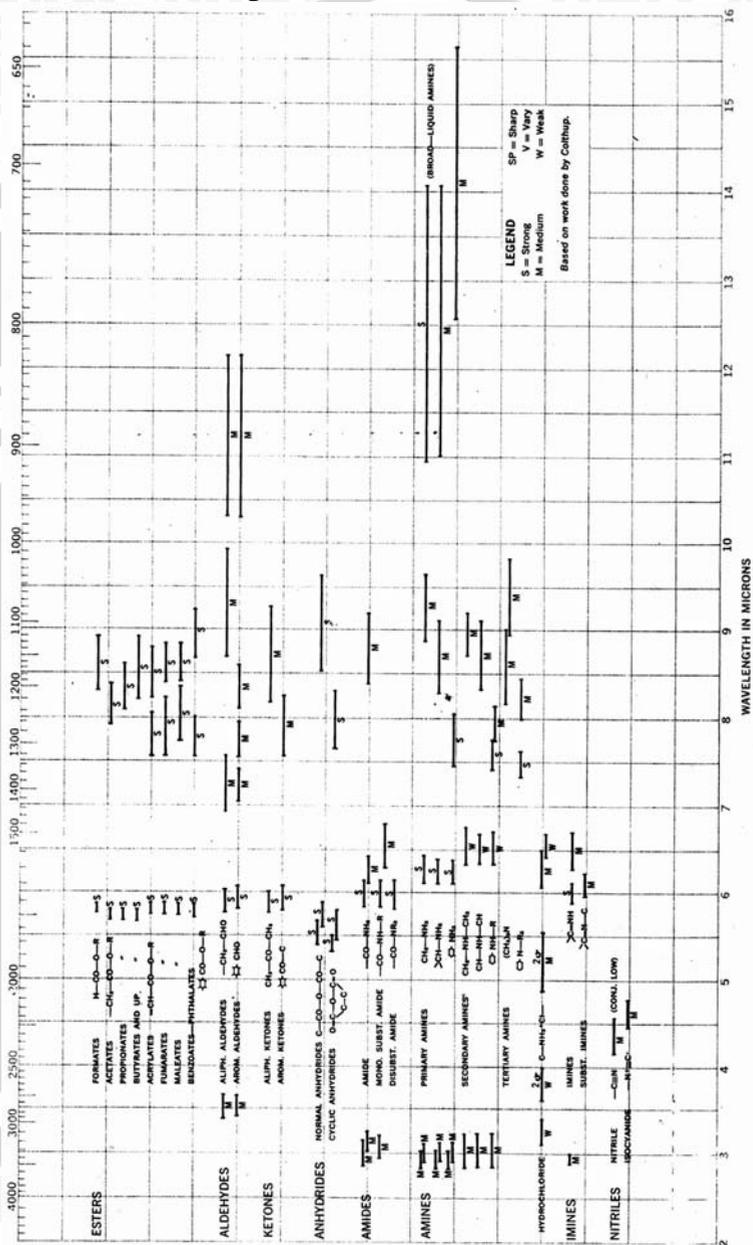


3227	47	1492	44	1306	32	1132	26	776	41
3096	66	1482	16	1288	32	1114	57	759	19
3073	88	1471	35	1278	41	1106	66	705	39
1628	21	1446	64	1248	68	1079	60	690	27
1613	5	1420	30	1225	60	1035	60	672	70
1606	4	1351	49	1213	22	990	70	664	70
1564	18	1321	64	1185	68	899	42	656	70

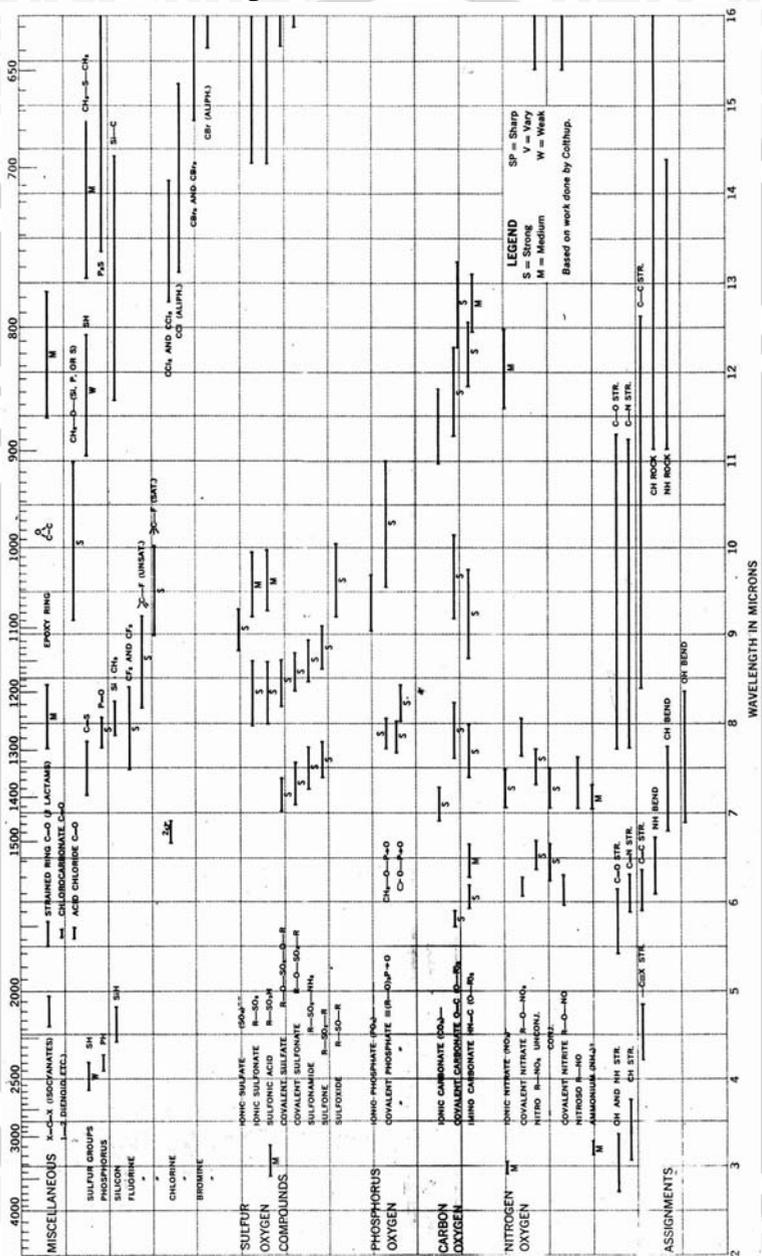


Flavonol

Lanjutan Interpretasi Spektra IR Berdasarkan Bilangan Gelombang (Silverstein *et al*, 1991)

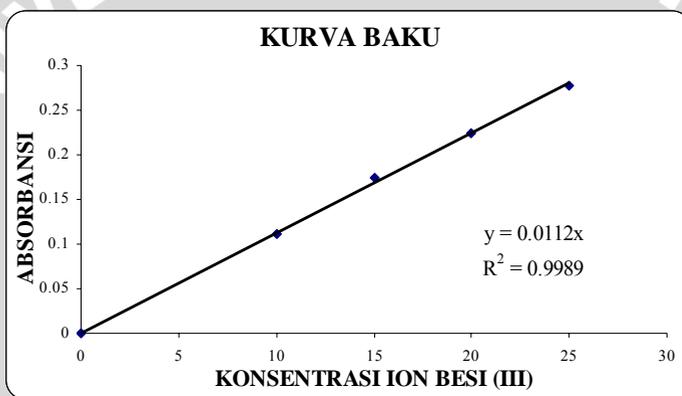


Lanjutan Interpretasi Spektra IR Berdasarkan Bilangan Gelombang (Silverstein et al, 1991)



Lampiran 9. Absorbansi Kompleks $\text{Fe}(\text{SCN})_5^{2-}$

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			
	I	II	III	rata-rata
10	0.116	0.099	0.118	0.111
15	0.168	0.187	0.170	0.175
20	0.224	0.196	0.253	0.224
25	0.280	0.284	0.270	0.278



Lampiran 10. Konsentrasi Peroksida Sampel

Konsentrasi peroksida ditentukan melalui persamaan berikut:

$$\text{Konsentrasi peroksida (mM)} = \frac{\text{konsentrasi Fe (mg/L)}}{\text{Ar Fe (mg/mmol)}} \times \text{fp}$$

Keterangan : fp = faktor pengenceran

Isolat	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi				Konsentrasi peroksida (mM)	Jumlah peroksida yang dihambat (%)
		I	II	III	rata-rata		
Kontrol	0	0.709	0.955	1.149	0.9377	4.4973	0
I	50	0.577	0.660	0.848	0.6950	3.3334	25.88
	100	0.267	0.729	0.826	0.6073	2.9129	35.23
	150	0.430	0.568	1.033	0.6770	3.2471	27.80
	200	0.532	0.620	0.772	0.6413	3.0760	31.60
II	50	0.342	0.612	0.804	0.5860	2.8106	37.50
	100	0.469	0.510	0.605	0.5280	2.5324	43.69
	150	0.132	0.527	0.826	0.4950	2.3742	47.21
	200	0.430	0.531	0.584	0.5150	2.4701	45.08
III	50	0.501	0.577	0.648	0.5753	2.7595	38.64
	100	0.729	0.778	0.790	0.7657	3.6723	18.34
	150	0.725	0.722	0.728	0.7250	3.4773	22.68
	200	0.586	0.590	0.588	0.5880	2.8202	37.29
IV	50	0.475	0.526	1.235	0.7453	3.5748	20.51
	100	0.542	0.569	0.921	0.6773	3.2487	27.76
	150	0.229	0.460	0.506	0.3983	1.9105	57.52
	200	0.487	0.536	0.562	0.5283	2.5340	43.65
V	50	0.444	0.492	0.519	0.4850	2.3262	48.28
	100	0.362	0.517	0.577	0.4853	2.3278	48.24
	150	0.546	0.544	0.548	0.5460	2.6188	41.77
	200	0.370	0.536	0.547	0.4843	2.3230	48.35
VI	50	0.427	0.668	0.692	0.5957	2.8570	36.47
	100	0.662	0.805	0.835	0.7673	3.6803	18.17
	150	0.771	0.784	0.797	0.7840	3.7603	16.39
	200	0.697	0.847	0.858	0.8007	3.8402	14.61
BHT	50	0.865	0.865	0.865	0.8650	4.1488	7.75
	100	0.914	1.029	0.863	0.9353	4.4861	0.25
	150	0.840	0.941	0.733	0.8380	4.0193	10.63
	200	0.779	0.892	0.796	0.8223	3.9441	12.30

Persamaan yang digunakan untuk menghitung angka peroksida yang dapat dihambat dengan penambahan isolat adalah sebagai berikut :

$$\sum \text{peroksida yang dihambat (\%)} = \frac{[\text{peroksida kontrol}] - [\text{peroksida ekstrak bunga}]}{[\text{peroksida kontrol}]} \times 100\%$$

Lampiran 11. Uji Statistik

Analisis data pengaruh isolat dan konsentrasi masing-masing isolat terhadap absorbansi.

Isolat	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Jumlah	rata-rata
		I	II	III		
I	50	0.577	0.660	0.848	2.085	0.6950
	100	0.267	0.729	0.826	1.822	0.6073
	150	0.430	0.568	1.033	2.031	0.6770
	200	0.532	0.620	0.772	1.924	0.6413
II	50	0.342	0.612	0.804	1.758	0.5860
	100	0.469	0.510	0.605	1.584	0.5280
	150	0.132	0.527	0.826	1.485	0.4950
	200	0.430	0.531	0.584	1.545	0.5150
III	50	0.501	0.577	0.648	1.726	0.5753
	100	0.729	0.778	0.790	2.297	0.7657
	150	0.725	0.722	0.728	2.065	0.7250
	200	0.586	0.590	0.588	1.906	0.5880
IV	50	0.475	0.526	1.235	2.236	0.7453
	100	0.542	0.569	0.921	2.032	0.6773
	150	0.229	0.460	0.506	1.195	0.3983
	200	0.487	0.536	0.562	1.585	0.5283
V	50	0.444	0.492	0.519	1.455	0.4850
	100	0.362	0.517	0.577	1.456	0.4853
	150	0.546	0.544	0.548	1.092	0.5460
	200	0.370	0.536	0.547	1.453	0.4843
VI	50	0.427	0.668	0.692	1.787	0.5957
	100	0.662	0.805	0.835	2.302	0.7673
	150	0.771	0.784	0.797	2.352	0.7840
	200	0.697	0.847	0.858	2.402	0.8007
BHT	50	0.865	0.865	0.865	3.122	0.8650
	100	0.914	1.029	0.863	2.806	0.9353
	150	0.840	0.941	0.733	2.514	0.8380
	200	0.779	0.892	0.796	2.467	0.8223

Untuk menguji ada tidaknya pengaruh isolat dan konsentrasi isolat terhadap aktivitas antioksidan, maka dilakukan uji F dua arah dengan membuat tabel dua arah untuk A dan B.

Tabel Dua Arah A (Isolat) dan B (Konsentrasi)

A (isolat)	B (Konsentrasi)				Total
	50	100	150	200	
I	2.085	1.822	2.031	1.924	7.862
II	1.758	1.584	1.485	1.545	6.372
III	1.726	2.297	2.175	1.764	7.962
IV	2.236	2.032	1.195	1.585	7.048
V	1.455	1.456	1.638	1.453	6.002
VI	1.787	2.302	2.352	2.402	8.843
BHT	2.595	2.806	2.514	2.467	10.382
Total	13.642	14.299	13.39	13.14	54.471

Keterangan :

A= Isolat

B= Konsentrasi

a= Jumlah isolat

b= Jumlah variasi konsentrasi

r= Jumlah pengulangan

1. Menghitung Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned} \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{\left[\sum_i \sum_j \sum_k Y_{ijk} \right]^2}{r \cdot a \cdot b} \\ &= \frac{54.471^2}{3 \times 7 \times 4} \\ &= 35.3225 \end{aligned}$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

$$\begin{aligned} \text{a. Jumlah Kuadrat}_{\text{Total}} (JK_T) &= \left[\sum_i \sum_j \sum_k Y^2_{ijk} \right] - FK \\ &= (0.577^2 + \dots + 0.796^2) - 35.3225 \\ &= 3.0703 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. Jumlah Kuadrat}_A (JK_A) &= \frac{\left[\sum_i \left(\sum_j \sum_k Y_{ijk} \right)^2 \right]}{r \cdot b} - FK \\
 &= \frac{\left(7.862^2 + \dots + 10.382^2 \right)}{3 \times 4} - 35.3225 \\
 &= 1.135
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. Jumlah Kuadrat}_B (JK_B) &= \frac{\left[\sum_i \left(\sum_j \sum_k Y_{ijk} \right)^2 \right]}{r \cdot a} - FK \\
 &= \frac{\left(13.642^2 + \dots + 13.14^2 \right)}{3 \times 7} - 35.3225 \\
 &= 0.0355
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{d. Jumlah Kudrat}_{AB} (JK_{AB}) &= \frac{\left[\sum_i \sum_j \left(\sum_k Y_{ijk} \right)^2 \right]}{r} - FK - JK_A - JK_B \\
 &= \frac{\left(2.085^2 + \dots + 2.467^2 \right)}{3} - 35.3225 - 1.135 - 0.0355 \\
 &= 0.4042
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{e. Jumlah Kuadrat}_{Galat} (JK_G) &= JK_T - JK_A - JK_B - JK_{AB} \\
 &= 3.0703 - 1.135 - 0.0355 - 0.4042 \\
 &= 1.496
 \end{aligned}$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT) setiap sumber keragaman

$$\text{a. Kuadrat tengah}_A (KT_A) = \frac{JK_A}{db_A}$$

$$= \frac{1.135}{6}$$

$$= 0.1892$$

b. Kuadrat tengah_B (KT_B)

$$= \frac{JK_B}{db_B}$$

$$= \frac{0.0355}{3}$$

$$= 0.0118$$

c. Kuadrat tengah_{AB} (KT_{AB})

$$= \frac{JK_{AB}}{db_{AB}}$$

$$= \frac{0.4042}{18}$$

$$= 0.0225$$

d. Kuadrat tengah_{Galat} (KT_G)

$$= \frac{JK_G}{db_G}$$

$$= \frac{1.496}{56}$$

$$= 0.0267$$

4. Menghitung F_{hitung}

a. F_{hitungA}

$$= \frac{KT_A}{KT_G}$$

$$= \frac{0.2624}{0.0044}$$

$$= 59.9164$$

b. F_{hitungB}

$$= \frac{KT_B}{KT_G}$$

$$= \frac{0.0396}{0.0044} = 9.0342$$

c. $F_{hitungAB}$

$$= \frac{KT_{AB}}{KT_G} = \frac{0.0358}{0.0044} = 8.1812$$

Analisa Ragam Pengaruh Isolat dan Konsentrasinya terhadap Absorbansi Kompleks

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F_{hitung}	F_{Tabel}	
					0.05	0.01
Perlakuan						
A	6	1.5744	0.2624	59.9164	2.266	3.144
B	3	0.0791	0.0396	9.0342	3.168	5.004
AB	18	0.4299	0.0358	8.1812	1.928	2.524
Galat	56	0.2456	0.0044			
Total	83					

Berdasarkan hasil analisis ragam diatas diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$ berarti ada perbedaan nyata antar perlakuan. Untuk mengetahui perlakuan yang berbeda dilakukan uji BNT 5%.

$$BNT_{\alpha} = t_{(\alpha/2; db)} \times \sqrt{\frac{2KT_G}{r}}$$

$$BNT_{0.05} = t_{(0.025; 56)} \times \sqrt{\frac{2 \times 0.0044}{3}}$$

$$= 2.303 \times 0.0541$$

$$= 0.1245$$

Selisih Dua Nilai Rataan Absorbansi

Rataan	0.3983	0.4843	0.4850	0.4853	0.4950	0.5150	0.5280
0.3983	0.0000	0.0860	0.0867	0.0870	0.0967	0.1167	0.1297
0.4843		0.0000	0.0007	0.0010	0.0107	0.0307	0.0437
0.4850			0.0000	0.0003	0.0100	0.0300	0.0430
0.4853				0.0000	0.0097	0.0297	0.0427
0.4950					0.0000	0.0200	0.0330
0.5150						0.0000	0.0130
0.5280							0.0000
0.5283							
0.5460							
0.5753							
0.5860							
0.5880							
0.5957							
0.6073							
0.6413							
0.6770							
0.6773							
0.6950							
0.7250							
0.7453							
0.7657							
0.7673							
0.7840							
0.8007							
0.8223							
0.8380							
0.8650							
0.9353							

0.7673	0.7840	0.8007	0.8223	0.8380	0.8650	0.9353
0.3690	0.3857	0.4024	0.4240	0.4397	0.4667	0.5370
0.2830	0.2997	0.3164	0.3380	0.3537	0.3807	0.4510
0.2823	0.2990	0.3157	0.3373	0.3530	0.3800	0.4503
0.2820	0.2987	0.3154	0.3370	0.3527	0.3797	0.4500
0.2723	0.2890	0.3057	0.3273	0.3430	0.3700	0.4403
0.2523	0.2690	0.2857	0.3073	0.3230	0.3500	0.4203
0.2393	0.2560	0.2727	0.2943	0.3100	0.3370	0.4073
0.2390	0.2557	0.2724	0.2940	0.3097	0.3367	0.4070
0.2213	0.2380	0.2547	0.2763	0.2920	0.3190	0.3893
0.1920	0.2087	0.2254	0.2470	0.2627	0.2897	0.3600
0.1813	0.1980	0.2147	0.2363	0.2520	0.2790	0.3493
0.1793	0.1960	0.2127	0.2343	0.2500	0.2770	0.3473
0.1716	0.1883	0.2050	0.2266	0.2423	0.2693	0.3396
0.1600	0.1767	0.1934	0.2150	0.2307	0.2577	0.3280
0.1260	0.1427	0.1594	0.1810	0.1967	0.2237	0.2940
0.0903	0.1070	0.1237	0.1453	0.1610	0.1880	0.2583
0.0900	0.1067	0.1234	0.1450	0.1607	0.1877	0.2580
0.0723	0.0890	0.1057	0.1273	0.1430	0.1700	0.2403
0.0423	0.0590	0.0757	0.0973	0.1130	0.1400	0.2103
0.0220	0.0387	0.0554	0.0770	0.0927	0.1197	0.1900
0.0016	0.0183	0.0350	0.0566	0.0723	0.0993	0.1696
0.0000	0.0167	0.0334	0.0550	0.0707	0.0977	0.1680
	0.0000	0.0167	0.0383	0.0540	0.0810	0.1513
		0.0000	0.0216	0.0373	0.0643	0.1346
			0.0000	0.0157	0.0427	0.1130
				0.0000	0.0270	0.0973
					0.0000	0.0703
						0.0000

Berdasarkan selisih dua nilai dua rata-rata absorbansi dibandingkan dengan nilai BNT 5%. Jika nilainya lebih besar maka terdapat perbedaan pengaruh yang nyata dari setiap perlakuan. Notasi dinyatakan sebagai berikut:

a = tidak berbeda nyata

b = berbeda nyata

Notasi pengaruh isolat dan konsentrasi isolat terhadap absorbansi kompleks

Isolat	Konsentrasi	Rataan	Notasi
I	50	0.6950	b
	100	0.6073	b
	150	0.6770	b
	200	0.6413	b
II	50	0.5860	b
	100	0.5280	b
	150	0.4950	a
	200	0.5150	a
III	50	0.5753	b
	100	0.7657	b
	150	0.7250	b
	200	0.5880	b
IV	50	0.7453	b
	100	0.6773	b
	150	0.3983	a
	200	0.5283	b
V	50	0.4850	a
	100	0.4853	a
	150	0.5460	b
	200	0.4843	a
VI	50	0.5957	b
	100	0.7673	b
	150	0.7840	b
	200	0.8007	b
BHT	50	0.8650	b
	100	0.9353	b
	150	0.8223	b
	200	0.8380	b

Lampiran 12. Gambar Penelitian



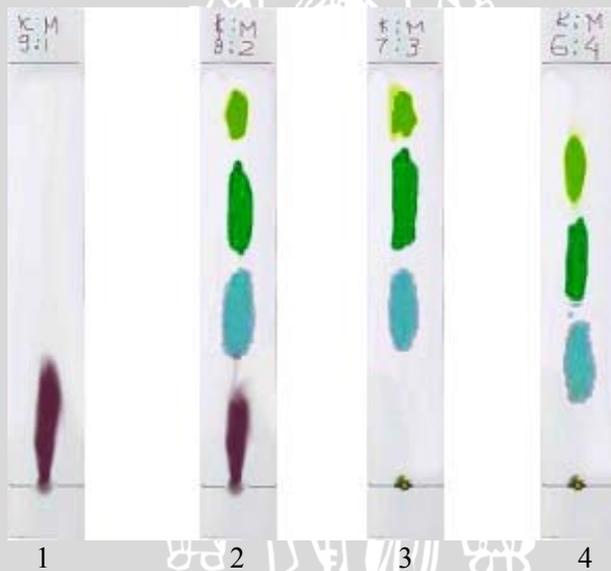
Gambar Pohon *Spathodea campanulata* Beauv.



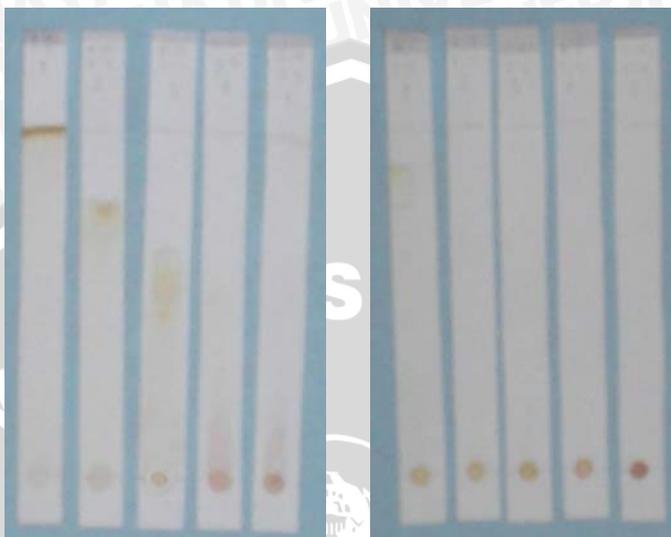
Gambar Bunga *Spathodea campanulata* Beauv



Gambar Hasil Uji Pendahuluan Adanya Flavonoid



Gambar Kromatogram Ekstrak Bunga *S. Campanulata*



Kloroform:metanol = 7:3 n-heksana:etil asetat = 7:3

Gambar Kromatogram Isolat Bunga *S. campanulata*



Gambar Warna Pita Hasil *Flash* Kromatografi Kolom