

LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN JURUSAN KIMIA  
Tahun Anggaran 2006



EKSPLORASI SENYAWA FENOLIK  
dari *Cassia spectabilis*  
dan  
UPAYA PENENTUAN HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR  
DAN AKTIVITASNYA SEBAGAI INHIBITOR  
PEMBENTUKAN ASAM URAT

Dr. Alfinda Novi Kristanti  
Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.  
Drs. Mulyadi Tanjung, MS.

PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Agustus 2007

**LAPORAN**  
**HIBAH PENELITIAN JURUSAN KIMIA**  
**Tahun Anggaran 2006**



44 G-44  
LP.67/13  
kri  
e

**EKSPLORASI SENYAWA FENOLIK**  
*dari **Cassia spectabilis***  
**dan**  
**UPAYA PENENTUAN HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR**  
**DAN AKTIVITASNYA SEBAGAI INHIBITOR**  
**PEMBENTUKAN ASAM URAT**

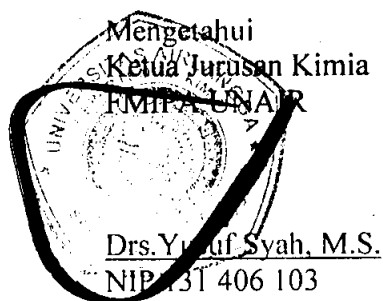
**Dr. Alfinda Novi Kristanti**  
**Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si.**  
**Drs. Mulyadi Tanjung, MS.**

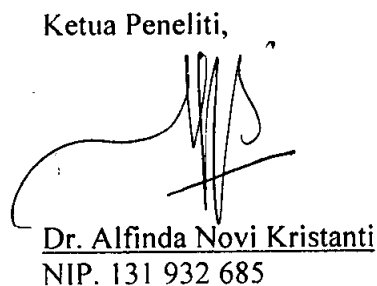
**PROGRAM STUDI KIMIA**  
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**  
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**Agustus 2007**

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN  
LAPORAN AKHIR PENELITIAN**

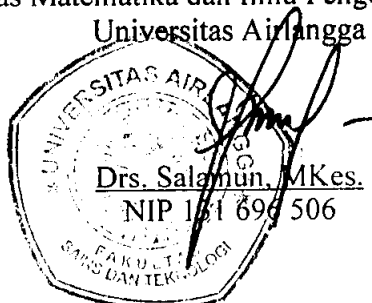
<b>1. Judul Penelitian</b> : EKSPLORASI SENYAWA FENOLIK DARI <i>Cassia spectabilis</i> DAN UPAYA PENENTUAN HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR DAN AKTIVITAS SEBAGAI INHIBITOR PEMBENTUKAN ASAM URAT	
<b>2. Kepala Proyek Penelitian</b>	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Dr. Alfinda Novi Kristanti
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan/NIP	: Penata Tk. I/III-D/131 932 685
d. Jabatan sekarang	: Lektor Kepala
e. Fakultas/Jurusan	: MIPA/Kimia
f. Universitas	: Universitas Airlangga
g. Bidang ilmu yang diteliti	: Kimia Organik Bahan Alam
<b>3. Jumlah Tim Peneliti</b>	: 3 (tiga) orang
<b>4. Lokasi Penelitian</b>	: Laboratorium Kimia Organik FMIPA UNAIR
<b>6. Jangka waktu penelitian</b>	: 12 bulan
<b>7. Biaya yang diperlukan</b>	:
<b>8. Seminar Hasil Penelitian</b>	
a. Dilaksanakan Tanggal	:
b. Hasil Penelitian	: ( ) Baik Sekali ( ) Baik ( ) Sedang ( ) Kurang

Surabaya, Agustus 2007

Mengetahui  
Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA UNAIR  
  
Drs. Yusuf Syah, M.S.  
NIP. 131 406 103

Ketua Peneliti,  
  
Dr. Alfinda Novi Kristanti  
NIP. 131 932 685

Menyetujui :  
Dekan  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Airlangga

  
Drs. Salamun, MKes.  
NIP. 131 696 506

## RINGKASAN

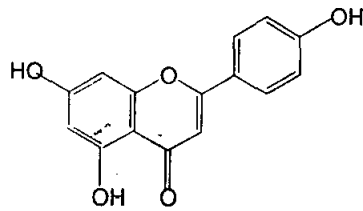
### EKSPLORASI SENYAWA FENOLIK dari *Cassia spectabilis* DAN UPAYA PENENTUAN HUBUNGAN ANTARA STRUKTUR DAN AKTIVITASNYA SEBAGAI INHIBITOR PEMBENTUKAN ASAM URAT

(Alfinda Novi Kristanti, Nanik Siti Aminah, Mulyadi Tanjung)  
Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga Surabaya  
Kampus C, Jl. Mulyorejo Surabaya, 60115. Telp. 031-5936501

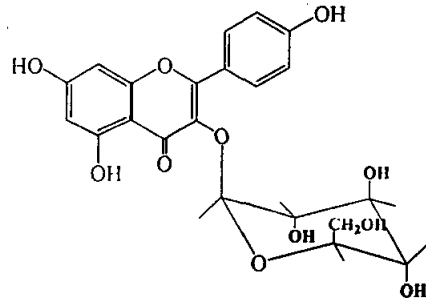
Senyawa flavonoid dan antrakuinon banyak memperlihatkan aktivitas antioksidan yang potensial. Senyawa antioksidan mempunyai sifat di antaranya dapat menangkap radikal bebas (*scavengers*) dan menghambat aktivitas enzim yang terlibat dalam produksi *reactive oxygen species* ROS (*preventing*). Salah satu contoh senyawa antioksidan yang bersifat menghambat aktivitas enzim adalah senyawa yang berfungsi sebagai inhibitor enzim *xanthine oxidase* yaitu enzim yang mengoksidasi *xanthine* menjadi asam urat. Dengan demikian senyawa yang mampu menghambat enzim *xanthine oxidase* akan dapat digunakan untuk mencegah terbentuknya asam urat.

Penelitian ini pada dasarnya bertujuan untuk mengisolasi senyawa fenolik lain yang terdapat pada ekstrak etil asetat kulit batang *Cassia spectabilis*. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode yang biasa digunakan dalam mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman. Senyawa fenolik murni yang diperoleh ditentukan struktur molekulnya dengan metode spektroskopi dan diuji aktivitas sebagai inhibitor pembentukan asam urat dengan menggunakan enzim *xanthine oxidase*. Selanjutnya seluruh senyawa fenol yang telah ditentukan struktur dan diuji aktivitasnya akan dianalisis hubungan antara struktur dan aktivitasnya terhadap inhibitor *xanthine oxidase*. Disamping itu kemampuan sebagai inhibitor *xanthine oxidase* ini juga dibandingkan dengan alupurinol yang selama ini sudah digunakan di pasaran untuk obat asam urat. Dengan demikian akan dapat diketahui efektifitas senyawa-senyawa hasil isolasi tersebut jika digunakan sebagai obat asam urat dibandingkan dengan allopurinol.

Senyawa-senyawa fenolik yang berhasil diisolasi pada penelitian ini adalah :



Apigenin



Kaempferol-3-O-glukosida

Senyawa fenolik hasil isolasi memiliki aktivitas sebagai inhibitor terhadap *xanthine oxidase* dengan harga  $IC_{50}$  untuk apigenin adalah  $0,71 \mu\text{M}$  dan untuk kaempferol-3-O-glukosida adalah  $0,7904 \mu\text{M}$ . Hasil analisis hubungan struktur-aktivitas senyawa fenolik menguatkan dugaan sebelumnya bahwa semakin banyak gugus hidroksil yang terikat pada inti aromatis, maka senyawa akan makin aktif sebagai inhibitor *xanthine oxidase*.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Kasih, karena hanya berkat pertolonganNya, penelitian dan penyusunan laporan ini bisa terselesaikan. Penelitian ini dilakukan sebagai upaya pencarian bahan-bahan obat terutama dalam hal ini yang berkaitan dengan asam urat. Dimulai dengan proses isolasi menghasilkan beberapa senyawa yang kemudian diuji sebagai inhibitor pembentukan asam urat, akan dapat diketahui model senyawa yang memiliki aktivitas tinggi. Dari informasi yang diperoleh, selanjutnya di masa yang akan datang akan dapat disintesis senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas lebih tinggi lagi.

Melalui kesempatan ini, kami mengucapkan terima kasih atas kesempatan, fasilitas dan semua bantuan yang telah diberikan kepada kami, terutama kepada :

1. Pimpinan Jurusan Kimia FMIPA
2. Para mahasiswa yang telah melakukan sebagian besar penelitian ini sebagai bahan skripsi
3. Rekan-rekan sejawat, mahasiswa, laboran dan analis di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga
4. Pihak UTM yang telah mengizinkan proses analisis beberapa senyawa dengan NMR

Kami menyadari bahwa laporan ini belum sempurna, meskipun demikian kami berharap semoga penelitian ini berguna dan bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Agustus 2007

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii	
RINGKASAN	iii	
KATA PENGANTAR	v	
DAFTAR ISI	vi	
DAFTAR GAMBAR	vii	
DAFTAR TABEL	ix	
BAB I	PENDAHULUAN	
	1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
	1.2. Rumusan Masalah	3
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	
	2.1. Hemiselulosa	4
	2.2. Enzim Xilanolitik	5
	2.3. Esterifikasi	10
	2.4. Eterifikasi	11
BAB III	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
	3.1. Tujuan Penelitian	13
	3.2. Manfaat Penelitian	13
BAB IV	METODE PENELITIAN	
	4.1. Lokasi Penelitian	14
	4.2. Bahan dan Alat Penelitian	14
	4.3. Prosedur Kerja	14
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	16
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	21
DAFTAR PUSTAKA	22	

## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar-1. Flavonoid yang telah diisolasi dari kulit batang <i>Cassia spectabilis</i>	1
Gambar-2. Senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari kulit batang <i>Cassia spectabilis</i>	6
Gambar-3. Tiga struktur dasar flavonoid	7
Gambar-4. Sepuluh kelompok pembagian senyawa golongan flavonoid	8
Gambar-5. Biosintesis flavonoid	9
Gambar-6. Beberapa flavonoid yang telah diisolasi dari berbagai spesies <i>Cassia</i>	10
Gambar-7. Metabolisme nukleotida protein	11
Gambar-8. Spektrum UV-vis senyawa CS-04 dalam MeOH	26
Gambar-9. Struktur resonansi gugus sinamoil dan gugus benzoil senyawa flavonoid	26
Gambar-10. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+AlCl <sub>3</sub> )	27
Gambar-11. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+AlCl <sub>3</sub> + HCl)	27
Gambar-12. Pembentukan kompleks Al <sup>3+</sup> dengan senyawa flavonoid	28
Gambar-13. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+NaOAc)	28
Gambar-14. Senyawa CS-04 setelah ditambah NaOAc dan H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	29
Gambar-15. Posisi proton-proton aromatis berdasarkan data dari spektrum Proton-RMI	30
Gambar-16. Gambar struktur senyawa CS-04 hasil isolasi	31
Gambar-17. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH)	31
Gambar-18. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH+AlCl <sub>3</sub> )	32
Gambar-19. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH+NaOAc)	32
Gambar-20. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH)	33
Gambar-21. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH+AlCl <sub>3</sub> )	34
Gambar-22. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH+NaOAc)	34
Gambar-23. Struktur senyawa CS-03 hasil isolasi	36



Gambar-24. Aktualisasi posisi proton senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi	37
Gambar-25. Aktualisasi posisi karbon senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi	37

## DAFTAR TABEL

	<b>Hal</b>
<b>Tabel-4.1.</b> Uji KLT senyawa CS-04 hasil isolasi	24
<b>Tabel-4.2.</b> Uji KLT senyawa CS-05 hasil isolasi	24
<b>Tabel-4.3</b> Uji KLT senyawa CS-03 hasil isolasi	26
<b>Tabel-4.4.</b> Perbandingan $^1\text{H}$ -RMI senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi dengan senyawa kaempferol-3-O-glukosida pada literatur	38
<b>Tabel-4.5.</b> Perbandingan $^{13}\text{C}$ -RMI senyawa kaempferol-3-O-glukosida dengan senyawa kaempferol-3-O-glukosida pada literature	39
<b>Tabel-4.6.</b> Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor <i>xanthine oxidase</i> dengan berbagai konsentrasi apigenin	40
<b>Tabel-4.7.</b> Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor <i>xanthine oxidase</i> dengan berbagai konsentrasi kaempferol-3-O-glukosida	41

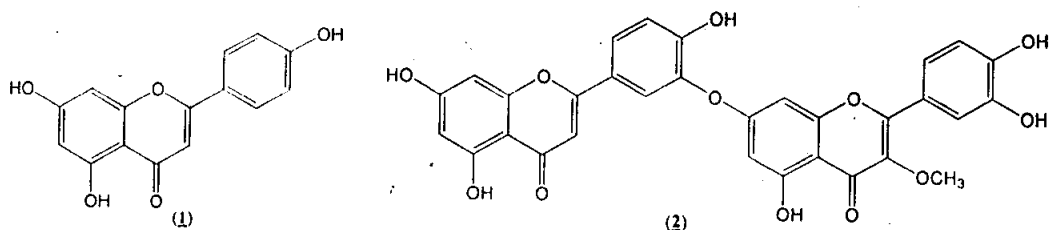
## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

*Cassia spectabilis* merupakan salah satu spesies dari famili Leguminosae. Kandungan senyawa metabolit sekunder famili ini beraneka ragam dan menarik, misalnya senyawa fenolik golongan flavonoid, antrakuinon, alkaloid dan stilben. Di samping itu, tanaman ini juga mengandung senyawa non fenolik yaitu golongan terpenoid dan steroid (Heyne, 1987; Viegas, 2004).

Senyawa flavonoid dan antrakuinon banyak memperlihatkan aktivitas antioksidan yang potensial. Senyawa antioksidan mempunyai sifat di antaranya dapat menangkap radikal bebas (*scavengers*) dan menghambat aktivitas enzim yang terlibat dalam produksi *reactive oxygen species* ROS (*preventing*). Salah satu contoh senyawa antioksidan yang bersifat menghambat aktivitas enzim adalah senyawa yang berfungsi sebagai inhibitor enzim *xanthine oxidase* yaitu enzim yang mengoksidasi xanthine menjadi asam urat. Dengan demikian senyawa yang mampu menghambat enzim *xanthine oxidase* akan dapat digunakan untuk mencegah terbentuknya asam urat.

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh kelompok kami terhadap kulit batang tanaman ini berhasil mengisolasi dua senyawa fenolik golongan flavonoid yaitu apigenin (1) dan apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter (2) (Amiroh, 2005).



Gambar-1. Flavonoid yang telah diisolasi dari kulit batang *Cassia spectabilis*

Uji aktivitas sebagai inhibitor xanthine oxidase hanya dilakukan terhadap senyawa (2) sedangkan terhadap senyawa (1) tidak dapat dilakukan karena keterbatasan jumlah (kuantitas) senyawa yang diisolasi. Dari uji yang dilakukan

diketahui bahwa senyawa (2) mempunyai  $IC_{50}$  sebesar  $4,52 \times 10^{-2} \mu M$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa (2) mempunyai aktivitas yang cukup tinggi sebagai inhibitor xanthine oxidase karena mempunyai harga  $IC_{50} < 100 \mu M$  (Cos, 1998).

Disamping dua senyawa fenolik yang telah berhasil diisolasi tersebut, pada ekstrak etil asetat ini, berdasarkan hasil uji TLC autografi, masih memperlihatkan adanya beberapa senyawa fenolik lain yang bersifat sebagai antioksidan. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan isolasi lebih lanjut terhadap senyawa fenolik dari ekstrak etil asetat kulit batang *Cassia spectabilis*.

Penelitian ini pada dasarnya bertujuan untuk mengisolasi senyawa fenolik lain yang terdapat pada ekstrak etil asetat kulit batang *Cassia spectabilis*. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode yang biasa digunakan dalam mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman. Senyawa fenolik murni yang diperoleh ditentukan struktur molekulnya dengan metode spektroskopi dan diuji aktivitas sebagai inhibitor pembentukan asam urat dengan menggunakan enzim xanthine oxidase. Selanjutnya seluruh senyawa fenol yang telah ditentukan struktur dan diuji aktivitasnya akan dianalisis hubungan antara struktur dan aktivitasnya terhadap inhibitor xanthine oxidase. Disamping itu kemampuan sebagai inhibitor xanthine oxidase ini juga dibandingkan dengan alupurinol yang selama ini sudah digunakan di pasaran untuk obat asam urat. Dengan demikian akan dapat diketahui efektifitas senyawa-senyawa hasil isolasi tersebut jika digunakan sebagai obat asam urat dibandingkan dengan allopurinol.

## 1.2. Rumusan Permasalahan :

1. Bagaimanakah struktur kimia senyawa fenolik lain yang diisolasi dari kulit batang *Cassia spectabilis* ?
2. Bagaimanakah daya hambat  $IC_{50}$  senyawa fenolik hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase*.
3. Bagaimanakah hubungan antara struktur dan aktivitas dari senyawa-senyawa hasil isolasi terhadap daya hambatnya terhadap *xanthine oxidase*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Leguminosae

Leguminosae merupakan salah satu famili tumbuhan terbesar di permukaan bumi yang terdistribusi di daerah tropis dan subtropis. Famili Leguminosae terdiri dari 91 genus dan 600 spesies. Genus yang paling dominan adalah: *Acassia*, *Cassia*, *Crotalaria*, *Desmodium*, dan *Indigofera*. Famili tumbuhan ini umumnya mempunyai tinggi pohon sekitar 2 sampai 20 m dan dapat tumbuh mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi (Heyne, 1987). Pada umumnya akar dari spesies famili ini dilengkapi dengan tuberkles (semacam kantung) yang mengandung bakteri kaya nitrogen dari genus rhizobium sehingga tumbuhan ini dapat mengambil lebih banyak nitrogen dari atmosfer (Harborne, 1984).

Di Indonesia, famili tumbuhan ini dikenal sebagai tumbuhan polong-polongan, menghasilkan senyawa kimia yang bermanfaat sebagai bahan makanan, bahan pencahar dan pewarna, bahan serat, penghasil minyak atsiri, dan obat-obatan (Heyne, 1987).

Kandungan kimia yang terdapat dalam tumbuhan famili Leguminosae antara lain oligostilbenoid yang berhasil diisolasi dari genus *Caragana* dan genus *Sophora* (Kitanaka, 1996). Selain itu juga terdapat senyawa flavonoid yaitu eukrestafavanon, shophoraflavon G, dan leacianon A (Kang, 2000; Ohyama, 1995).

#### 2.2. *Cassia*

*Cassia* merupakan salah satu genus yang paling dominan dari Leguminosae. *Cassia* mempunyai 21 spesies dengan keanekaragaman yang kompleks baik mengenai struktur, morfologi, maupun kandungan kimianya. Tumbuhan ini beradaptasi dan tumbuh dengan baik dalam daerah dengan ketinggian, temperatur, dan curah hujan yang sedang (Heyne, 1987).

Ciri khas spesies *Cassia* diantaranya terkenal oleh kecantikan bunganya dengan variasi warna mulai dari kuning, putih, merah, ungu, merah muda atau dalam beberapa campuran sehingga banyak ditanam sebagai tanaman hias dan pohon pelindung di tepi jalan raya (Heyne, 1987).

*Cassia* banyak dimanfaatkan sebagai obat antara lain: *Cassia* sp. digunakan sebagai anti diabetes dalam pengobatan rakyat India meskipun belum diketahui komponen yang berkhasiat; daun *Cassia alata* untuk obat sakit herpes dan obat kudis yang menular; daun *Cassia angustifolia* untuk obat pencahar; kayu *Cassia singuena* untuk obat sakit perut, obat mual, dan gigitan ular; daun *Cassia occidentalis* untuk obat sakit gigi (Heyne, 1987; Raphael, 1976; Hutapea, 1991).

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam *Cassia* diantaranya adalah terpenoid, steroid, alkaloid, flavonoid dan antrakuinon. Senyawa organik bahan alam yang telah diisolasi dari spesies *Cassia* antara lain isoliquiritigenin, emodin, asam krisofanat pada *Cassia javanica* (Tiwari, 1978), 4,4'-bis(1,3,8-trihidroksi-2-metil-6-metoksi antrakuinon), sapogenol, isophan, 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,22-trihidroksi isophan pada *Cassia hirsuta* (Singh, 1986), torosakrison, naftalen lakton, isotalakton, dan cassialakton pada *Cassia obtusifolia* (Kitanaka, 1981), Ombuin (3,5,3-trihidroksi-7,4'-dimetoksiflavin), 3-O-(2-rhamnosilglukosil)-ombuin, emodin, fiscion 8-galactoside, fiscion pada *Cassia laevigata* (Tiwari, 1979), pectolinarigenin, flavanon 5-rhamnosida, dan quersetagetin-3,6-dimetil eter pada *Cassia renigera* (Tiwari, 1976), krisopanol, emodin, fiscion, citreorosein, rhein, rhein metil ester, stigmaterol, skopoletin, dan isoskopoletin pada *Cassia fistula* L (Lee, 2001). Kaempferol, kaempferol-3-gentiobiosida, dan aloe emodin pada *Cassia alata* (Moriyama, 2001; Pharkphoom, 2004), dan cassiadinine, dihidroisokumarin, (+)-6-hidroksimellein,  $\gamma$ -sitosterol, friedelin, betulin, 5-asetonil-7-hidroksi-2-metilkromon, sikloart-23-ene-3 $\beta$ ,25-diol pada *Cassia siamea* (Biswas, 1985).

### 2.3. *Cassia spectabilis* DC

*Cassia spectabilis* DC merupakan salah satu spesies dari genus *Cassia* yang terdapat di Indonesia. Tinggi pohon, kira-kira 15-20 kaki. Daunnya lebat dan berwarna hijau, daun menyirip ganjil, bentuk daun oblong, panjang daun sekitar 2-4 inci, dan daun bertipe hijau sepanjang musim. *Cassia spectabilis* DC memiliki bunga yang berwarna kuning cerah. Buahnya memiliki panjang kira-kira 6-12 inci dengan bentuk memanjang, berwarna coklat, berupa polongan, dan letaknya tersembunyi di antara dedaunan. Batang *Cassia spectabilis* DC berwarna kehijauan, bentuk rendah, berdiameter besar, dan memiliki banyak duri-duri kecil serta cabang yang hampir tak

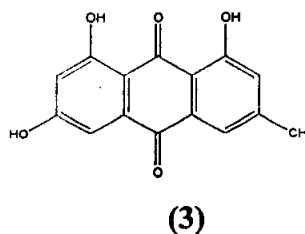
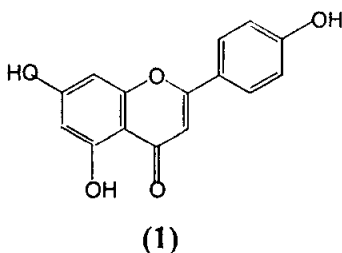
terlihat karena tertutup daunnya yang lebat dan bunganya yang banyak. Tumbuhan *Cassia spectabilis* DC banyak ditanam di pinggir jalan sebagai tanaman pelindung karena strukturnya yang lebat (Gilman, 2004).

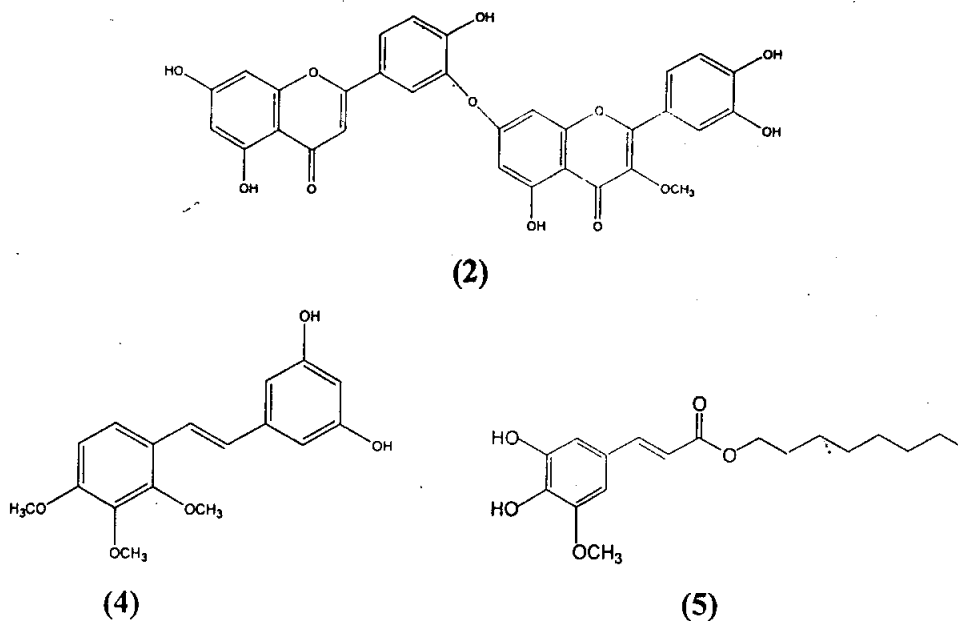
*Cassia spectabilis* DC memiliki nama daerah kayu uler dan dikenal sebagai pohon yang tumbuh liar. Tanaman ini digunakan sebagai obat tradisional untuk mencegah pertumbuhan mikroba, mengurangi rasa sakit (analgesik) dan anti inflamasi. Batangnya yang sudah tua sangat disukai untuk tiang rumah karena kayunya awet walaupun dimasukkan dalam tanah (Heyne, 1987).

Senyawa yang telah berhasil diisolasi dari daun *Cassia spectabilis* yaitu senyawa golongan steroid yaitu  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol, golongan antrakuinon yaitu 1,8-dihidroksi-3-metil-6-metoksiantrakuinon (fiscion), 1,3,8-trihidroksi-2-metilantrakuinon, golongan alkaloid yaitu 2-dodeksilasetil-5-hidroksil-6-metil piperidin dan 2-dekasilasetil-5-hidroksil-6-metil piperidin (Mulchandani, 1977). Dari kulit batang tumbuhan ini berhasil diisolasi senyawa golongan flavonoid yaitu 5,7,4'-trihidroksi flavon (apigenin) (1) dan apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter (2) (Amiroh, 2005), golongan antrakuinon yaitu 1,6,8-trihidroksi-3-metil antrakuinon (emodin) (3) (Prajitno, 2006), golongan stilbenoid yaitu 3',5'-dihidroksi-2,3,4-trimetoksi stilben (4) (Indriani, 2005) dan golongan sinamat yaitu *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat (5) (Rochmawati, 2006).

Pada bagian buah dan bunga tanaman ini juga dilaporkan adanya tiga alkaloid piperidin yaitu (-)-3-O-asetilspektalin, (-)-7-hidroksispektalin serta iso-6-spektalin (Viegas, 2004).

Apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter memperlihatkan aktivitas anti asam urat yang tinggi (Amiroh, 2005). Senyawa 3',5'-dihidroksi-2,3,4-trimetoksi stilben dan *trans* oktil-4,5-dihidroksi-3-metoksi sinamat juga memperlihatkan aktivitas yang tinggi terhadap pereaksi radikal bebas (DPPH) (Indriani, 2005; Rochmawati, 2006).





Gambar-2. Senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari kulit batang *Cassia spectabilis*

Menurut Tjitrosoepomo (1993) kedudukan *Cassia spectabilis* DC dalam taksonomi tumbuhan sebagai berikut:

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

## 2.4. Flavonoid

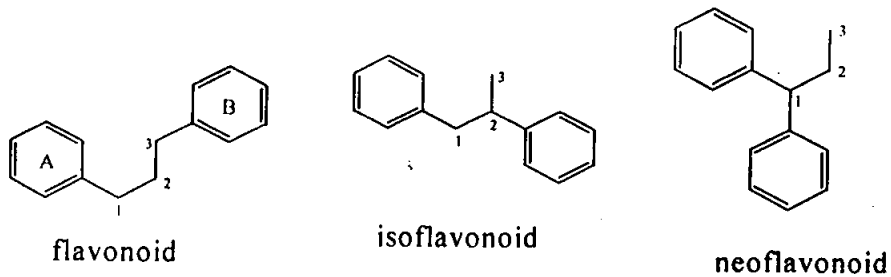
### 2.4.1. Flavonoid secara umum

Flavonoid adalah salah satu senyawa golongan fenol alam terbesar yang terdapat dalam tumbuhan. Penyebaran flavonoid terbatas pada golongan tumbuhan dengan tingkat kerumitan yang lebih tinggi. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah, dan biji



(Markham, 1988). Beberapa fungsi flavonoid untuk tumbuhan antara lain sebagai zat pengatur pertumbuhan, pengatur fotosintesis, pengatur kerja terhadap antimikroba dan antivirus serta terhadap serangga (Robinson, 1995).

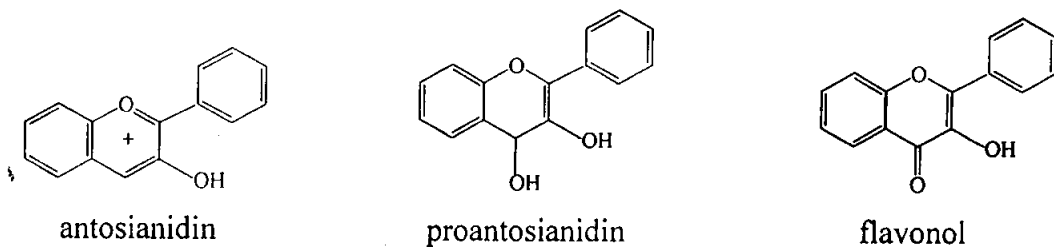
Struktur flavonoid mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988). Struktur flavonoid yang kerangka karbonnya terdiri dari dua cincin aromatik dihubungkan oleh rantai alifatik tiga karbon menghasilkan tiga jenis struktur, yaitu 1,3-diarilpropana (flavonoid), 1,2-diarilpropana (isoflavonoid), dan 1,1-diarilpropana (neoflavonoid) (Achmad, 1986).

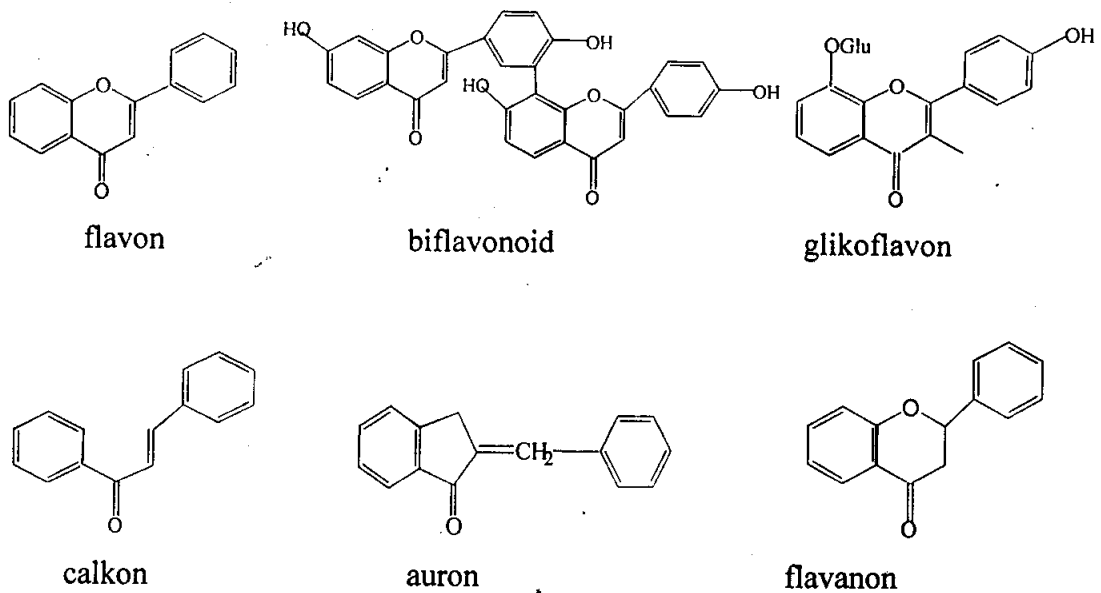


Gambar-3. Tiga struktur dasar flavonoid

Struktur flavonoid terdiri atas tiga cincin yakni cincin A, B, dan C dengan atom karbon dinomori menurut sistem penomoran yang menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C serta angka aksen untuk cincin B (Markham, 1988).

Senyawa flavonoid dapat dibagi menjadi sepuluh kelas, yaitu: antosianidin, proantosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonoid, calkon, auron, flavanon, dan isoflavon (Harborne, 1987).

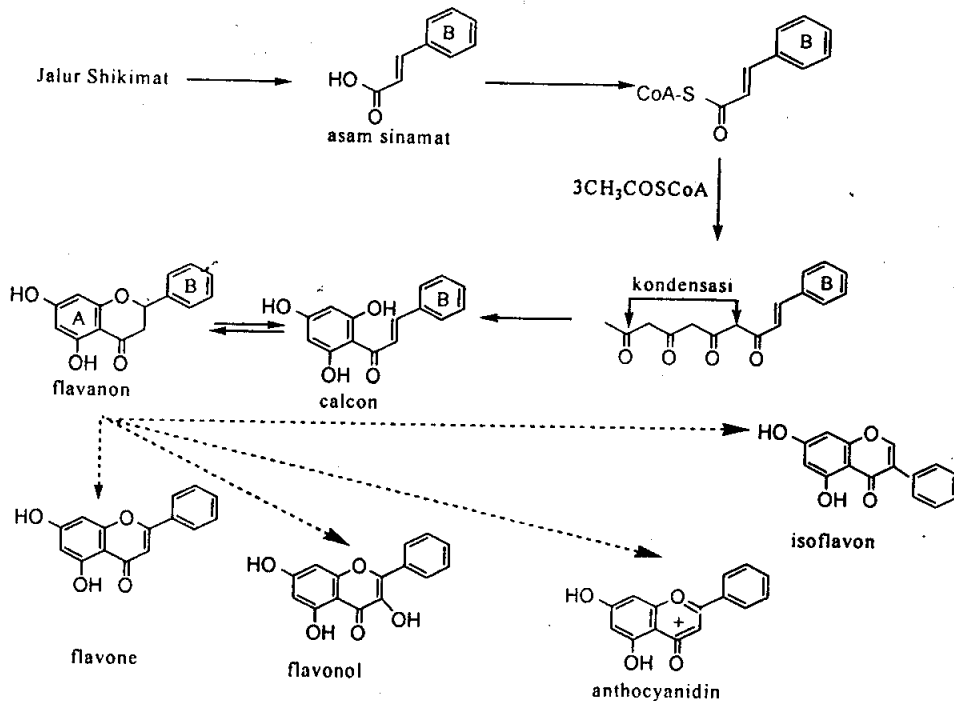




Gambar-4. Sepuluh kelompok pembagian senyawa golongan flavonoid

Kerangka pembentukan senyawa flavonoid saling berkaitan karena berasal dari jalur biosintesis yang sama, yaitu jalur shikimat dan jalur asetat-malonat. Cincin A pada struktur flavonoid berasal dari jalur poliketid, yaitu kondensasi dari tiga unit asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan tiga atom karbon dari rantai propan berasal dari jalur fenil-propanoid (jalur shikimat). Biosintesis flavonoid dapat dilihat pada Gambar-1.

Menurut biosintesis ini, pembentukan flavonoid dimulai dengan memperpanjang unit fenilpropanoid (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) yang berasal dari turunan sinamat seperti asam p-kumarat, kadang-kadang asam kafeat, asam ferulat atau asam sinapat. Dari percobaan dapat diketahui bahwa calkon dan flavanon berperan sebagai senyawa antara dalam biosintesis berbagai jenis flavonoid lainnya (Achmad, 1986).

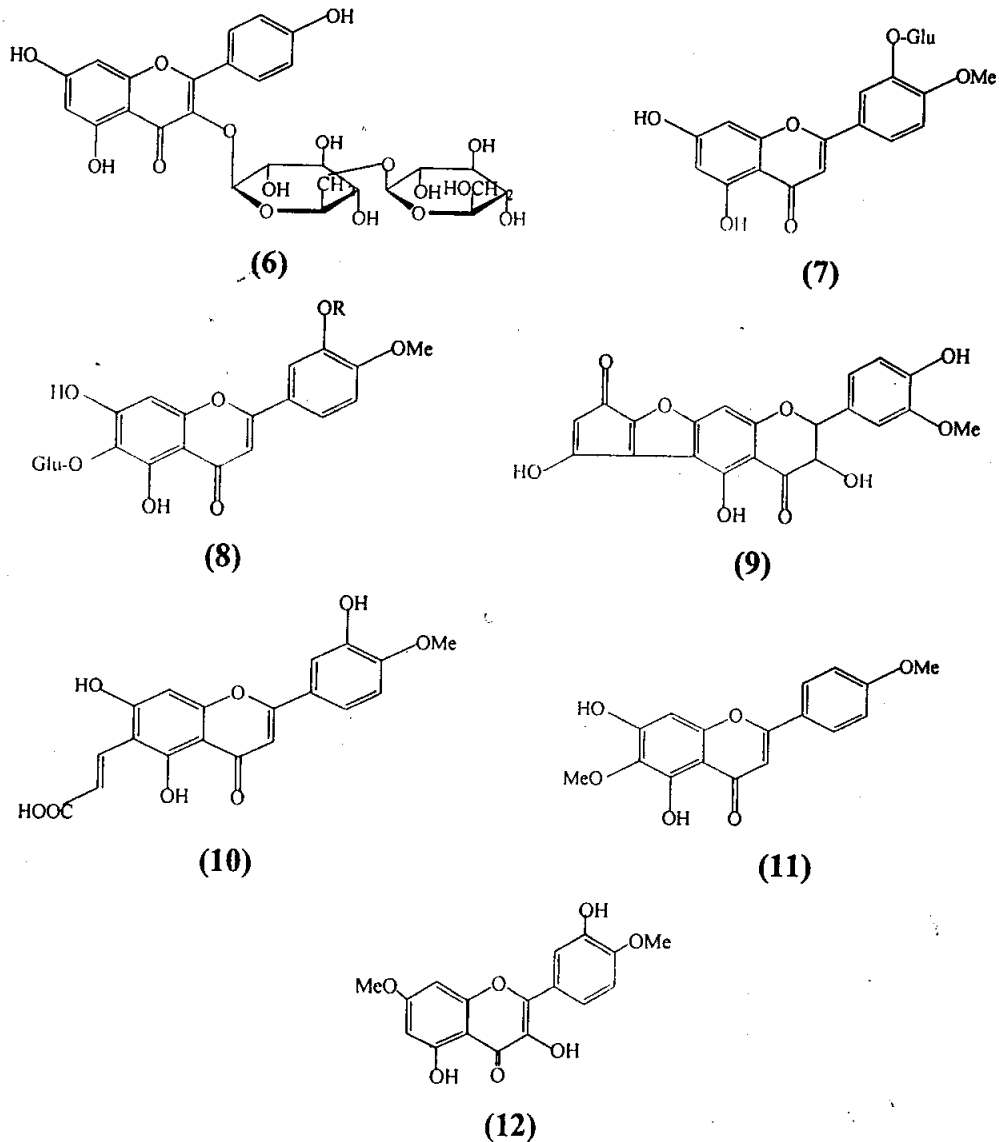


Gambar-5. Biosintesis flavonoid

Senyawa flavonoid dapat dibedakan atas aglikon flavonoid dan glikosida flavonoid. Senyawa glikosida flavonoid merupakan senyawa flavonoid yang mengikat gugus gula. Senyawa ini mempunyai sifat yang mudah larut dalam air karena adanya pengaruh dari gugus gula (Robinson, 1995).

#### 2.4.2. Flavonoid pada *Cassia*.

Berdasarkan penelusuran literatur, diketahui bahwa senyawa flavonoid yang telah diisolasi dari *Cassia alata* yaitu kaempferol 3-O-gentibiosida (6) (Moriyama, 2003), dari *Cassia torosa* yaitu diosmetin 3'-O-β-D-glukopiranosida (7), torosaflavon B 3'-O-β-D-glukopiranosida (8), torosaflavon C (9) dan torosaflavon D (10) (Kitanaka, 1992). Dari *Cassia reniger* berhasil diisolasi pectolinarigenin (11) (Tiwari, 1977), dari *Cassia laevigata* yaitu ombuin (12) (Tiwari, 1979), dari *Cassia spectabilis* DC yaitu 5,7,4'-trihidroksi flavon (apigenin) (1) dan apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter (2) (Amiroh, 2005).

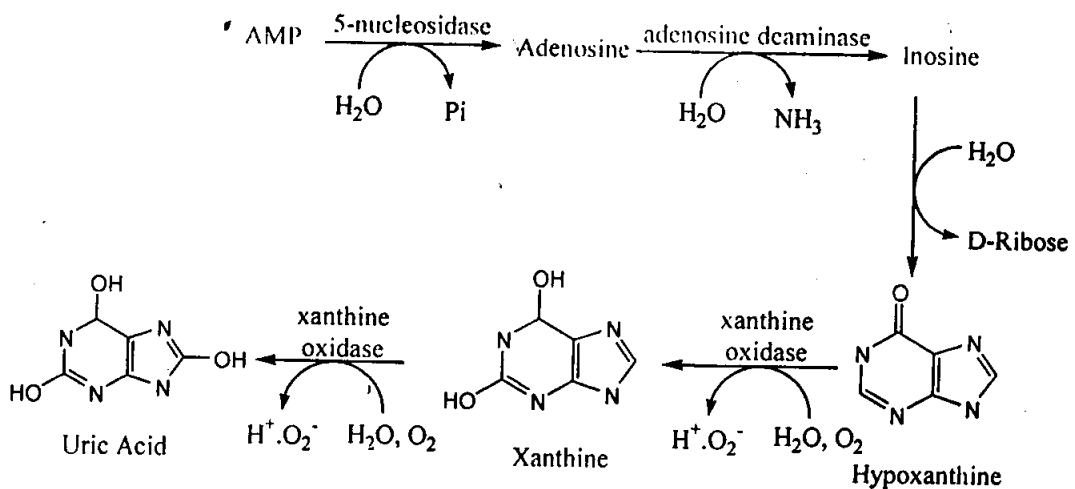


Gambar-6. Beberapa flavonoid yang telah diisolasi dari berbagai spesies *Cassia*

## 2.5. Metabolisme Asam Urat

Asam urat merupakan penyakit yang disebabkan oleh gangguan metabolisme purin (xanthine) yang mengakibatkan meningkatnya kadar asam urat darah dan ditandai adanya endapan kristal monosodium urat monohidrat (MSUM) di dalam cairan dan jaringan sendi. Penderita asam urat akan mengalami serangan sendi yang berulang-ulang dan tiba-tiba. Peradangan sendi yang bersifat menahun (kronis) dapat menyebabkan sendi menjadi bengkok yang diakibatkan peningkatan kadar asam urat dalam darah (Utami, 2004).

Asam urat merupakan hasil akhir dari proses metabolisme purin, yaitu suatu protein golongan nukleoprotein, yang berasal dari makanan maupun dari hasil pemecahan asam nukleat tubuh. Nukleoprotein melalui sistem mekanisme biologis diubah menjadi basa purin dan pirimidin. Nukleoprotein akan menghasilkan asam nukleat dan protein sederhana oleh enzim proteolitik yang terdapat dalam usus. Getah pankreas yang mengandung enzim nuklease memecah asam nukleat menjadi nukleotida. Polinukleotidase membantu fungsi nuklease pankreas membentuk mononukleotida, selanjutnya mononukleotida oleh enzim nukleotidase dan fosfatase dihidrolisis menjadi nukleosida. Enzim fosforilase memecah nukleosida menjadi basa purin dan basa pirimidin. Basa purin melalui siklus Kreb diubah menjadi asam urat melalui reaksi deaminasi, hidrolisis dan oksidasi. Nukleotida purin (adenosin mono pospat) didegradasi dengan jalan menghilangkan gugus fosfat oleh aktivitas enzim 5'-nukleotidase menghasilkan adenosine yang selanjutnya oleh enzim adenosin deaminase diaminasi menjadi inosin. Inosin selanjutnya dihidrolisis menghasilkan hiposantin dan ribose. Hiposantin selanjutnya dioksidasi oleh enzim *xanthine oxidase* menjadi santin yang selanjutnya dioksidasi lagi oleh *xanthine oxidase* menjadi asam urat. Reaksi tersebut menggunakan molekul oksigen untuk akseptor elektron. Metabolisme pembentukan asam urat dapat dilihat pada Gambar-7(Grossman, 1967).



Gambar-7. Metabolisme nukleotida protein

*Xanthine oxidase* adalah kompleks enzim yang mengandung flavin, molybdenum, besi (Fe), dan kofaktor sulfide. Enzim *xanthine oxidase* secara normal

ditemukan dalam hati dan tidak ditemukan secara bebas dalam darah. Pada umumnya hewan mamalia mempunyai enzim urikase yang dapat menghidrolisis asam urat menjadi allantoin yang larut dalam air, namun enzim tersebut tidak terdapat pada manusia. Akibatnya asam urat menjadi produk akhir dari metabolisme purin.

Produksi asam urat di atas merupakan proses alami, selain itu meningkatnya kadar asam urat dalam darah disebabkan faktor dari luar terutama makanan dan minuman yang dapat merangsang pembentukan asam urat. Makanan yang dapat merangsang pembentukan asam urat adalah makanan yang mengandung kadar karbohidrat dan protein tinggi seperti kacang-kacangan, krupuk emping, daging (terutama jeroan seperti hati, usus, otak dan ginjal), coklat (mengandung teobromina suatu alkaloida turunan purin), ikan dan sebagainya. Minuman yang mengandung kafein seperti teh, kopi dan cola juga dapat menyebabkan peningkatan asam urat karena mengandung alkaloid turunan purin (santin). Makanan dan minuman ini apabila dikonsumsi secara berlebihan akan mengganggu proses metabolisme sehingga menyebabkan peningkatan asam urat dalam darah dan dapat mengalami kejenuhan. Akibatnya akan terjadi pengendapan asam urat dalam bentuk kristal sehingga menimbulkan penyakit gout (Utami, 2004).

Untuk mengatasi nyeri di persendian akibat meningkatnya asam urat dalam darah, dapat diberikan obat anti inflamasi non-steroid (OAINS) dan mengompres bagian tubuh yang sakit dengan es secara berulang-ulang dan beristirahat. Cara ini terbukti mampu mengurangi rasa sakit ketika telah memasuki tahap akut. Obat lain yang dapat digunakan untuk menurunkan kadar asam urat antara lain Colchicine, Azapropazon, Allopurinol, Probenecid, Sulfinpyrazon, dan Benzobromaron. Di samping itu, dapat juga digunakan herbal seperti tempuyung (*Sonchus arvensis*), meniran (*Phyllanthus niruri*) dan kemangi (Utami, 2004).

## 2.6. Hubungan Struktur Flavonoid-Aktivitas Inhibitor *Xanthine Oxidase*

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan yang banyak memperlihatkan aktivitas biologis dan farmakologis antara lain sebagai antimikroba, antiinflamasi, antikanker, antiatherosclerosis, antioksidan dan sebagainya. Flavonoid sebagai antioksidan memiliki aktivitas diantaranya antiradikal bebas dan sebagai inhibitor enzim. Flavonoid yang mempunyai aktivitas

sebagai inhibitor enzim meliputi enzim xanthine oxidase, cykloxygenase dan lipooxygenase (Lin, 2002). Senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai inhibitor xanthine oxidase antara lain katekin, epikatekin, kuersetin, luteolin, dan kuersetin.

Selama ini diduga bahwa aktivitas flavonoid ditentukan oleh adanya gugus hidroksi yang terikat pada posisi C-5 dan C-7 serta adanya ikatan rangkap C=C pada posisi C-2 dan C-3 yang merupakan gugus essential untuk aktivitas sebagai inhibitor xanthine oxidase. Senyawa flavonoid jenis flavon memperlihatkan aktivitas yang lebih tinggi daripada jenis flavonol (Cos, 1998 dan Lin, 2002). Aktivitas senyawa semakin tinggi jika semakin banyak gugus hidroksil yang terikat pada inti aromatis senyawa flavonoid. Gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatis dapat melakukan delokalisasi elektron sehingga bersifat sebagai antioksidan. Jadi semakin banyak gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatis maka semakin banyak kemungkinan terjadi delokalisasi elektron. Aktivitas akan menurun atau tidak aktif sama sekali jika pada cincin aromatis terikat gugus metoksi atau suatu sakarida. Senyawa flavonoid dalam bentuk glikosida pada penelitian *in vivo* tidak menjadi masalah karena pada usus halus terdapat enzim  $\beta$ -glikosidase yang akan menghidrolisis senyawa glikosida ini menjadi aglikon flavonoid dengan gugus hidroksi.

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1. Tujuan Penelitian

1. Melakukan isolasi dan menentukan struktur kimia senyawa fenolik tersebut dengan metode spektroskopi.
2. Mengetahui daya hambat  $IC_{50}$  senyawa fenolik hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase*.
3. Mengetahui hubungan antara struktur dan aktivitas dari senyawa-senyawa hasil isolasi terhadap daya hambatnya terhadap *xanthine oxidase*.

#### 3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini menyangkut aspek ilmiah, aspek praktis dan aspek pendidikan.

Dari **aspek ilmiah**, penelitian ini akan memberikan informasi ilmiah tentang peta korelasi antara struktur-aktivitas senyawa fenolik dari *Cassia spectabilis* sebagai inhibitor pembentukan asam urat. Pembuktian ilmiah tersebut mencakup tahapan pekerjaan yang cukup detail mulai dari preparasi ekstrak, proses fraksinasi dengan panduan aktivitas secara TLC autografi, hingga diperoleh senyawa murni lengkap dengan identifikasi dan elusidasi strukturnya. Selanjutnya terhadap senyawa-senyawa tersebut dilakukan uji untuk mengetahui daya hambatnya terhadap pembentukan asam urat dengan menggunakan enzim *xanthine oxidase*.

Dari **aspek praktis**, luaran penelitian ini diharapkan akan dapat diaplikasikan sebagai bahan untuk pengobatan bagi penderita asam urat.

Dari **aspek pendidikan**, penelitian ini akan bermanfaat untuk meningkatkan atmosfer akademik, baik antar staf pengajar maupun antara staf pengajar dan mahasiswa. Penelitian ini dirancang agar bisa terjadi kerja sama antara staf pengajar dengan mahasiswa yang memprogram skripsi sehingga dapat membantu kelancaran studi mahasiswa melalui pengurangan lama skripsi yang akan berdampak pada lama studi mahasiswa. Di samping itu beban biaya skripsi akan tertanggulangi dan pemanfaatan sarana dan prasarana laboratorium juga akan dapat ditingkatkan. Selain itu, kegiatan penelitian ini juga untuk menumbuhkan iklim dan budaya meneliti di



lingkungan program studi. Manfaat yang lain adalah untuk melatih mahasiswa agar mampu menganalisis dan mengidentifikasi serta mengembangkan pemecahan dari berbagai masalah yang berkaitan dengan analisis kimia sehingga mahasiswa mampu mengimplementasikan teori kimia dan instrumen kimia dalam berbagai analisis kimia sebagai bekal *skill* memasuki dunia kerja.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari - Juli 2007 di Laboratorium Kimia Organik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga. Analisis dengan spektroskopi NMR dilakukan di Makmal Penyelidikan Organik I, Fakulti Sains, Universiti Teknologi Malaysia, Johor.

#### 4.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.2.1 Bahan penelitian.

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

##### 4.2.2 Bahan kimia.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk keperluan analisis dan pemurnian pada penelitian ini berderajat pro analisa (p.a) sedangkan untuk keperluan ekstraksi digunakan yang berkualitas teknis yang telah didestilasi.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol, n-heksana, etil asetat, aseton, kloroform, butanol, asam asetat, kalsium klorida anhidrat, akuades, plat KLT silika gel GF<sub>254</sub>, silika gel G<sub>60</sub> 7733 (0,2-0,5 mm) dan silika gel G<sub>60</sub> 7734 (0,063-0,2 mm), silika gel GF<sub>254</sub> 7730 (0,005-0,025 mm), natrium asetat, aluminium klorida, asam borat, asam klorida, dan pereaksi cerium sulfat.

##### 4.2.3 Alat penelitian.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin giling, seperangkat alat kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi radial, seperangkat alat destilasi, corong Buchner, *rotary vacum evaporator*, alat-alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium, dan bejana kromatografi lapis tipis.

Alat untuk keperluan analisis dan identifikasi digunakan. *Fisher Johns melting point apparatus*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1700, spektrofotometer FTIR JASCO-5300, spektrometer NMR Bruker Ultrashields yang bekerja pada frekuensi 400 MHz.

### 4.3 Cara Kerja

#### 4.3.1 Penyiapan bahan penelitian.

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

#### 4.3.2 Isolasi dan ekstraksi senyawa flavonoid.

Serbuk kulit batang tumbuhan *Cassia spectabilis* DC sebanyak 3,5 kg dimaserasi dengan pelarut metanol pada suhu kamar selama 2x3 hari. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol dilarutkan dengan metanol-air 10% kemudian dipartisi dengan n-heksana sebanyak tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Fraksi metanol-air selanjutnya dipartisi dengan etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa flavonoid dan senyawa semi polar lainnya. Fraksi etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan kalsium klorida anhidrat selama 24 jam kemudian disaring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 19 gram.

#### 4.3.3 Pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid.

Jumlah komponen senyawa kimia yang terdapat dalam fraksi etil asetat ditentukan dengan KLT dengan berbagai macam eluen. Dari hasil KLT diperoleh eluen terbaik untuk pemisahan, yaitu eluen yang menghasilkan komponen terbanyak serta menunjukkan pemisahan terbaik. Eluen tersebut adalah n-heksan:etil asetat = 8:2 (Amiroh, 2005). Eluen ini digunakan sebagai acuan untuk pemisahan selanjutnya. Penampak noda yang digunakan adalah lampu UV dan pereaksi cerium sulfat.

Proses selanjutnya adalah pemisahan dengan kromatografi kolom cair vakum. Ekstrak kental etil asetat dilarutkan dengan pelarut yang sesuai yaitu etil asetat, kemudian diserapkan pada silika gel G<sub>60</sub> 7733 ukuran 0,2-0,5 mm sebanyak 80 g. Silika gel yang mengandung senyawa tersebut dimasukkan ke dalam kolom yang telah terisi silika gel GF<sub>254</sub> 7730 ukuran 0,005-0,025 mm. Elusi dilakukan dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat dengan berbagai perbandingan berdasarkan peningkatan gradien kepolarannya. Hasil dari proses pemisahan diperoleh 25 fraksi dan masing-masing fraksi yang ditampung dilakukan uji KLT menggunakan eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 8:2 (Amiroh, 2005). Berdasarkan hasil KLT tersebut, fraksi-fraksi dengan noda-noda yang memiliki harga R<sub>f</sub> sama digabung sehingga menghasilkan lima fraksi utama, yaitu fraksi A (1-2), B (3-6), C (7-10), D (11-24) dan E (25). Dari fraksi A-C telah berhasil dipisahkan senyawa flavonoid, stilben, dan antrakuinon pada penelitian sebelumnya (Amiroh, 2005; Indriyani, 2005; Prajitno, 2006).

Dari uji KLT-autografi menggunakan DPPH diketahui bahwa fraksi D memberikan hasil positif. Selanjutnya fraksi D dijadikan target dalam pemisahan. Disamping itu, fraksi ini juga belum pernah diteliti sebelumnya.

Fraksi D yang telah diuapkan pelarutnya dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom cepat menggunakan eluen n-heksan:aseton dengan perbandingan (7:3) yang ditingkatkan gradien kepolarannya sehingga menghasilkan tiga fraksi yaitu D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> dan D<sub>3</sub>. Selanjutnya terhadap fraksi D<sub>2</sub> dilakukan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom cepat dan kromatografi radial (kromatotron) sampai diperoleh senyawa murni CS-04.

Terhadap fraksi D<sub>3</sub> juga dilakukan pemisahan komponen senyawa-senyawa kimianya menggunakan kombinasi kromatografi kolom cepat dan kromatografi radial hingga menghasilkan fraksi D<sub>31</sub>, D<sub>32</sub>, D<sub>33</sub> dan D<sub>34</sub>. Fraksi D<sub>33</sub> selanjutnya dilakukan pemisahan hingga diperoleh senyawa murni CS-05.

Fraksi E juga dijadikan target dalam penelitian ini untuk dipisahkan dan dimurnikan. Fraksi E kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 19 gram lalu dilakukan pemisahan menggunakan kombinasi kromatografi kolom gravitasi dengan eluen aseton:n-heksan = 7,5:2,5 dan kromatografi radial

menggunakan eluen kloroform:metanol = 7,5:2,5. Proses pemisahan ini menghasilkan senyawa murni CS-03.

Pemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan cara rekristalisasi. Uji kemurnian senyawa hasil isolasi ditentukan dengan uji KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda, uji titik leleh dan analisis spektroskopi UV, IR, dan NMR.

Senyawa hasil isolasi CS-04, CS-05 dan CS-03 yang sudah murni dan telah diketahui strukturnya, selanjutnya dilakukan uji aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase*.

#### 4.3.4 Uji sifat fisika senyawa hasil isolasi.

Penentuan titik leleh senyawa hasil isolasi dengan *Fisher-Johns melting point apparatus* dilakukan dengan mengamati saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan. Senyawa dikatakan murni jika suhu saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan berada pada range tidak lebih dari 2°C (Harborne, 1982).

#### 4.3.5 Analisis spektroskopi senyawa hasil isolasi.

##### 4.3.5.1 Spektroskopi UV-Vis.

Senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 mg dilarutkan dalam metanol sampai volumenya 10 ml, kemudian diukur panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) dan absorbansi maksimum pada daerah 200–800 nm. Efek batokromik diamati dengan penambahan pereaksi geser aluminium klorida, aluminium klorida kemudian ditambah asam klorida, natrium asetat dan natrium asetat kemudian ditambah asam borat (Markham, 1988).

##### 4.3.5.2 Spektroskopi resonansi magnet inti.

Untuk analisis proton dan karbon, senyawa hasil isolasi dilarutkan dalam pelarut CD<sub>3</sub>OD (metanol berat). Sinyal resonansi magnet inti <sup>1</sup>H-RMI diukur pada pergeseran 0-14 ppm, sedangkan sinyal resonansi magnet inti <sup>13</sup>C-RMI diukur pada pergeseran 0-200 ppm (Markham, 1988).

#### 4.3.6. Uji aktivitas Inhibitor *xanthine oxidase*

Uji pendahuluan dilakukan dengan metode KLT autografi menggunakan pereaksi DPPH 0,004%. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah suatu senyawa mempunyai aktivitas antioksidan. Jika dari uji ini diketahui bahwa suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan, selanjutnya senyawa hasil isolasi diuji untuk mengetahui bioaktivitasnya sebagai inhibitor enzim *xanthine oxidase*. Penentuan aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* senyawa flavonoid hasil isolasi dilakukan berdasarkan prinsip kemampuan senyawa flavonoid hasil isolasi menghambat reaksi oksidasi *xanthine* oleh *xanthine oxidase* menghasilkan asam urat (Cos, 1998; Lin, 2002, Yao, 2006).

Penentuan aktivitas senyawa flavonoid hasil isolasi sebagai inhibitor *xanthine oxidase* ditentukan dengan metode spektrometri ultraviolet dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang  $\lambda$  290 nm pada suhu 37°C. Pengukuran absorbansi daya hambat senyawa aktif ditentukan dengan penambahan 1 ml senyawa aktif (konsentrasi senyawa aktif dibuat bervariasi) dalam 2,9 ml santin 100  $\mu$ M dan 0,1 ml *xanthine oxidase* 0,06 U/ml. Larutan buffer 0,05 M natrium fosfat pH 7,5 digunakan sebagai larutan blanko dalam pengukuran (Cos, 1998).

Larutan santin 100  $\mu$ M dibuat dengan cara melarutkan 0,9 mg santin dalam 50 ml larutan buffer natrium fosfat 0,05M pH 7,5. Larutan senyawa aktif dibuat dengan cara melarutkan senyawa hasil isolasi dengan larutan buffer natrium fosfat 0,05M pH 7,5. Jika kurang larut, ditambahkan sedikit larutan natrium hidroksida 0,05M (Cos, 1998). Konsentrasi senyawa hasil isolasi untuk uji aktivitas dibuat bervariasi yaitu 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25  $\mu$ M (Cos, 1998).

Prosentase konsentrasi daya hambat senyawa hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase* ditentukan berdasarkan perbandingan absorbansi asam urat setelah penambahan senyawa aktif flavonoid dalam berbagai konsentrasi dengan absorbansi asam urat tanpa senyawa aktif yang pengukurannya dilakukan pada panjang gelombang  $\lambda$  290 nm pada suhu 37°C.

$$\% \text{ inhibitor } xanthine \text{ oxidase} = \frac{\text{absorbansi asam urat} + \text{senyawa aktif}}{\text{absorbansi asam urat tanpa senyawa aktif}} \times 100$$

Dari perhitungan persen inhibitor *xanthine oxidase* dalam berbagai konsentrasi senyawa aktif akan diperoleh daya hambat  $IC_{50}$  senyawa flavonoid hasil isolasi berdasarkan analisis data statistik regresi linier antara konsentrasi vs % inhibitor *xanthine oxidase*. Suatu senyawa flavonoid dikatakan memiliki aktivitas sebagai inhibitor asam urat jika memiliki  $IC_{50}$  lebih kecil dari  $100 \mu\text{M}$  (Cos, 1998).

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Flavonoid

Sampel tumbuhan berupa serbuk kulit batang *Cassia spectabilis* DC sebanyak 3,2 kg, diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol pada suhu kamar sebanyak tiga kali selama tiga hari. Pelarut metanol digunakan dalam ekstraksi karena metanol merupakan pelarut universal, sehingga diharapkan semua senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel dapat terekstrak. Maserasi dilakukan tiga kali dengan harapan semua kandungan kimia dalam sampel dapat terekstraksi secara keseluruhan.

Hasil maserasi tersebut disaring untuk memisahkan antara ekstrak metanol dan residunya. Ekstrak metanol diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator*, didapatkan ekstrak kental metanol seberat 340,7 gram. Ekstrak kental metanol selanjutnya dilarutkan dengan metanol, kemudian dipartisi menggunakan n-heksan sebanyak tiga kali, untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya yang mengganggu dalam pemisahan senyawa flavonoid.

Ekstrak metanol selanjutnya dilarutkan dalam metanol dan ditambahkan air sebanyak 10% dari volume metanol. Ekstrak metanol-air kemudian dipartisi menggunakan pelarut etil asetat sebanyak tiga kali, untuk memisahkan flavonoid dan senyawa fenolik lainnya dari senyawa-senyawa yang bersifat polar. Dari hasil partisi diperoleh ekstrak etil asetat dan ekstrak air. Ke dalam ekstrak etil asetat yang diperoleh ditambahkan kalsium klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) anhidrat, kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator*, hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat yang berwarna coklat dengan berat 12 mg. Ekstrak kental etil asetat yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemisahan terhadap komponen-komponen kimianya menggunakan berbagai macam metode kromatografi seperti kromatografi kolom gravitasi (KKG), kromatografi kolom cepat (KCC) dan kromatografi radial hingga diperoleh senyawa flavonoid murni yang cukup untuk analisis spektroskopi dan uji bioaktivitas.



## 5.2. Hasil Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Flavonoid

### 5.2.1. Hasil pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid CS-04

Ekstrak kental etil asetat seberat 12 g dilakukan uji KLT untuk memperoleh campuran eluen yang terbaik dan digunakan sebagai acuan dalam pemisahan. Campuran eluen n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 8:2 merupakan campuran eluen terbaik yang dapat memberikan pemisahan senyawa dalam ekstrak. Ekstrak kental etil asetat dilarutkan dengan sedikit etil asetat, selanjutnya dilakukan pemisahan komponen-komponen kimianya menggunakan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Eluen yang digunakan dalam KKG merupakan elusi secara gradien mulai dari n-heksan, campuran n-heksan-etil asetat, etilasetat dan methanol. Fraksi-fraksi hasil KKG ditampung selanjutnya dilakukan uji KLT, dimana fraksi-fraksi yang memiliki noda-noda dengan harga  $R_f$  sama digabung. Dari hasil uji KLT diperoleh 5 fraksi yaitu A, B, C, D dan E. Masing-masing fraksi dilakukan uji antioksidan pendahuluan dengan metode KLT autografi. Hasil KLT disemprot dengan DPPH 0,004%. Noda-noda yang memberikan warna kuning setelah disemprot merupakan noda-noda dari senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Dari hasil uji ini fraksi D memberikan hasil positif. Selanjutnya fraksi D dijadikan target dalam pemisahan. Di samping itu, fraksi tersebut juga belum pernah diteliti sebelumnya. Fraksi D seberat 500 mg dipisahkan menggunakan kromatografi kolom cepat (KKC), menggunakan eluan n-heksan:aseton dengan perbandingan 7:3 yang ditingkatkan gradien kepolarnya. Dari hasil KKC ini diperoleh 3 fraksi yaitu D1, D2 dan D3. Selanjutnya fraksi D2 dipisahkan dengan KKC sebanyak dua kali masing-masing menggunakan campuran eluen n-heksan:aseton (7:3), kemudian dilakukan pemurnian dengan kromatografi radial (kromatotron) sebanyak dua kali masing-masing menggunakan campuran eluen yang digunakan n-heksan:aseton (7:3) dan kloroform:aseton 5%, sehingga diperoleh senyawa murni CS-04 yang berupa padatan berwarna kuning seberat 3 mg dengan titik leleh 276-278°C. Uji kemurnian senyawa CS-04 dilakukan dengan uji KLT menggunakan sistem tiga eluen. Eluen yang digunakan terlihat pada Tabel-4.1.

**Tabel-4.1.** Uji KLT senyawa CS-04 hasil isolasi

No.	Eluen	Jumlah titik	Plasma R <sub>f</sub>
1.	kloroform:aseton (9:1)	1	0,3
2.	n-heksana:aseton (6:4)	1	0,3
3.	kloroform:metanol (9,5:0,5)	1	0,24

Dari hasil uji tersebut dapat diketahui bahwa senyawa CS-04 memiliki kemurnian yang tinggi. Selanjutnya senyawa murni CS-04 yang diperoleh dilakukan identifikasi untuk menentukan struktur senyawa serta dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase*.

### 5.2.2. Hasil pemisahan dan pemurnian Senyawa flavonoid CS-05

Frakasi D<sub>3</sub> seberat 99,1 mg dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi radial (kromatotron). Eluen yang digunakan adalah campuran n-heksan dan aseton dengan perbandingan 9:1 hingga diperoleh 4 fraksi yaitu D<sub>31</sub>, D<sub>32</sub>, D<sub>33</sub> dan D<sub>34</sub>. Fraksi D<sub>33</sub> dilakukan pemurnian menggunakan KKC sebanyak dua kali masing-masing menggunakan campuran eluen kloroform:aseton (9:1), selanjutnya dilakukan pemurnian lagi menggunakan KKC dengan eluen kloroform:metanol = 1:4 hingga diperoleh senyawa murni CS-05 sebanyak 3,6 mg dengan titik leleh 180-184 °C (terurai). Uji kemurnian senyawa CS-05 dilakukan dengan uji KLT menggunakan sistem tiga eluen. Eluen yang digunakan terlihat pada Tabel-4.2.

**Tabel-4.2.** Uji KLT senyawa CS-05 hasil isolasi

No.	Eluen	Jumlah titik	Plasma R <sub>f</sub>
1.	kloroform:aseton (7:3)	1	0,32
2.	n-heksana:aseton (6:4)	1	0,35
3.	kloroform:metanol (15%)	1	0,24

Dari hasil uji tersebut dapat diketahui bahwa senyawa CS-05 memiliki kemurnian yang tinggi. Selanjutnya senyawa murni CS-05 yang diperoleh dilakukan

identifikasi untuk menentukan struktur senyawa serta dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase*.

### 5.2.3. Hasil pemisahan dan pemurnian Senyawa flavonoid CS-03

Fraksi E dieyaporasi dan diperoleh ekstrak kental sebanyak 19 gram lalu dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan pelarut etil asetat-metanol dengan berbagai perbandingan berdasarkan peningkatan gradien kepolarannya. Dari proses pemisahan ini diperoleh 38 fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuji dengan KLT menggunakan eluen etil asetat-metanol dengan perbandingan 7,5:2,5. Berdasarkan hasil KLT tersebut, fraksi-fraksi yang memiliki noda dengan harga Rf yang sama digabung hingga diperoleh tujuh fraksi, yaitu fraksi E-1 (1-2), E-2 (3-6), E-3 (7-13) dan E-4 (14-22), E-5 (23-30), E-6 (31-35), E-7 (36-38). Penelitian kemudian difokuskan pada fraksi E-4 karena hasil KLT menunjukkan noda mayor.

Fraksi E-4 yang kemudian dijadikan target pemisahan, diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 1,3 g. Selanjutnya pemisahan dilakukan dengan kromatografi radial dan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen yang berbeda yaitu campuran kloroform:metanol dan campuran aseton:n-heksan, yang dinaikkan secara gradien kepolarannya hingga diperoleh senyawa yang hampir murni sebanyak 53 mg (senyawa CS-03).

Rekristalisasi senyawa CS-03 dilakukan dengan menggunakan pelarut campuran metanol-aseton p.a. Senyawa CS-03 yang diperoleh berupa padatan berwarna kuning sebanyak 30 mg yang cukup untuk analisis spektroskopi dengan titik leleh sebesar 210° C (terurai) dan larut air.

Kemurnian senyawa hasil isolasi diuji menggunakan KLT dengan tiga macam eluen yang berbeda. Hasil KLT dapat dilihat pada Tabel-4.3

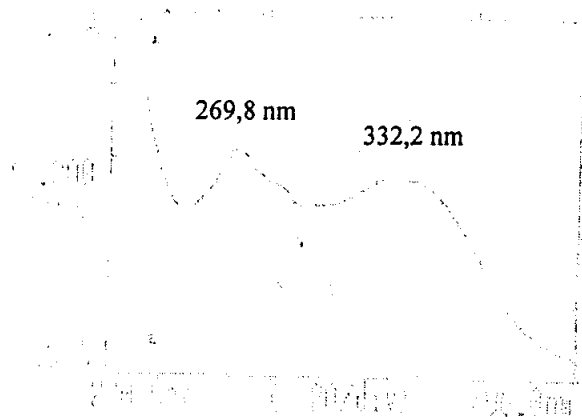
Tabel-4.3 Uji KLT senyawa CS-03 hasil isolasi

No.	Eluen	Jumlah noda	Harga Rf
1.	Etil Asetat:Metanol (6:4)	1	0,46
2.	Aseton:Metanol (8,5:1,5)	1	0,41
3.	Butanol:Asam asetat:Air (5:1:1)	1	0,41

### 5.3. Pembahasan Senyawa Flavonoid

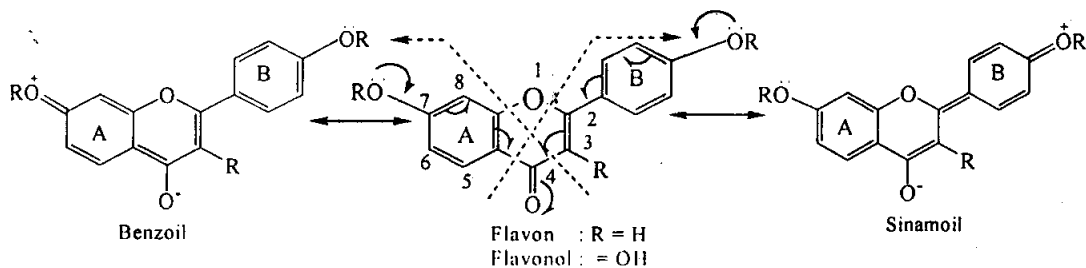
#### 5.3.1. Pembahasan senyawa flavonoid CS-04

Senyawa flavonoid CS-04 hasil isolasi mempunyai titik leleh 276-278°C. Pengukuran dengan spektrofotometer ultraviolet menunjukkan panjang gelombang maksimum dalam pelarut metanol  $\lambda_{maks}$  332,2 dan 269,8 nm (Gambar-8).



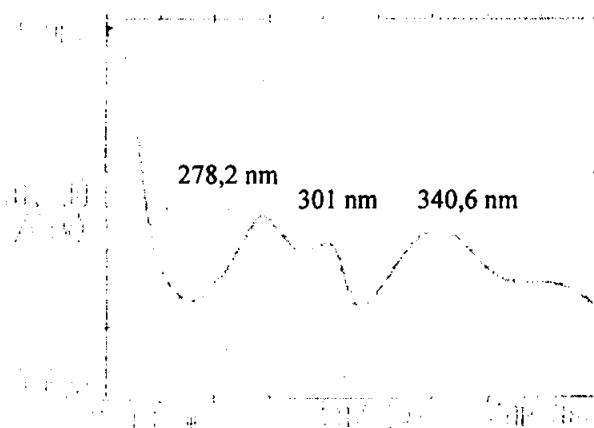
Gambar-8. Spektrum UV-vis senyawa CS-04 dalam MeOH

Pita serapan pada  $\lambda_{maks}$  332,2 nm merupakan puncak serapan dari gugus sinamoil, sedangkan serapan pada  $\lambda_{maks}$  269,8 nm merupakan pita serapan dari gugus benzoil yang merupakan ciri khas senyawa flavonoid.



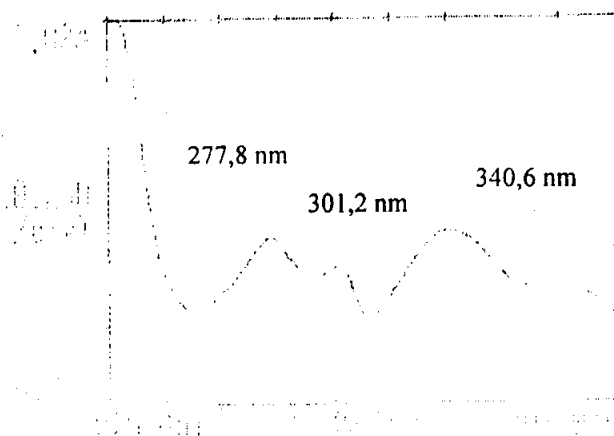
Gambar-9. Struktur resonansi gugus sinamoil dan gugus benzoil senyawa flavonoid

Penambahan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$  memberikan puncak serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  ( $\text{MeOH}+\text{AlCl}_3$ ) 340,2; 301,0 dan 278,2 nm (Gambar-10) Efek bathokromik pada penambahan  $\text{AlCl}_3$  menunjukkan terjadinya pembentukan kompleks  $\text{Al}^{3+}$  antara karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) di atom C-4 dan gugus hidroksil di posisi C-5, serta adanya gugus *orto* dihidroksi di posisi C-3' dan C4'.



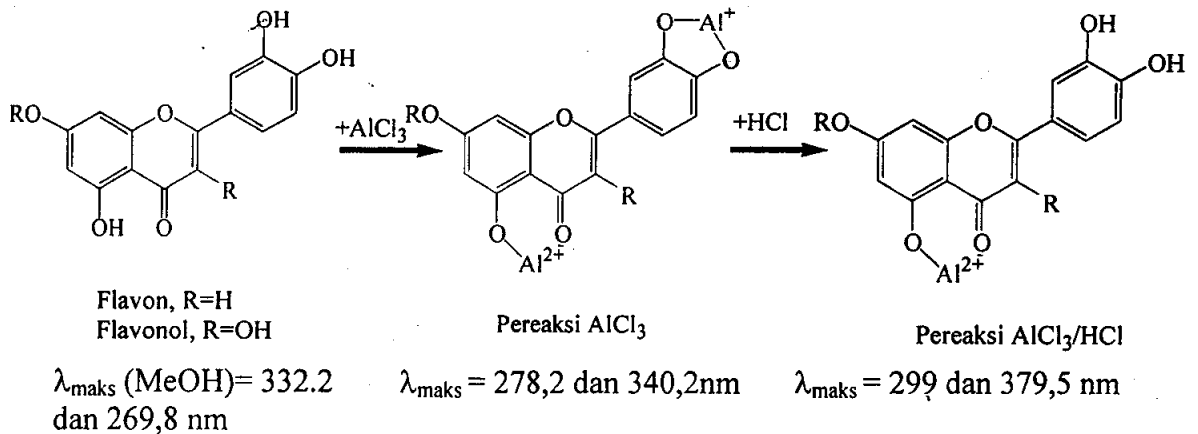
Gambar-10. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+ $\text{AlCl}_3$ )

Penambahan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  memberikan  $\lambda_{\text{maks}}$  278, 301 dan 3340,6 nm (Gambar-11). Puncak serapan pada senyawa CS-04 dengan penambahan  $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$  tidak mengalami penurunan panjang gelombang. Hal ini berarti tidak ada gugus *orto* dihidroksi di posisi C-3' dan C-4'.



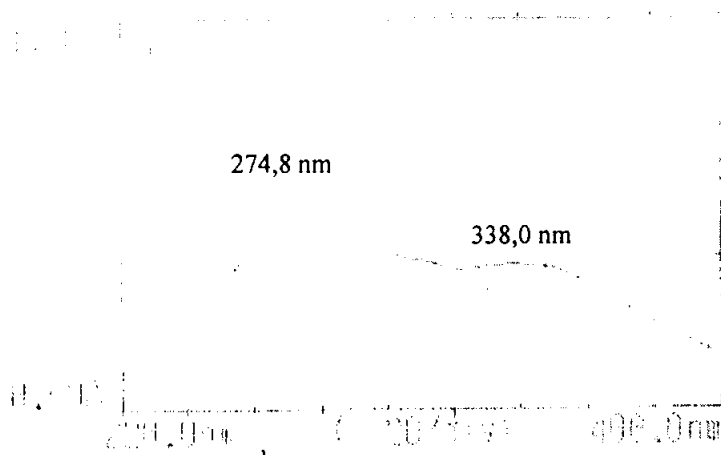
Gambar-11. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+ $\text{AlCl}_3$ + HCl)

Dengan penambahan pereaksi ini maka panjang gelombang pada serapan pita sinamoil (I) akan turun. Hal ini terjadi karena kompleks  $Al^{3+}$  yang terbentuk dengan gugus *orto* dihidroksi akan putus karena penambahan HCl (Markham, 1988). Berikut adalah gambar pembentukan kompleks  $Al^{3+}$  dengan senyawa flavonoid :



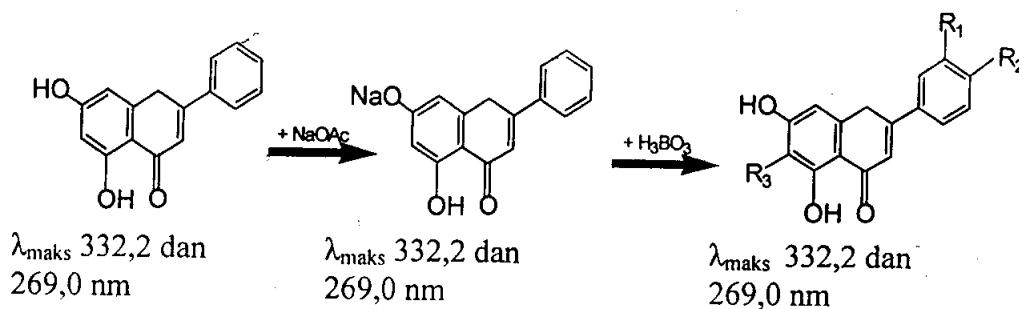
Gambar-12. Pembentukan kompleks  $Al^{3+}$  dengan senyawa flavonoid

Penambahan pereaksi NaOAc memberikan puncak serapan pada  $\lambda_{maks}$  (MeOH+NaOAc) 338,0 dan 274,8 nm (Gambar-13). Pita serapan pada cincin sinamoil dan benzoil mengalami pergeseran. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat substituen hidroksi pada atom C-7 dari sistem flavonoid.



Gambar-13. Spektrum UV-Vis senyawa CS-04 (+MeOH+NaOAc)

Senyawa CS-04 bila ditambahkan  $H_3BO_3$  tidak mengalami pergeseran panjang gelombang, hal ini berarti bahwa senyawa flavonoid ini tidak mempunyai gugus *orto* dihidroksi baik pada cincin sinamoil maupun cincin benzoil.



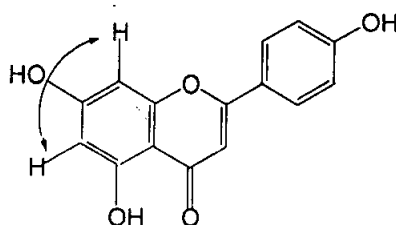
Gambar-14. Senyawa CS-04 setelah ditambah NaOAc dan  $H_3BO_3$

Analisis  $^{13}C$ -RMI memperlihatkan bahwa senyawa flavonoid CS-04 memberikan sinyal pada  $\delta$  (ppm): 128; 128,45; 121,50; 102,80; dan 100. Informasi lingkungan karbon RMI kurang mendukung karena ada beberapa sinyal karbon yang tidak muncul, hal ini disebabkan karena jumlah sampel yang terlalu sedikit (Lampiran 1).

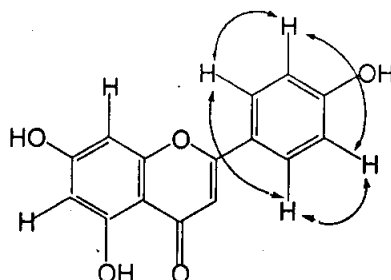
Analisis spektroskopi  $^1H$ -RMI senyawa flavonoid CS-04 dalam pelarut metanol terdeuterasi  $CD_3COD$  menunjukkan pergeseran kimia pada sinyal  $\delta$  (ppm): 6,22 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6,47 (1H, d,  $J=2$  Hz), 6,60 (1H, s), 6,95 (2H, dd,  $J=9$  dan 2 Hz) dan 7,87 (2H, dd,  $J=9$  dan 2) (Lampiran 2). Informasi yang diperoleh dari spektrum  $^1H$ -RMI adalah bahwa senyawa flavonoid CS-04 mempunyai 5 sinyal yang mewakili 7 proton di daerah aromatik dari sistem flavonoid. Dua sinyal proton dublet yang melakukan perjodohan pada posisi *meta* pada pergeseran kimia 6,22 (1H, d,  $J=2$  Hz) dan 6,47 (1H, d,  $J=2$  Hz) merupakan proton aromatik pada cincin A. Adanya sinyal proton pada pergeseran kimia 6,60 ppm merupakan ciri khas senyawa flavonoid jenis flavon. Hal ini menunjukkan bahwa pada cincin C hanya memiliki satu proton. Empat proton aromatis lainnya terlihat pada dua sinyal pada pergeseran kimia 6,95 (2H, dd,  $J=9$  dan 2 Hz) dan 7,87 (2H, dd,  $J=9$  dan 2). Adanya empat proton aromatis tersebut memperlihatkan bahwa senyawa flavonoid CS-04 mempunyai satu substituen hidroksi

pada cincin B. Interaksi keempat proton aromatis tersebut adalah interaksi *orto* dan *meta*. Adanya interaksi *orto* dan *meta* pada proton-proton tersebut menyatakan bahwa posisi hidroksi pada cincin B berada pada posisi atom C-4'. Adanya kesimetrisan pada cincin B menyebabkan timbulnya lingkungan kimia yang sama bagi proton-proton tersebut sehingga proton pada posisi 2' dan 6' akan muncul sebagai satu sinyal. Demikian juga dengan proton-proton pada posisi 3' dan 5' yang akan muncul bersama sebagai satu sinyal.

6,47 ppm (d,  $J= 2,4$  Hz) dan 6,47 ppm (d,  $J= 2$  Hz):



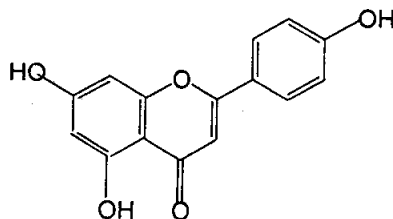
7,87 ppm (2H, dd,  $J= 8,8$  dan 2 Hz) dan 6,94 ppm (2H, dd,  $J= 9,1$  dan 2,4 Hz):



Gambar-15. Posisi proton-proton aromatis berdasarkan data dari spektrum Proton-RMI

Berdasarkan hasil analisis spektroskopi ultraviolet, proton-RMI dan karbon-RMI senyawa CS-04 adalah senyawa flavonoid jenis flavon. Senyawa flavon hasil isolasi mempunyai tujuh proton aromatis, tiga gugus hidroksi dan satu gugus karbonil. Dari penggabungan hasil analisis spektroskopi tersebut disarankan bahwa senyawa flavonoid CS-04 adalah 5,7,4'-trihidroksi flavon atau dikenal dengan nama apigenin (Wang, 2004; Meselhy, 2003; Harborne dan Mabry, 1982; Wagner, 1977; dan Sakakibara, 1976). Struktur senyawa apigenin (5,7,4'-trihidroksi flavon) adalah sebagai berikut:



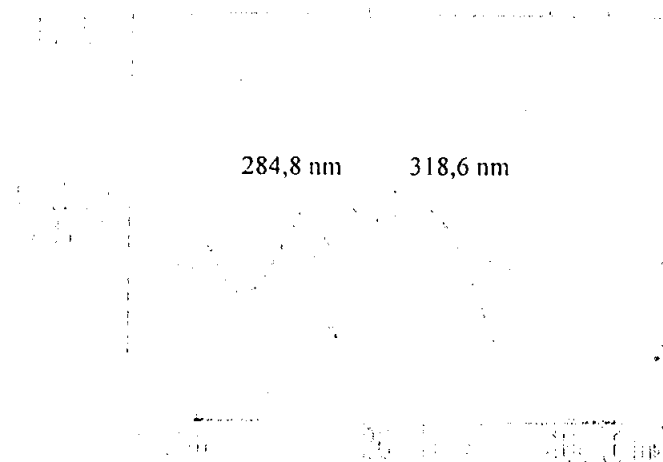


Gambar-16. Gambar struktur senyawa CS-04 hasil isolasi

Senyawa ini telah ditemukan sebelumnya (Amiroh, 2005), tetapi belum dapat ditentukan bioaktivitasnya karena terbatasnya jumlah yang diperoleh waktu itu.

### 5.3.2. Pembahasan senyawa flavonoid CS-05

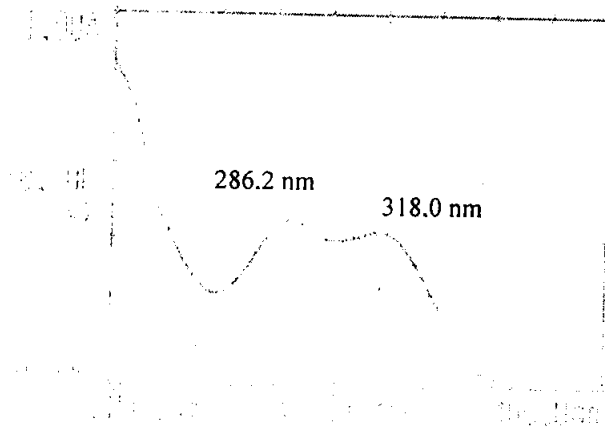
Hasil analisis senyawa CS-05 menggunakan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut metanol menunjukkan serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  284,8 nm dan 318,6 nm (Gambar-17). Pita serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  284,8 nm (pita II), merupakan puncak serapan dari gugus benzoil, sedangkan pita serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  318,6 nm (pita I) merupakan puncak serapan dari gugus sinamoil.



Gambar-17. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH)

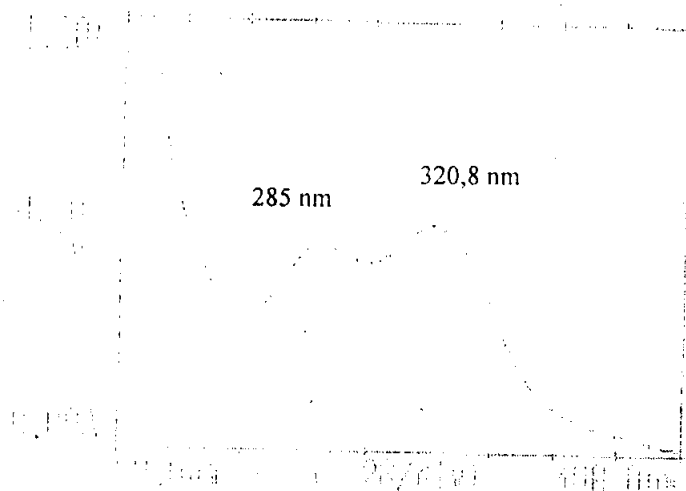
Penambahan NaOH pada senyawa CS-05 memberikan serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  (MeOH+NaOH) 364,0; 304,4; 239,8 nm. Penambahan NaOH mengakibatkan terjadinya *efek bathokromik*. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa CS-05 hasil isolasi mempunyai gugus hidroksil (-OH) aromatis atau gugus fenolik (Harborne, 1978).

Dengan penambahan pereaksi  $\text{AlCl}_3$  memberikan puncak serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  (MeOH+ $\text{AlCl}_3$ ) 318,0 dan 286,2 nm (Gambar-18). Panjang gelombang tidak mengalami pergeseran, yang berarti bahwa tidak ada gugus karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) pada atom C-4 dan gugus hidroksil pada posisi C-5, serta tidak adanya gugus *orto* dihidroksi di posisi C-3' dan C4'.



Gambar-18. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH+ $\text{AlCl}_3$ )

Penambahan pereaksi NaOAc pada senyawa CS-05 memberikan puncak serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  320,8 dan 285,0 nm (Gambar-19). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid CS-05 tidak memiliki gugus hidroksi ( $-\text{OH}$ ) pada posisi C-7 (Markham, 1988)

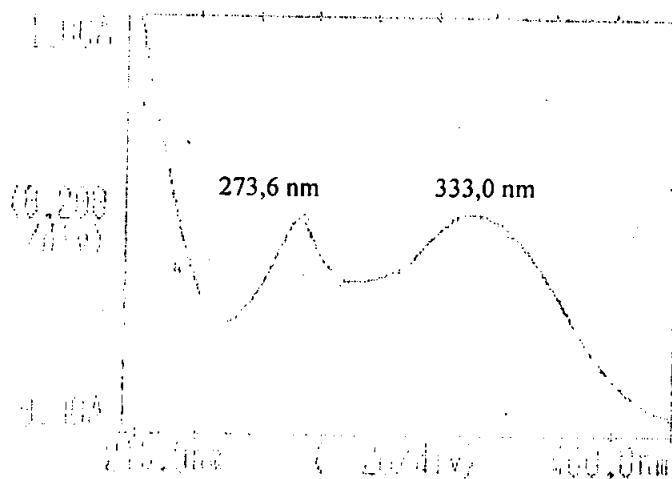


Gambar-19. Spektrum UV-Vis senyawa CS-05 (+MeOH+NaOAc)

Dari data spektrum UV-Vis dapat disimpulkan bahwa senyawa CS-05 hasil isolasi merupakan senyawa flavonoid. Penentuan struktur senyawa flavonoid CS-05 belum dapat ditentukan berhubung data spektrum RMI sedang dalam pemeriksaan.

### 5.3.3. Pembahasan senyawa flavonoid CS-03

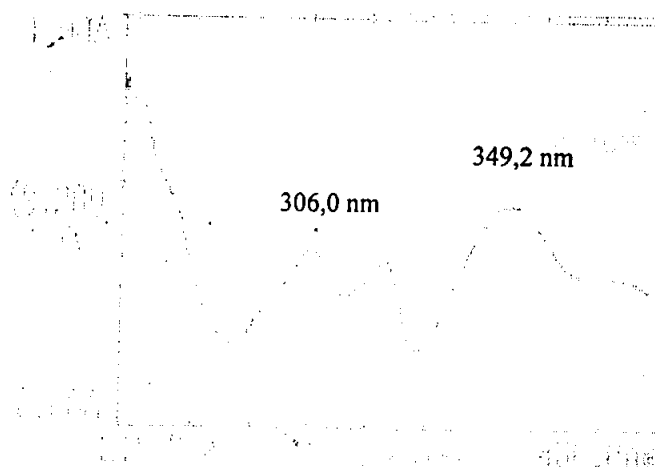
Hasil analisis senyawa CS-03 dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada  $\lambda_{\text{maks}}$  273,6 nm dan  $\lambda_{\text{maks}}$  333 nm (Gambar-20). Puncak kedua serapan maksimum merupakan ciri khas senyawa flavonoid golongan flavon atau flavonol. Serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  273,6 nm (pita II) merupakan puncak serapan gugus benzoil, sedangkan serapan pada  $\lambda_{\text{maks}}$  333 nm (pita I) merupakan puncak serapan gugus sinamoil (Markham, 1988).



Gambar-20. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH)

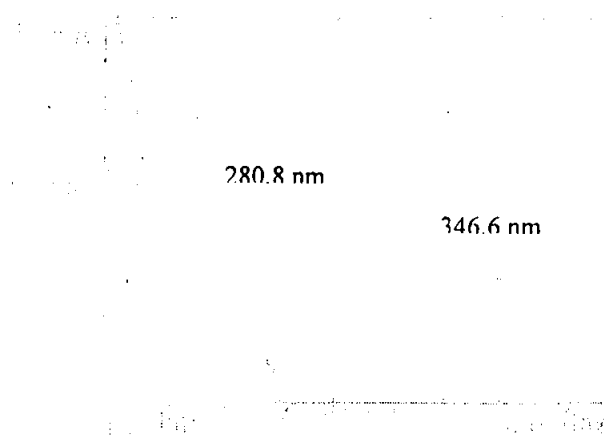
Efek pergeseran batokromik dengan penambahan pereaksi geser aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) memberikan pergeseran  $\lambda_{\text{maks}}$  pada pita I (gugus sinamoil) dan pita II (gugus benzoil). Setelah penambahan pereaksi geser  $\text{AlCl}_3$ ,  $\lambda_{\text{maks}}$  pita II bergeser dari 273,6 nm menjadi 306 nm dan  $\lambda_{\text{maks}}$  pita I yang semula 333 nm menjadi 349,2 nm (Gambar-21). Pergeseran  $\lambda_{\text{maks}}$  tersebut menunjukkan adanya pembentukan senyawa kompleks antara  $\text{Al}^{3+}$  dengan gugus hidroksil pada posisi C-5 dan gugus karbonil pada posisi C-4 serta gugus orto-dihidroksi di posisi C-3' dan C-4' pada cincin B dari

golongan flavon. Senyawa flavonoid tersebut dengan penambahan asam klorida (HCl) tidak mengalami pengurangan panjang gelombang, yang berarti bahwa senyawa flavonoid tersebut tidak mempunyai gugus *orto* dihidroksi di posisi C-3' dan C-4' pada cincin B.



Gambar-21. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH+AlCl<sub>3</sub>)

Efek pergeseran batokromik senyawa flavonoid CS-03 dengan penambahan pereaksi geser natrium asetat (NaOAc) memberikan pergeseran pada pita II (gugus benzoil). Setelah penambahan pereaksi geser NaOAc,  $\lambda_{maks}$  pita II bergeser dari 273,6 nm menjadi 280,8 nm (Gambar-22). Pergeseran ini menunjukkan adanya gugus hidroksil pada C-7. Gugus hidroksil pada posisi C-7 merupakan gugus hidroksi yang lebih asam dibandingkan dengan gugus hidroksi pada posisi yang lain, oleh karena itu dapat dideteksi hanya dengan penambahan basa lemah yaitu NaOAc.



Gambar-22. Spektrum UV-vis senyawa CS-03 (MeOH+NaOAc)

Senyawa flavonoid tersebut dengan penambahan pereaksi geser  $H_3BO_3$  tidak mengalami pergeseran panjang gelombang, yang berarti bahwa senyawa flavonoid tersebut tidak mempunyai gugus *orto* dihidroksi baik pada cincin A maupun pada cincin B.

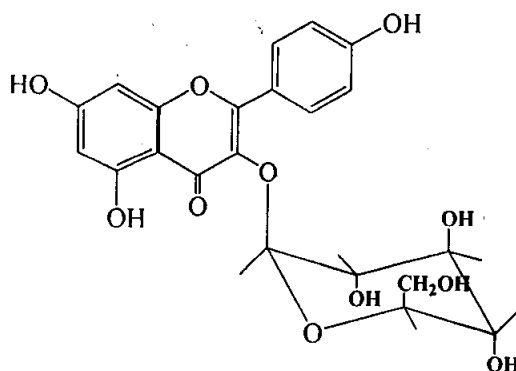
Analisis spektroskopi proton RMI ( $^1H$ -RMI) dalam pelarut metanol terdeuterasi ( $CD_3OD$ ) memberikan informasi bahwa senyawa flavonoid CS-03 mempunyai enam proton aromatis pada pergeseran kimia (ppm): 7,99 (2H, d,  $J=7,6$  Hz), 6,94 dan 6,93 (2H, dd,  $J=8,8$  dan 2,4 Hz), 6,61 (1H, s), 6,59 (1H, s). Selain itu terdapat pula enam sinyal proton yang mewakili gugus sakarida pada pergeseran kimia (ppm): 5,05 (1H, t), 4,10 (1H, d,  $J=7,2$  Hz), 4,06 (1H, d,  $J=6,8$  Hz), 3,78 (1H, m), 3,65 (1H, m), 3,49 (1H, m).

Sinyal singlet proton aromatis pada pergeseran kimia 6,61 ppm dan 6,59 ppm mewakili masing-masing satu proton aromatis cincin A dari sistem flavonoid. Kedua sinyal tersebut memberikan informasi adanya interaksi proton aromatis pada posisi *meta* berdasarkan spektrum H-H COSY (Lampiran-3). Secara teoritis kedua sinyal tersebut seharusnya muncul sebagai dublet tetapi sering masing-masingnya sinyal tersebut muncul sebagai singlet (Markham, 1988). Sinyal dublet-dublet pada  $\delta$  6,94 ppm dan 6,93 ppm mewakili dua proton aromatis (2H, dd,  $J=8,8$  dan 2,4 Hz) yang menunjukkan adanya interaksi pada posisi *orto* dan *meta*. Sinyal dublet pada pergeseran kimia 7,99 ppm mewakili dua proton (2H, d,  $J=7,6$  Hz) yang berinteraksi pada posisi *orto*. Sinyal-sinyal proton pada pergeseran kimia 7,99 ppm (2H, d,  $J=7,6$  Hz), 6,94 ppm dan 6,93 ppm (2H, dd,  $J=8,8$  dan 2,4 Hz) merupakan sinyal proton aromatis pada cincin B. Sinyal-sinyal proton tersebut menunjukkan bahwa senyawa flavonoid hasil isolasi hanya mempunyai satu substituen hidroksi (-OH) pada cincin B. Substituen hidroksi pada cincin B terikat pada C-4', sinyal tersebut dapat dilihat pada analisis spektrum H-H COSY dimana sinyal proton pada pergeseran kimia 7,99; 6,94 dan 6,93 ppm saling berinteraksi pada posisi *orto-orto* dan *orto-meta*. Sinyal-sinyal proton gugus sakarida yang berjumlah enam sinyal menunjukkan bahwa sakarida tersebut merupakan monosakarida. Senyawa flavonoid hasil isolasi merupakan jenis flavonol, hal ini diperkuat dengan tidak adanya sinyal proton singlet pada pergeseran kimia 6-7 ppm pada cincin C sistem flavonoid (Markham, 1988).

Analisis  $^{13}\text{C}$ -RMI memperlihatkan bahwa senyawa flavonoid CS-03 memberikan sinyal pada pergeseran kimia (ppm): 185,5; 161,51; 128,70; 122,10; 115,65. Informasi karbon RMI kurang mendukung terhadap sinyal karbon flavonoid karena ada beberapa sinyal yang tidak terekam, tetapi sinyal lingkungan karbon monosakarida yang terikat pada flavonoid dapat dipelajari. Selain itu terdapat sinyal dari 6 atom karbon lain yang merupakan sinyal karbon monosakarida yang terikat pada flavonoid dengan pergeseran kimia (ppm): 99,99; 81,54; 81,13; 78,16; 77,51 dan 70,55. Salah satu sinyal karbon tersebut menunjukkan metilen ( $-\text{CH}_2-$ ) pada pergeseran kimia 70,55 ppm.

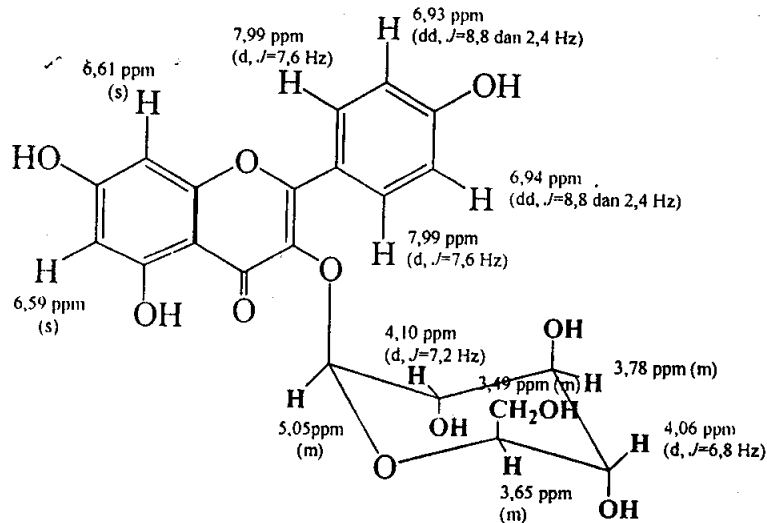
Analisis spektroskopi HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) resonansi magnet memperlihatkan adanya korelasi sinyal proton dan karbon senyawa flavonoid hasil isolasi. Korelasi sinyal proton dan karbon yang dapat teramati adalah sinyal berikut: 7,99 ppm (2H, d,  $J = 7,6$  Hz) dengan sinyal pada 128,70 ppm serta sinyal pada 6,94 dan 6,93 ppm (2H, dd,  $J = 8,8$  dan  $2,4$  Hz) dengan sinyal karbon pada 115,65 ppm. Korelasi tersebut menunjukkan letak proton dan karbon pada cincin B sistem flavonoid.

Berdasarkan pendekatan kemotaksonomi tumbuhan genus *Cassia* (Moriyama, 2001) dan penggabungan hasil analisis spektroskopi ultraviolet, proton resonansi magnet inti dan karbon resonansi magnet inti disarankan bahwa senyawa flavonoid CS-03 hasil isolasi adalah 5,7,4'-trihidroksiflavonol-3-O-glukosida atau dikenal dengan nama kaempferol-3-O-glukosida (Harborne, 1982). Aktualisasi senyawa flavonoid CS-03 hasil isolasi adalah sebagai berikut:

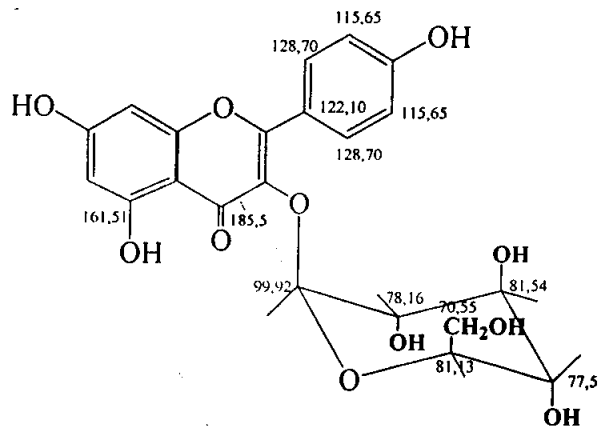


Gambar-23. Struktur senyawa CS-03 hasil isolasi

Posisi proton dan karbon senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi diaktualisasikan seperti gambar di bawah:



Gambar-24. Aktualisasi posisi proton senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi



Gambar-25. Aktualisasi posisi karbon senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi

Spektrum  $^1\text{H}$ -RMI dan  $^{13}\text{C}$ -RMI senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi dapat dibandingkan dengan senyawa kaempferol-3-O-glukosida yang sudah dilaporkan sebelumnya. Perbandingan  $^1\text{H}$ -RMI dan  $^{13}\text{C}$ -RMI dapat dilihat pada Tabel-4.4 dan Tabel-4.5 berikut:

**Tabel-4.4.** Perbandingan <sup>1</sup>H-RMI senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi dengan senyawa kaempferol-3-O-glukosida pada literatur

Posisi H	Kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi	Kaempferol-3-O-gentiobioside (Moriyama, 2001)	Liquiritin (flavanon glikosida) (Nakanishi, 1985)
H-1	-	-	-
H-2	-	-	5,45 (dd, $J= 12,9$ dan $2,9$ Hz)
H-3	-	-	-
H-4	-	-	-
H-5	-	-	7,72 (d, $J= 8,6$ Hz)
H-6	6,59 (s)	6,21 (d, $J= 2$ Hz)	6,50 (dd, $J= 8,6$ dan $2,2$ Hz)
H-7	-	-	-
H-8	6,61 (s)	6,41 (d, $J= 2$ Hz)	-
H-9	-	-	-
H-10	-	-	-
H-1'	-	-	-
H-2'	7,99 (d, $J= 7,6$ Hz)	8,10 (d, $J= 9$ Hz)	-
H-3'	6,93 (dd, $J= 8,8$ dan $2,4$ Hz)	6,89 (d, $J= 9$ Hz)	-
H-4'	-	-	-
H-5'	6,94 (dd, $J= 8,8$ dan $2,4$ Hz)	6,89 (d, $J= 9$ Hz)	-
H-6'	7,99 (d, $J= 7,6$ Hz)	8,10 (d, $J= 9$ Hz)	-
Glc			
H-1''	5,05 (m)	5,22 (d, $J= 7,5$ Hz)	4,94 (d, $J= 7,5$ Hz)
H-2''	4,10 (d, $J= 7,2$ Hz)	-	3,35-3,50 (m)
H-3''	3,78 (m)	-	3,35-3,50 (m)
H-4''	4,06 (d, $J= 6,8$ Hz)	-	3,35-3,50 (m)
H-5''	3,65 (m)	-	3,35-3,50 (m)
H-6''	3,49 (m)	-	3,70 (dd, $J= 12$ dan $5,4$ Hz) 3,90 (dd, $J= 12$ dan $2,2$ Hz)
H-1'''			4,14 (d, $J= 8$ Hz)



**Tabel-4.5.** Perbandingan  $^{13}\text{C}$ -RMI senyawa kaempferol-3-O-glukosida dengan senyawa kaempferol-3-O-glukosida pada literatur

Posisi C	Senyawa hasil isolasi	Kaempferol-3-O-glukosida (Harborne,1982)	Kaempferol-3-O-gentiobioside (Moriyama,2001)
2	-	156,3	156,48
3	-	133,0	133,18
4	185,5	177,4	177,32
5	161,51	161,1	161,13
6	-	98,7	98,60
7	-	164,1	164,03
8	-	93,6	93,62
9	-	156,3	156,35
10	-	104,1	104,00
1'	122,10	121,0	120,78
2'	128,70	130,7	130,85
3'	115,65	115,0	115,01
4'	-	159,8	159,85
5'	115,65	115,0	115,01
6'	128,70	130,7	130,85
-	-	-	-
Glc			
1''	99,92	101,4	101,01
2''	78,16	74,2	73,32
3''	70,55	77,2	76,44
4''	81,54	70,1	69,61
5''	77,51	76,5	78,86
6''	81,13	61,0	67,96
1'''	-	-	103,09
2'''	-	-	74,00
3'''	-	-	76,49
4'''	-	-	69,66
5'''	-	-	76,18
6'''	-	-	60,73

#### 5.4 Hasil Uji Sebagai Inhibitor *xanthine oxidase*

Dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* terhadap senyawa hasil isolasi yaitu apigenin (5,7,4'-trihidroksi flavon). Untuk itu dibuat larutan senyawa hasil isolasi pada berbagai konsentrasi : 5,00  $\mu\text{M}$  2,50  $\mu\text{M}$  1,00  $\mu\text{M}$  0,50  $\mu\text{M}$  dan 0,25 $\mu\text{M}$ . Pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan setelah campuran

antara santin, *xanthine oxidase*, dan senyawa apigenin diinkubasi selama 30 menit. Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* senyawa dapat dilihat pada Tabel-4.6. Sebagai pembanding adalah campuran santin dan *xanthine oxidase* tanpa senyawa hasil isolasi dan sebagai blanko adalah larutan buffer.

**Tabel-4.6.** Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* dengan berbagai konsentrasi apigenin

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Nilai Absorbansi ( $\lambda=290\text{ nm}$ )	% Inhibisi <i>Xanthine oxidase</i>
Pembanding	0,492	-
5,00	0,190	38,00
2,50	0,211	42,88
1,00	0,234	47,56
0,50	0,247	50,20
0,25	0,266	54,06

Berdasarkan analisis data statistik, daya hambat senyawa flavonoid hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase* ditunjukkan oleh persamaan regresi :

$$y = -3,049x + 52,18$$

Dari data tersebut diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $0,71\ \mu\text{M}$ . Hal ini menunjukkan bahwa apigenin hasil isolasi mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* karena mempunyai harga  $\text{IC}_{50} < 100\ \mu\text{M}$ .

Dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* juga terhadap senyawa glikosida flavonoid hasil isolasi yaitu kaempferol-3-O-glukosida. Untuk itu dibuat larutan senyawa hasil isolasi pada berbagai konsentrasi :  $5,00\ \mu\text{M}$   $2,50\ \mu\text{M}$   $1,00\ \mu\text{M}$   $0,50\ \mu\text{M}$  dan  $0,25\ \mu\text{M}$ . Pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan setelah campuran antara santin, *xanthine oxidase*, dan senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi diinkubasi selama 30 menit

Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* dengan berbagai konsentrasi senyawa kaempferol-3-O-glukosida dapat dilihat pada Tabel-4.7.

**Tabel-4.7.** Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* dengan berbagai konsentrasi kaempferol-3-O-glukosida

Konsentrasi ( $\mu\text{M}$ )	Nilai Absorbansi ( $\lambda=290 \text{ nm}$ )	% Inhibisi <i>Xanthine oxidase</i>
Pembanding	0,492	-
5,00	0,212	43,08
2,50	0,224	45,53
1,00	0,237	48,17
0,50	0,249	50,61
0,25	0,260	52,85

Berdasarkan analisis data statistik, daya hambat senyawa glikosida flavonoid hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase* ditunjukkan oleh persamaan regresi :

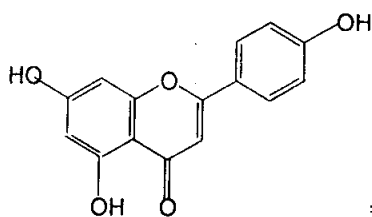
$$y = -1,847x + 51,46$$

Dari data tersebut diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $0,7904 \mu\text{M}$ . Hal ini menunjukkan bahwa senyawa kaempferol-3-O-glukosida hasil isolasi mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* karena mempunyai harga  $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{M}$ .

#### 5.4. Hubungan Struktur Senyawa-Aktivitas Sebagai Inhibitor Xanthine Oxidase

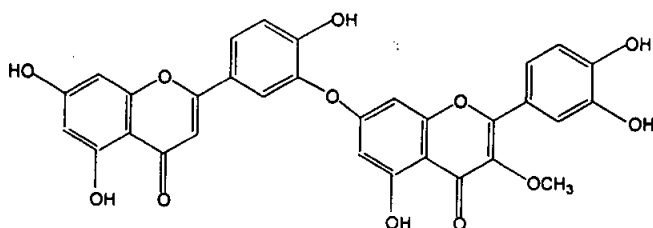
Di pasaran telah diketahui bahwa allopurinol adalah suatu obat asam urat yang paling banyak digunakan. Dari literatur diketahui bahwa  $\text{IC}_{50}$  allopurinol adalah  $0,24 \mu\text{M}$  (Cos, 1998). Harga  $\text{IC}_{50}$  ini akan dibandingkan dengan harga  $\text{IC}_{50}$  senyawa-senyawa hasil isolasi.

Beberapa senyawa golongan flavonoid yang telah diisolasi dari kulit batang tanaman *Cassia spectabilis* beserta aktivitasnya sebagai inhibitor *xanthine oxidase* adalah sebagai berikut :



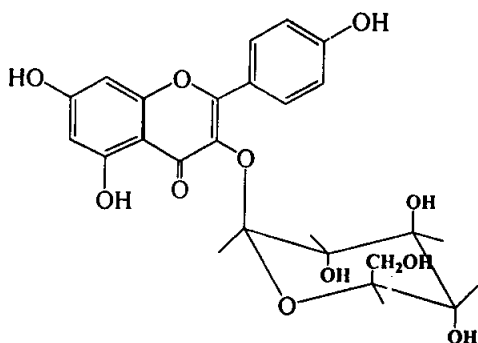
= Apigenin

$\text{IC}_{50} = 0,71 \mu\text{M}$ .



$$IC_{50} = 4,52 \times 10^{-2} \mu M. =$$

Apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter



$$IC_{50} = 0,7904 \mu M$$

Kaempferol-3-O-glukosida

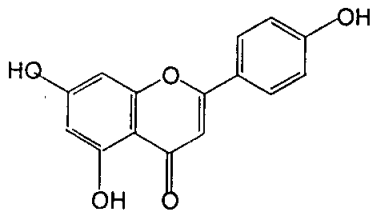
Dari hasil penelitian yang diperoleh terlihat bahwa senyawa biflavonoid, dalam hal ini adalah apigenin-(3'-O-7'')-kuersetin-3''-metil eter memiliki bioaktivitas sebagai inhibitor pembentukan asam urat yang tertinggi dibandingkan dengan dua senyawa yang lain yaitu apigenin (suatu monomer flavonoid) dan kaempferol-3-O-glukosida (suatu glikosida flavonoid), bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan allopurinol. Dugaan bahwa gugus hidroksi yang terikat pada inti aromatis adalah gugus yang berperan dalam menentukan aktivitas suatu senyawa sebagai antioksidan, (dimana salah satunya adalah sebagai inhibitor pembentukan asam urat) semakin terbukti dari penelitian ini. Biflavonoid hasil isolasi memiliki jumlah gugus hidroksi yang lebih banyak dibandingkan pada monomer flavonoid dan pada glikosida flavonoid, oleh karena itu senyawa biflavonoid hasil isolasi memiliki bioaktivitas yang lebih besar.

## BAB VI

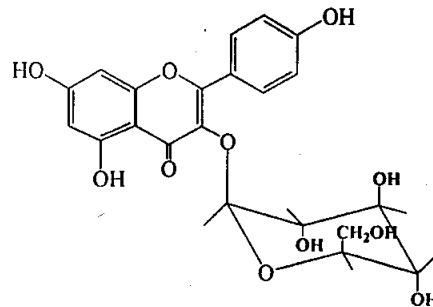
### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

1. Senyawa-senyawa fenolik yang berhasil diisolasi pada penelitian ini adalah :



Apigenin



Kaempferol-3-O-glukosida

2. Senyawa fenolik hasil isolasi memiliki aktivitas sebagai inhibitor terhadap *xanthine oxidase* dengan harga  $IC_{50}$  : apigenin 0,71  $\mu$ M dan kaempferol-3-O-glukosida 0,7904  $\mu$ M
3. Hubungan struktur-aktivitas senyawa fenolik adalah menguatkan dugaan sebelumnya bahwa semakin banyak gugus hidroksil yang terikat pada inti aromatis, maka senyawa akan makin aktif sebagai inhibitor *xanthine oxidase*

#### 6.2. Saran

1. Penentuan struktur senyawa CS-05 dituntaskan sehingga dapat diketahui strukturnya, demikian juga bioaktivitasnya.
2. Dicoba untuk mengisolasi lagi senyawa fenolik yang lain dari tanaman yang sama, dengan menggunakan jumlah sampel yang lebih besar sehingga senyawa-senyawa minor akan dapat diperoleh. Dengan demikian kesimpulan tentang hubungan struktur-aktivitas dapat dirumuskan dengan pasti.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., 1986, **Kimia Organik Bahan Alam**, Karunia, Jakarta, hal 1-39.
- Amiroh, F.N., 2005, Isolasi dan uji aktivitas inhibitor xanthine oxidase senyawa flavonoid dari kulit batang *Cassia spectabilis*, **Skripsi**, Jurusan Kimia FMIPA UNAIR, Surabaya.
- Biswas, M.; Mallik, H., 1985, Cassidine, A Chromone Alkaloid and (+)-6-hydroxy-mellein, A Dihydroisocoumarin from *Cassia siamea*, **Phytochemistry**, 25, 7, 1727-1730
- Cos, P.; Ying, P.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Poel, B.V.; Pieters, L.; Berghe, D.P., 1998, Structure Activity Relationship and Classification of flavonoid as Inhibitor of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers, **J. Nat. Prod.**, 61, 71-76
- Gilman, E.F., and Watson, D.G., *Senna spectabilis, Cassia*, <http://edis.ifas.ufl.edu//ST588>, 14 Oktober, 2004
- Grossman, L.; Moldave, K., 1967, **Methods in Enzimology**, Vol. XII, Nucleic Acids, Part A, Academic Press, New York, p. 5
- Harborne, J.B., 1987, **Metode Fitokimia**, Terbitan Kedua, Penerbit ITB, Bandung
- Harborne, J.B.; Mabry T.J., 1982, **The Flavonoids Advances in Research**, University Press London, New York, p. 313, 649
- Harborne, J.B.; Turner, B.L., 1984, **Plant Chemosystematic**, Second Printing, London
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Indonesia II* terjemahan Badan Litbang Kehutanan Jakarta, Sarana Wana Jaya, Jakarta
- Hutapea, J.R.; Syamsuhidayat, S.S., 1991, **Inventaris Tanaman Obat Indonesia**, Jilid I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia

- Indriyani, Y., 2005, Isolasi dan Uji Aktivitas Radikal Bebas Senyawa Fenolik dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC, **Skripsi**, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Unair, Surabaya
- Kang, S.S.; Kim, J.S.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kim, H.P., 2000, A New Prenylated Flavonone from the Roots of *Shopora flavescens*, **Fitoterapia**, 71, 511-515
- Kitanaka, S.; Takido, M., 1981, Studies on the constituent of the seeds of *Cassia obtusifolia*: the structures of two new lactones, isotoralactone and cassialactone, **Phytochemistry**, 20 (8), 1951-1953
- Kitanaka, S.; Takido, M., 1992, Studies on the constituent of the leaves of *Cassia torosa* CAV. III, the structures of two new flavone glikosides, **Chem. Pharm. Bull**, 40 (1), 249-251
- Kitanaka, S.; Takido, M.; Mizoue, K.; Kondo, H.; Nakaike, S., 1996, Oligomeric stilbenes from *Caragana Chamlagu* Lamark Root, **Chem. Pharm. Bull**, 44, 565-567
- Lee, C.K.; Lee, P.H.; Kuo, Y.H., 2001, The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L., **J. Chinese Che. Soc.**, 48, 1053-1058
- Markham, K.R., 1988, **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**, ITB, Bandung
- Meselhy, Meselhy, R., 2003, Contituen from Moghat the Roots of *Glossostemon bruguieri* (Desf.), **Molecules**, 8, 614-612
- Moriyama, H.; Iizuka, T.; Nagai, M., 2001, A Stabilized Flavonoid Glycoside in Heat-treated *Cassia alata* Leaves and Its Structural Elucidation, **Yakugaku Zasshi**, 121 (11), 817-820
- Moriyama, H.; Iizuka, T.; Nagai, M.; Miyataka, H.; Satoh, T., 2003, Antiinflammatory Activity of Heat-treated *Cassia alata* Leaf Extract and Its Flavonoid Glycoside, **The Pharmaceutical Society of Japan**, 123 (7), 607-611
- Mulchandani, N.B.; Hassarajani, S.A., 1977, Cassinine, A New Alkaloid and Anthraquinones from *Cassia spectabilis* and Their Biogenetic Relationship, **Planta Medica**, 32, 357-361

- Nakanishi, T.; Inada, A.; Kambayashi, K.; Yoneda, K., 1985, Flavonoid Glycosides of The Roots of *Glycyrrhiza uralensis*, **Phytochemistry**, 24 (2), 339-341
- Ohyama, M.; Tanaka, T.; Yokohama, J.; Iinuma, M., 1995, Occurrence of Prenylated Flavonoids and Oligostilbenes and its significance for chemotaxonomy of genus *Shopora* (Leguminoceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, 23 (6), 669-667
- Pharkphoom, P.; Kaewsuwan, S., 2004, Bioassay-guided Isolation of the Antioxidant Constituent from *Cassia alata* L. Leaves, **Songklanakarinn J. Sci. Technol.**, 26 (1), 103-107
- Prajitno, W.D.S., 2006, Isolasi Senyawa Flavonoid Fraksi Etil Asetat dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC, **Skripsi**, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Unair, Surabaya
- Raphael, I., 1976, **Natural Products**, A. Laboratory Guide, Second Edition, Academic Press, London
- Robinson, T., 1995, **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**, ITB, Bandung.
- Rochmawati, M.Y., 2006, Isolasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Senyawa Fenolik Fraksi Etil Asetat dari Kulit Batang *Cassia spectabilis* DC, **Skripsi**, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Unair, Surabaya
- Singh, J.; Singh, J., 1986, A Bianthraquinone and A Triterpenoid from The Seeds of *Cassia hirsute*, **Phytochemistry**, 25, 8, 1985-1987
- Tiwari, R.D.; Bajpai, M., 1976, The Flavonoids of *Cassia renigera* Stem Bark, **Phytochemistry**, 16, 798-799
- Tiwari, R.D.; Bajpai, M., 1977, The Flavonoids of *Cassia renigera* Stem Bark, **Phytochemistry**, 16, 798-799
- Tiwari, R.D.; Singh, J., 1978, Anthraquinone Rhamnoside from *Cassia javanica* Root Bark, **Phytochemistry**, 18, 906
- Tiwari, R.D.; Singh, J., 1979, Flavonoids from the leaves of *Cassia laevigata*, **Phytochemistry**, 18, 2060-2061



- Tjitrosoepomo, G., 1993, **Taksonomi Tumbuhan**, cetakan kesembilan, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Utami, P., 2004, **Tanaman Obat untuk Mengatasi Rematik dan Asam Urat**, PT Agramedia Pustaka, Tangerang.
- Viegas, C.Jr.; Bolzani, V.S.; Furlan, M.; Barreiri, E.J.; Young, M.C.M.; Tomazela, D.; Eberlin, M.N., 2004, Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and green Fruits of *Cassia spectabilis*, **J. Nat. Prod.**, 67(5), 908-910
- Wagner H.; Chari, V.M.; Neszmelyit, A.; Chen, F-C.; Chem, L-K.; Lin, Y-C.; Lin Y-M., 1977, <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy of Bivlaonoids, **Phytochemistry**, 16, 629-636
- Wang,H-Q.; Song, A-X.; Deng, Y-R., 2004, Chemical Component of *Seriphidium santolium* Poljak, **Journal of the Chinese Chem. Soc.**, 51, 629-636