

- XANTHINE OXIDASE

- FLAVONOIDS

ADLN - Perpustakaan Unair

**ISOLASI dan UJI AKTIVITAS
INHIBITOR XANTHINE OXIDASE SENYAWA FLAVONOID
dari KULIT BATANG *Saccopetalum horsfieldii* Benn**

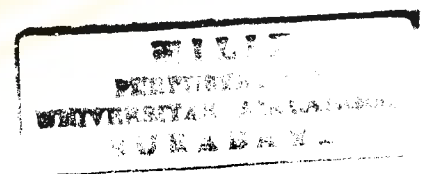
SKRIPSI

NANIK FAUZIAH

MPK 41/05
Fau
i



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**



**ISOLASI dan UJI AKTIVITAS INHIBITOR
XANTHINE OXIDASE SENYAWA FLAVONOID DARI
KULIT BATANG *Saccopetalum horsfieldii* Benn**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia Pada
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Airlangga**

Oleh :

NANIK FAUZIAH
NIM. 080112395

Tanggal Lulus : 20 Juli 2005

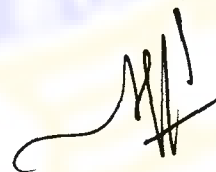
Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Drs. Mulyadi Tanjung, M.S
NIP. 131 932 687

Pembimbing II,



Dr. Alfinda Novi Kristanti
NIP. 131 932 685

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : *Isolasi Dan Uji Aktivitas Inhibitor Xanthine Oxidase*
Senyawa : *Flavonoid Dari Kulit Batang Saccopetalum Horsfieldii Benn*
Penyusun : **Nanik Fauziah**
NIM : **080112395**
Tanggal Ujian : **20 Juli 2005**

Disetujui Oleh :

Pembimbing I,



Drs. Mulyadi Tanjung, M.S
NIP. 131 932 687

Pembimbing II,



Dr. Alfinda Novi Kristanti
NIP. 131 932 685

Mengetahui

Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Airlangga



Dra. Titjik Srie Tj., Ph.D.
NIP. 131 801 627

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga. Diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

* لا يبلغ المرء منتهى أمر به إلا بعلم يجد في طلبه *

Artinya : "Tidaklah seseorang sampai kepada tujuan utamanya (cita-citanya) kecuali karena ilmu yang ia dapatkan dengan bersungguh-sungguh".

* وا بذل له ما ملكت من نسيب ما نسيب فاعلم ابقى للمرء من نسيبه *

Artinya : "Dan sedekahkanlah harta yang engkau miliki untuk mendapatkan ilmu karena sesungguhnya ia (ilmu) lebih kekal dari nasab seseorang".

* يرفع الله الذين آمنوا منكم والذين أوتوا العلم درجات والله بما تعملون خبير (المجادله : ١١) *

Artinya : " niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan ".

*Kupersembahkan Skripsi Ini Kepada :
Kedua Orang tuaq
Yang Tak Pernah Putus Mendoakanq*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT karena dengan rahmat dan hidayah-Nyalah penyusun dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan judul “Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Inhibitor *Xanthine Oxidase* dari Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn”.

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

Pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada:

1. Drs. Mulyadi Tanjung, MS selaku dosen pembimbing I dan Dr. Alfinda Novi Kristanti selaku dosen pembimbing II atas bantuan dan kesabaran selama memberikan bimbingan, saran, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.
2. Drs. Sofijan Hadi, M.Kes selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan nasehat selama masa studi.
3. Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si selaku dosen Kimia Bahan Alam yang banyak membantu dalam proses penelitian dan memberikan nasehat serta motivasi.
4. Dra. Tjitjik Srie Tj., Ph.D selaku ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Airlangga serta dosen penguji III yang telah memberikan saran-saran.
5. Prof. Dr. A. Hamid A. Hadi dan Drs. Nordin Saidi, M.Si dari University of Malaya, Kualalumpur, Malaysia atas bantuan pengukuran spektrum NMR.
6. Bapak, Ibu dosen dan para staf jurusan kimia FMIPA UNAIR.

7. Drs. Wardaya dan bapak Tugiyono dari LIPI UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi Pasuruan, atas bantuan dalam penyediaan bahan tumbuhan penelitian.
8. (Pak D) dan mbak ambar yang banyak membantu selama penelitian di Lab. Organik, serta mas Fendi selama di Lab. Komputer.
9. Teman-teman seperjuangan di Lab. Organik dan Biokimia, mbak Dahlia, mbak Azizah, Yus, Andin, Yenny, Masrifah, Dimas, Ani, Anita, One, dll.
10. Senior-senior ORBA (Organik Bahan Alam), mbak Mia, mbak Noe, mas Robert (The *Saccopetalum* team) atas motivasi, pinjaman buku, dan informasi yang telah diberikan.
11. Bapak, Ibu, kakak, kakak ipar, keponakan serta adikku atas doa, kepercayaan, dan nasehat serta kasih sayang yang telah diberikan.
12. Teman-teman Q3A 2001, 2002, dan 2003 yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
13. Temanku, mbah Die, Komaidi, Azi', teman-teman KKN lainnya serta Eko di ITS dan Fitri di UBAYA atas bantuannya selama *hunting* jurnal.
14. Teman-teman kosku (mbak Riska, mbak Wanti, mbak Ika, mbak Eva, Dewi, Retno, Pepti, Ratih, Nyoman, dan lain-lain) atas dukungan dan motivasinya.
15. Seseorang yang telah, sedang, dan akan mendampingiku atas waktu luang, saran dan bantuan yang diberikan serta *special to* (Alm) mas Aziz, semoga mendapat "wisuda yang terbaik" di akhirat.
16. Semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penulisan skripsi.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penyusun mengharapkan kritik dan saran dari pembaca untuk menyempurnakan skripsi ini. Penyusun berharap semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Juli 2005
Penyusun

Nanik Fauziah

Nanik Fauziah, 2005, Isolasi dan Uji Aktivitas Inhibitor *Xanthine Oxidase* Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Skripsi ini di bawah bimbingan Drs. Mulyadi Tanjung, MS dan Dr. Alfinda Novi K. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Airlangga.

ABSTRAK

Pada umumnya masyarakat Indonesia menggunakan obat-obatan tradisional yang berasal dari tumbuhan untuk mengobati penyakit asam urat. Tumbuhan tersebut mengandung senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Annonaceae) terdapat senyawa flavonoid yang memperlihatkan aktivitas antioksidan yakni sebagai antiradikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid minor yang terdapat pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Annonaceae) dan menentukan aktivitasnya sebagai inhibitor *xanthine oxidase*. Ekstraksi senyawa flavonoid dilakukan dengan metode maserasi pada suhu kamar menggunakan pelarut aseton. Ekstrak aseton kemudian ditambah metanol-air 10 % dan diekstraksi dengan n-heksana. Ke dalam fraksi metanol selanjutnya ditambah asam sitrat 5 % (pH 3-4) dan ekstraksi dilanjutkan dengan etil asetat. Ekstrak etil asetat yang diperoleh kemudian dipisahkan dan dimurnikan menggunakan berbagai teknik kromatografi dengan berbagai perbandingan campuran eluen menghasilkan dua senyawa flavonoid. Penentuan struktur senyawa flavonoid hasil isolasi ditetapkan berdasarkan analisis spektroskopi UV-Vis, IR, ¹H-RMI, dan ¹³C-RMI, dan diketahui bahwa kedua senyawa flavonoid tersebut dikenal sebagai 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dan 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon. Berdasarkan hasil uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* diketahui bahwa senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dapat menghambat pembentukan asam urat dengan IC₅₀ sebesar 1,18 μM (4,08.10⁻⁴ ppm), sedangkan terhadap senyawa 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon tidak dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* karena massanya terbatas.

Kata kunci: *Saccopetalum horsfieldii* Benn, Annonaceae, 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon; 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon, flavonoid, *xanthine oxidase*.

Nanik Fauziah, 2005, Isolation of Flavonoid Compound from *Saccopetalum horsfieldii* Benn Stem Bark and Its Inhibitor Activity Test of *Xanthine Oxidase*. This study is under guidance of Dr. Alfinda Novi Kristanti and Drs. Mulyadi Tanjung, MS, Department of Chemistry, Mathematic and Natural Science Faculty, Airlangga University.

ABSTRACT

Generally Indonesian people use herbal medicine plants to treat uric acid. These plants contain flavonoid compound that actives as antioxidant. Based on previous research, it has been reported that the stem bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn contains flavonoids compound which showed antioxidant activity as free radical scavenger. The purpose of this research is to isolate a minor flavonoid compound from the stem bark of *Saccopetalum horsfieldii* Benn (Annonaceae) and to determine its activity as an inhibitor of *xanthine oxidase*. Extraction has been done by maceration method at room temperature using acetone as a solvent. The separation was carried out by combination of gravitation column chromatography and flash column chromatography, produced two flavonoid compounds. The structure of flavonoid compounds were established on the basis of UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, and $^{13}\text{C-NMR}$, they were known as 3,5,2',4'-tetrahydroxy-7,3'-dimethoxyflavon and 3,5,6,7,8,3',4'-heptahydroxyflavon. The test activity of 3,5,2',4'-tetrahydroxy-7,3'-dimethoxyflavon as inhibitor *xanthine oxidase* showed that this compound has inhibitor activity of *xanthine oxidase* with IC_{50} 1,18 μM ($4,08 \cdot 10^{-4}$ ppm), while 3,5,6,7,8,3',4'-heptahydroxyflavon can't be examined further since the result was limited.

Key Word: *Saccopetalum horsfieldii* Benn, Annonaceae, 3,5,2',4'-tetrahydroxy-7,3'-dimethoxyflavon, 3,5,6,7,8,3',4'-heptahydroxyflavon, flavonoid, *xanthine oxidase*.

DAFTAR ISI

Halaman Judul		
Lembar Pengesahan		
Kata Pengantar		iii
Abstrak		vi
Abstract		vii
DAFTAR ISI		viii
DAFTAR GAMBAR		x
DAFTAR TABEL		xi
DAFTAR LAMPIRAN		xii
BAB I	PENDAHULUAN	
1.1	Latar Belakang Masalah	1
1.2	Rumusan Masalah	3
1.3	Tujuan Penelitian	4
1.4	Manfaat Penelitian	4
BAB II	TINJAUAN PUSTAKA	
2.1	Annonaceae	5
2.2	<i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn	6
2.3	Flavonoid	8
2.3.1	Biosintesis senyawa flavonoid	9
2.3.2	Senyawa flavonoid dalam Annonaceae	11
2.4	Ekstraksi	13
2.4.1	Bahan tumbuhan	13
2.4.2	Ekstraksi	13
2.5	Kromatografi	14
2.5.1	Kromatografi lapis tipis	14
2.5.2	Kromatografi kolom gravitasi	15
2.5.3	Kromatografi cair vakum	16
2.5.4	Kromatografi kolom cepat	17
2.6	Analisis Spektroskopi	18
2.6.1	Spektroskopi ultraviolet	18
2.6.2	Spektroskopi inframerah	21
2.6.3	Spektroskopi resonansi magnetik inti proton	22
2.6.4	Spektroskopi resonansi magnet inti karbon	23
2.7	Metabolisme Asam Urat	24
2.9	Hubungan Struktur Flavonoid-Aktivitas <i>Xanthine Oxidase</i> Inhibitor	28

BAB III	METODE PENELITIAN	
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian	30
3.2	Bahan dan Alat Penelitian	30
3.2.1	Bahan penelitian	30
3.2.2	Bahan kimia	30
3.2.3	Alat-alat penelitian	31
3.3	Prosedur Kerja.....	31
3.3.1	Penyiapan bahan penelitian	31
3.3.2	Ekstraksi.....	32
3.3.3	Isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid	32
3.3.4	Uji sifat fisika senyawa flavonoid.....	34
3.3.5	Analisis spektroskopi senyawa flavonoid	34
3.3.5.1	Spektroskopi UV-Vis	34
3.3.5.2	Spektroskopi inframerah	35
3.3.5.3	Spektroskopi resonansi magnet inti proton...	35
3.3.5.4	Spektroskopi resonansi magnet inti karbon..	35
3.4	Uji Aktivitas Inhibitor <i>Xanthine Oxidase</i>	35
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Flavonoid.....	40
4.1.1	Hasil ekstraksi senyawa flavonoid.....	40
4.1.2	Hasil isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid.....	41
4.2	Analisis Spektroskopi Senyawa Flavonoid D-I	43
4.2.1	Analisis spektroskopi senyawa flavonoid D-I	43
4.2.1	Analisis spektroskopi senyawa flavonoid G-I	50
4.3	Hasil Uji Senyawa Inhibitor <i>Xanthine Oxidase</i>	53
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	55
5.2	Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	57
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
Gambar 2.1	Biosintesis flavonoid	10
Gambar 2.2	Alat kromatografi kolom grafitasi	16
Gambar 2.3	Alat kromatografi kolom cair vakum	17
Gambar 2.4	Alat kromatografi kolom cepat	18
Gambar 2.5	Senyawa kompleks Al pada flavonoid yang terbentuk setelah penambahan $AlCl_3$ dan $AlCl_3/HCl$	21
Gambar 2.6	Metabolisme nukleotida purin	26
Gambar 2.7	Degradasi <i>xanthine</i> menjadi urea yang dapat larut dalam air	26
Gambar 2.8	Bengkak pada persendian yang disebabkan oleh adanya kristal asam urat	27
Gambar 3.1	Reaksi oksidasi <i>xanthine oxidase</i> (XO) terhadap <i>xanthine</i> untuk menghasilkan asam urat	36
Gambar 3.2	Skema Kerja Isolasi Flavonoid dan Uji aktivitas sebagai Inhibitor <i>Xanthine Oxidase</i> dari Kulit Batang Tumbuhan <i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn.....	39
Gambar 4.1	Grafik hubungan antara % inhibitor <i>xanthine oxidase</i> dan konsentrasi sampel.....	54

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul Tabel	Halaman
Tabel 2.1	Hubungan antara diameter kolom dan ukuran cuplikan (tinggi lapisan penyerap \pm 15 cm)	18
Tabel 2.2	Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid	20
Tabel 2.3	Nilai IC_{50} senyawa flavonoid sebagai inhibitor <i>xanthine oxidase</i>	29
Tabel 4.1	Uji kemurnian senyawa flavonoid D-1	42
Tabel 4.2	Uji kemurnian senyawa flavonoid G-1	43
Tabel 4.3	Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor <i>xanthine oxidase</i> berbagai konsentrasi senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon.....	54

DAFTAR LAMPIRAN

<u>Lampiran</u>	<u>Judul Lampiran</u>
1	Foto tumbuhan <i>Saccopetalum horsfieldii</i> Benn
2	Kromatogram hasil kromatografi senyawa D-1 dan G-1
3	Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam MeOH dan $AlCl_3$
4	Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam $AlCl_3/HCl$ dan NaOAc
5	Gambar spektrum IR dan ^{13}C -NMR senyawa D-1
6	Gambar spektrum 1H -NMR senyawa D-1
7	Gambar spektrum UV-Vis senyawa G-1 dalam MeOH
8	Gambar spektrum 1H -NMR senyawa G-1

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Asam urat merupakan salah satu penyakit degeneratif yang jumlah penderitanya masih tergolong tinggi di Indonesia. Gejala yang dirasakan oleh penderita yaitu rasa nyeri pada daerah persendian karena terbentuknya kristal asam urat sehingga menyebabkan sendi menjadi bengkak, dan kulit menjadi merah atau keunguan (Utami, 2004). Asam urat merupakan hasil dari salah satu rangkaian metabolisme basa purin yang tidak larut dalam air. Hal ini disebabkan manusia tidak mempunyai enzim *urikase* yang berfungsi untuk menghidrolisis asam urat menjadi allantoin yang larut dalam air sehingga asam urat menjadi produk akhir dari metabolisme tersebut (Campbell, 1995).

Keanekaragaman hayati Indonesia menyebabkan masyarakat masih sering menggunakan obat-obatan tradisional (jamu) yang berasal dari tumbuhan untuk mengobati berbagai penyakit. Salah satu contoh yaitu digunakannya daun salam (*Eugenia polyantha*), daun tempuyung (*Sonchus arvensis*), meniran (*Phyllanthus niruri*) dan mengkudu (*Morinda citrifolia*) dalam mengobati asam urat. Hal ini disebabkan tumbuhan tersebut mengandung senyawa flavonoid yang bersifat sebagai antioksidan (Utami, 2004).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah atau menghambat reaksi oksidasi dari oksidan sehingga *oxidative damage* dapat ditekan. Sifat antioksidan di antaranya dapat menghambat pembentukan spesies oksigen reaktif

(ROS) melalui penghambatan aktivitas enzim dalam pembentukan ROS, dan dapat memerangkap radikal bebas (Scavenging) (Cuendet, 1997). Antioksidan dapat menghambat aktivitas enzim, salah satu di antaranya adalah enzim *xanthine oxidase (X.O)*. Enzim tersebut dapat mengoksidasi *xanthine* menjadi asam urat. Berdasarkan hasil penelitian, senyawa flavonoid yang dapat menghambat kerja enzim *xanthine oxidase* antara lain : baicalen, kaempferol, morin, dan isorhamnetin (Cos, 1998; Desco, 2002).

Senyawa kuersetin, kuersetrin, rutin, kaempferol, katekin, dan epikatekin merupakan senyawa flavonoid yang sering dijumpai pada beberapa spesies dari famili Annonaceae (Hakim, 2001). *Saccopetalum horsfieldii* Benn merupakan salah satu spesies dari famili Annonaceae. Senyawa flavonoid yang sudah berhasil diisolasi dari ekstrak diklorometana dan metanol tumbuhan ini antara lain : 2-(3',4'-dihidroksi-2"-metoksi fenil)-5,7-dihidroksi-6-metoksi-kromen-4-on atau 2-(3',4'-dihidroksi-2"-metoksi fenil)-5,7-dihidroksi-8-metoksi-kromen-4-on (Wibowo, 2002), kamuvaretin (Fatatik, 2002), kuersetin-3,7-dimetil eter (Mahmiah, 2003), dan kuersetin-3,7,4'-trimetil eter (Fatimah, 2004). Senyawa kuersetin-3,7-dimetil eter memperlihatkan aktivitas antioksidan yakni sebagai antiradikal bebas dengan kemampuan IC_{50} 258,48 ppm (Mahmiah, 2003). Kromatogram hasil kromatografi lapis tipis dari penelitian tersebut masih menunjukkan beberapa noda sehingga diduga masih banyak senyawa flavonoid lain yang mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa flavonoid minor yang terdapat pada ekstrak aseton dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

Skринing awal untuk mengisolasi senyawa flavonoid dilakukan dengan pereaksi DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil) secara *assay autografi* KLT untuk menentukan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan munculnya noda berwarna kuning yang selanjutnya dijadikan target untuk diisolasi dan ditentukan aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase*. Enzim *xanthine oxidase* merupakan enzim yang dapat mengoksidasi substrat *xanthine* menjadi asam urat. Isolasi senyawa flavonoid dilakukan sebagaimana lazimnya dalam suatu penelitian bahan alam yaitu melalui tahapan ekstraksi, pemisahan yang terdiri dari beberapa tahap fraksinasi diikuti pemilihan fraksi yang potensial dengan penentuan assay kromatografi lapis tipis, dilanjutkan dengan proses pemurnian dan identifikasi atau penentuan struktur. Penentuan struktur senyawa flavonoid hasil isolasi ditentukan dengan menggunakan metode spektroskopi ultraviolet, inframerah, dan resonansi magnetik inti. Senyawa hasil isolasi flavonoid selanjutnya ditentukan aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* dengan menentukan daya hambat IC_{50} terhadap aktivitas enzim *xanthine oxidase* secara spektrometri.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. bagaimanakah struktur senyawa flavonoid lain yang terdapat pada ekstrak aseton dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn ?
2. apakah senyawa flavonoid tersebut mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. menentukan struktur senyawa flavonoid lain yang terdapat pada ekstrak aseton dari kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.
2. menentukan daya hambat (IC_{50}) senyawa flavonoid hasil isolasi terhadap enzim *xanthine oxidase*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi mengenai struktur senyawa flavonoid lain dengan aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* yang terdapat pada kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn yang diharapkan dapat menghambat pembentukan asam urat. Di samping itu juga memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu kimia bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Annonaceae

Annonaceae merupakan salah satu dari famili tumbuhan yang tersebar di daerah tropis dan subtropis. Pusat penyebaran utama tumbuhan ini berada di daerah Asia dan Australia. Di Indonesia sendiri terdapat lebih dari 20 genus dengan lebih dari 40 spesies Annonaceae. Genus utama yang termasuk famili ini adalah *Guatteria*, *Uvaria*, *Annona*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Artabotrys*, *Goniothalamus*, dan *Xylopi*a (Heyne, 1987). Di Indonesia banyak masyarakat yang memanfaatkan famili tumbuhan ini antara lain sebagai bahan pangan, misalnya buah nona atau srikaya (*Annona squamosa*), sebagai bahan insektisida, misalnya *A. reticulata*, *A. muricata* (Hegnauer, 1969) dan obat tradisional (Heyne, 1987).

Famili tumbuhan ini menghasilkan metabolit sekunder yakni senyawa non fenolik dan fenolik. Senyawa non fenolik antara lain golongan terpenoid dan steroid. Senyawa fenolik yang dihasilkan terdiri atas flavonoid, santon terisoprenilasi, asetogenin, lignan dan alkaloid. Senyawa tersebut memperlihatkan aktivitas yang menarik antara lain antitumor, antikanker, antioksidan, antimikroba dan insektisida (Hakim, 2001).

2.2 *Saccopetalum horsfieldii* Benn

Saccopetalum horsfieldii Benn merupakan salah satu spesies dari genus *Saccopetalum* yang terdapat di Indonesia selain *Saccopetalum heterophylla* dan *Saccopetalum* sp. Nama daerah tumbuhan ini adalah Janglot/Kalak Kembang (Jawa) dan Kalak (Sunda). Tumbuhan ini mempunyai pohon yang tingginya dapat mencapai 20 m. Di hutan jati, di daerah Jawa Tengah, tumbuhan ini ditemukan pada ketinggian 400 m dari permukaan air laut. Tumbuhan ini mempunyai batang tegak dan berbentuk bulat torak. Nilai ekonomi tumbuhan terdapat pada kayu, di mana kayu tersebut liat dan berserat. Di daerah Kedung Jati, Jawa Tengah, daun tanaman ini dicampur dengan bahan lain dan digunakan sebagai obat-obatan tradisional (Heyne, 1987).

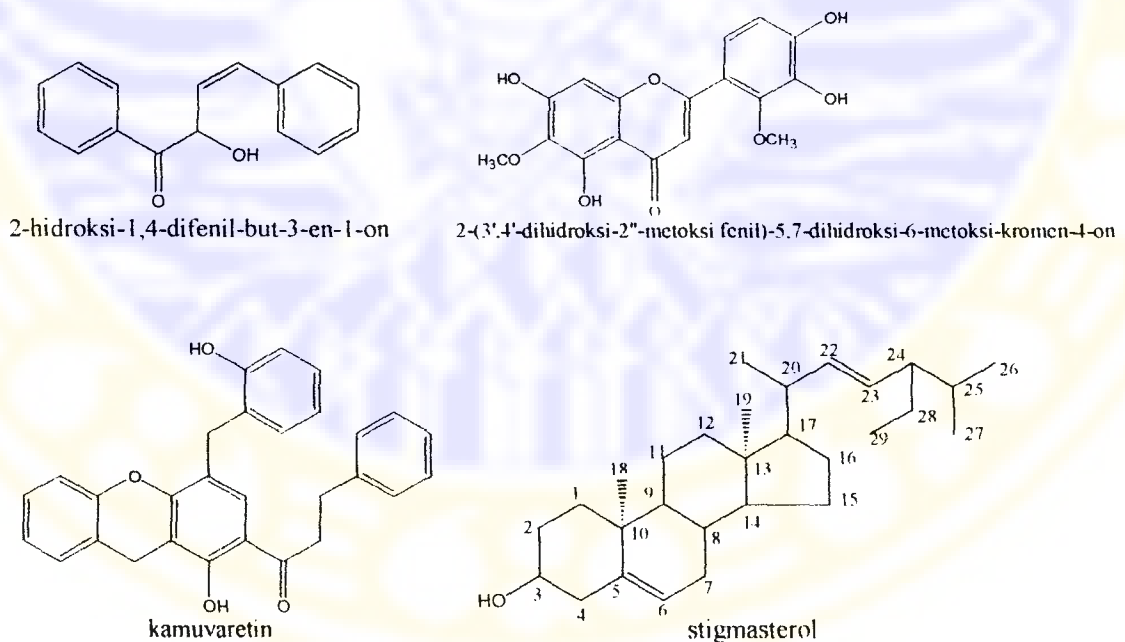
Menurut Tjitrosoepomo (1996), taksonomi *Saccopetalum horsfieldii* Benn dalam kingdom *Plantae* adalah sebagai berikut :

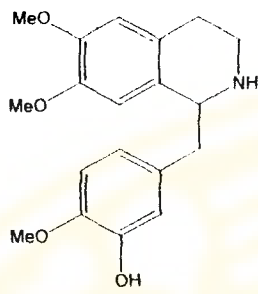
- Divisio : Spermatophyta
- Sub Divisio : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledonae
- Ordo : Polycarpaceae
- Famili : Annonaceae
- Genus : *Saccopetalum*
- Spesies : *Saccopetalum horsfieldii* Benn

Senyawa kimia yang telah diisolasi dari tanaman ini antara lain senyawa lignan yaitu 2-hidroksi-1,4-difenil-but-3-en-1-on (Utomo, 2002). Senyawa flavonoid antara lain 2-(3',4'-dihidroksi-2''-metoksi fenil)-5,7-dihidroksi-6-

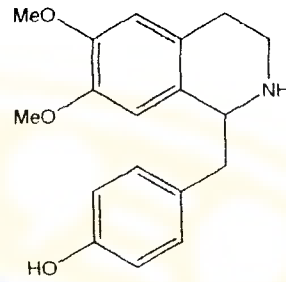
metoksi-kromen-4-on atau 2-(3',4'-dihidroksi-2''-metoksi fenil)-5,7-dihidroksi-8-metoksi-kromen-4-on (Wibowo, 2002), kamuvaretin (Fatatik, 2002), kuersetin-3,7-dimetil eter (Mahmiah, 2003) dan kuersetin-3,7,4'-trimetil eter (Fatimah, 2004). Senyawa steroid dan terpenoid antara lain stigmasterol dan minyak atsiri (Qomariyah, 2003). Senyawa alkaloid yang berhasil diisolasi diantaranya senyawa norarmepavin (Yulisaroh, 2003), norlaudanisin (Yuliastutik, 2003) dan liriodenin (Ismaryono, 2004).

Senyawa kuersetin-3,7-dimetil eter (Mahmiah, 2003) mempunyai aktivitas sebagai antiradikal bebas, kuersetin-3,7,4'-trimetil eter (Fatimah, 2004), yang mempunyai toksisitas terhadap *Aedes aegypti* dan mempunyai aktivitas insek *antifeedant* terhadap ulat sutra (*Bombix mori*) sedangkan senyawa liriodenin mempunyai aktivitas *insect antifeedant* terhadap ulat sutra (*Bombix mori*) (Ismaryono, 2004).

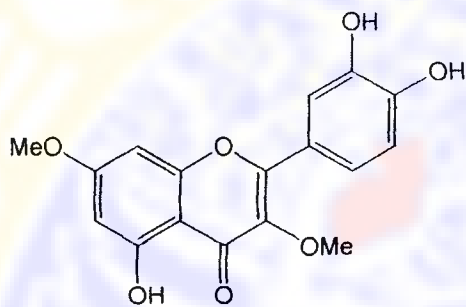




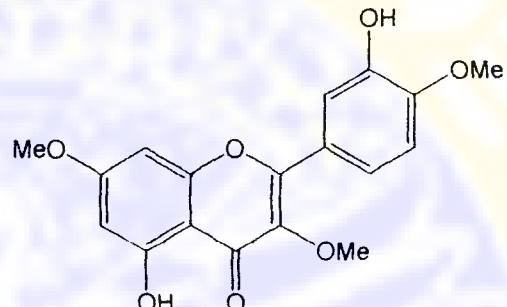
norlaudanisin



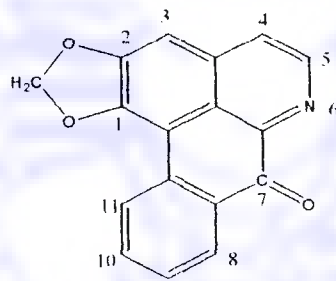
norarnepavin



kuersetin-3,7-dimetil eter



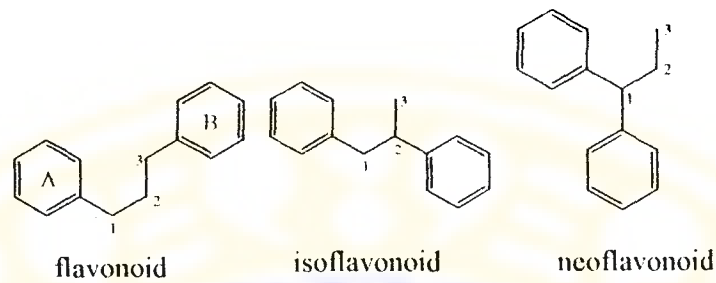
kuersetin-3,7,4'-trimetil eter



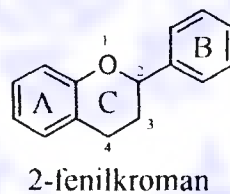
lirioidenine

2.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenolik terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzen (C_6) terikat pada suatu rantai propan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan C_6 - C_3 - C_6 . Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid (Achmad, 1986).



Senyawa-senyawa flavon ini mempunyai kerangka 2-fenilkroman, dimana posisi *orto* dari cincin A dan atom karbon yang terikat pada cincin B dari 1,3-diarilpropan dihubungkan oleh jembatan oksigen, sehingga membentuk suatu cincin heterosiklik yang baru (cincin C) (Achmad, 1986).



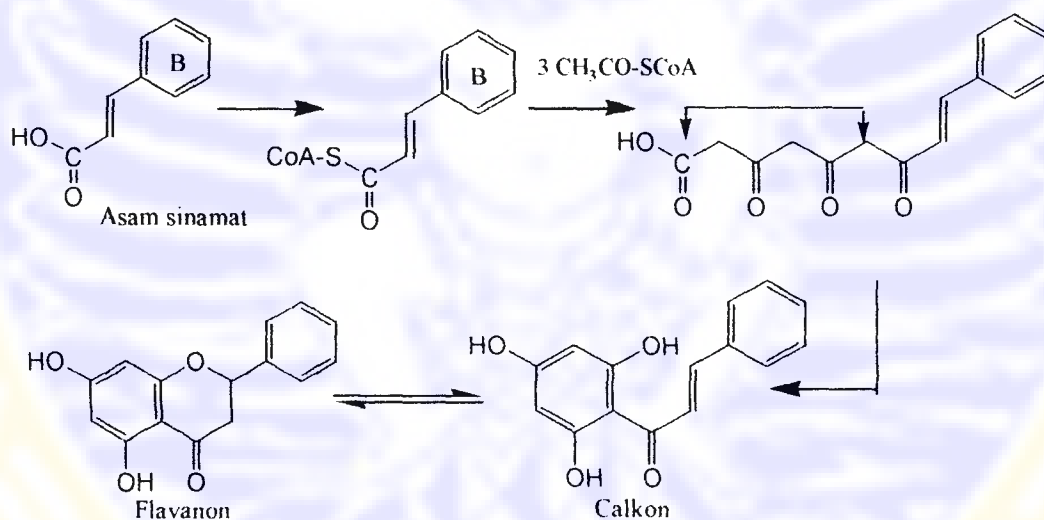
Banyaknya jumlah senyawa flavonoid yang ditemukan di alam, bukan semata-mata disebabkan oleh berbagai variasi struktur dasar, akan tetapi lebih lagi disebabkan oleh variasi dalam hidroksilasi, alkoksilasi, dan glikosilasi pada struktur dasar tersebut (Achmad, 1986).

2.3.1 Biosintesis flavonoid

Pola biosintesis flavonoid pertama kali disarankan oleh Birch. Menurut Birch, tahap pertama biosintesis flavonoid terjadi dari kombinasi unit C_6-C_3 dengan tiga unit C_2 menghasilkan $C_6-C_3-(C_2+C_2+C_2)$. Kerangka C_{15} yang dihasilkan dari kombinasi ini telah mengandung gugus-gugus fungsi oksigen pada posisi-posisi yang diperlukan.

Cincin A dari struktur flavonoid berasal dari jalur poliketida, yakni kondensasi dari tiga unit asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan tiga atom karbon dari rantai propan berasal dari jalur fenilpropanoid (jalur shikimat). Dengan demikian, kerangka dasar karbon dari flavonoid dihasilkan dari kombinasi antara dua jalur biosintesis yang utama untuk cincin aromatik, yakni jalur shikimat dan jalur asetat-malonat.

Akibat dari berbagai perubahan yang disebabkan oleh enzim, ketiga atom karbon dari rantai propan dapat menghasilkan berbagai gugus fungsi, seperti ikatan rangkap, gugus hidroksil, gugus karbonil dan sebagainya. Adapun pokok-pokok reaksi biosintesis flavonoid ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Biosintesis Flavonoid

Pembentukan senyawa flavonoid dimulai dengan memperpanjang unit fenilpropanoid (C₆-C₃) yang berasal dari turunan sinamat seperti asam p-kumarat, kadang-kadang asam kafeat, asam ferulat atau asam sinapat. Dari percobaan dapat

diketahui bahwa khalkon dan isomer flavanon berperan sebagai senyawa antara dalam biosintesis berbagai jenis flavonoid lainnya (Achmad, 1986).

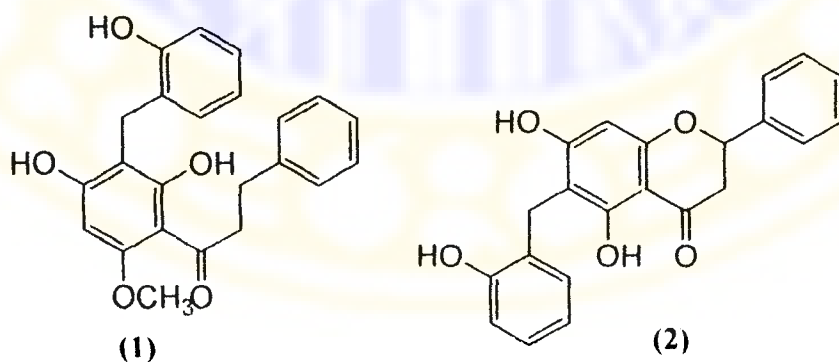
2.3.2 Senyawa flavonoid dalam Annonaceae

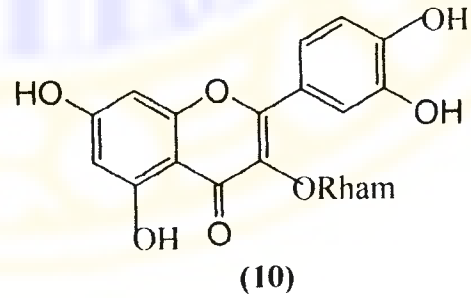
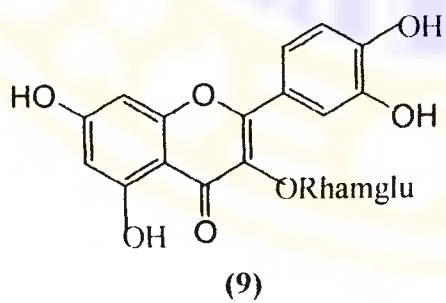
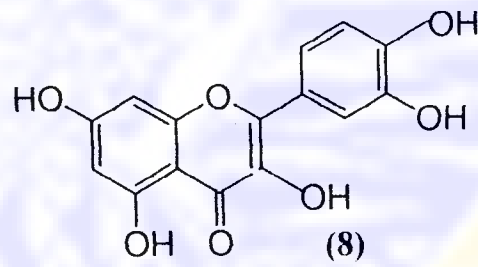
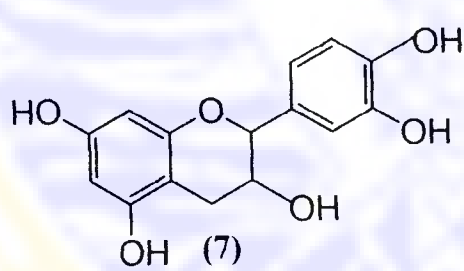
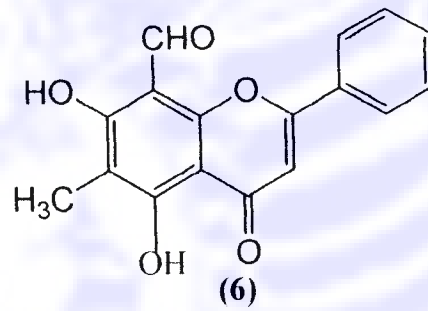
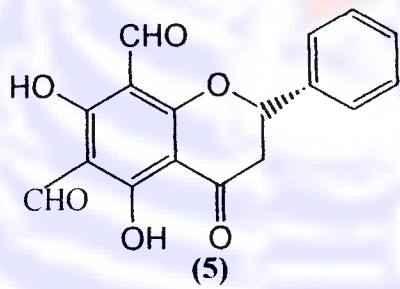
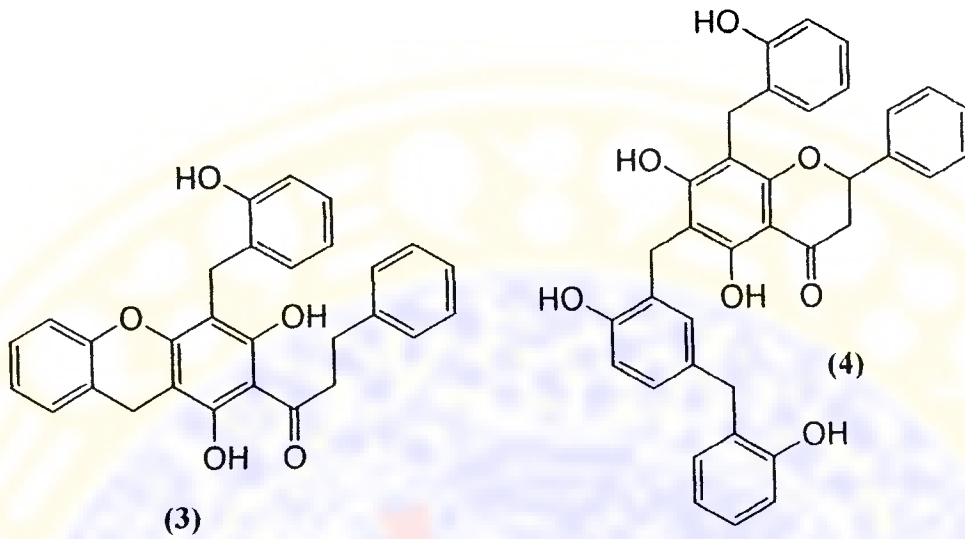
Senyawa flavonoid yang menarik ditemukan pada Annonaceae antara lain senyawa flavonoid golongan C-benzilflavonoid dan C-formilflavonoid disamping senyawa flavonoid yang umum ditemukan (Hakim, 2001).

Senyawa C-benzilflavonoid yang ditemukan antara lain uvaretin (1), isouvaretin (2), chamuvaretin (3), dan uvarinol (4) yang terdapat pada *Uvaria ongolensis* dan *Uvaria chamae*. Senyawa C-benzilflavonoid tersebut memperlihatkan aktivitas sebagai antimikroba dan antitumor (Hakim, 2001; Hufford, 1978; Okorie, 1977).

Senyawa C-formilflavonoid *Unnona lawii* antara lain lawinal (5), dan unonal (6) (Chopin, 1978).

Disamping itu juga, senyawa flavonoid yang ada pada Annonaceae juga terdapat pada famili tumbuhan lain, seperti, katekin (7), kuersetin (8), kuersetrin (9), rutin (10), dan sebagainya. Senyawa flavonoid tersebut memperlihatkan aktivitas sebagai antioksidan, antitumor, radikal bebas scavengers, dan inhibitor *xanthine oxidase* (Cos, 1998; Cuendet, 1997).





2.4 Ekstraksi

2.4.1 Bahan tumbuhan

Bahan tumbuhan yang ideal digunakan untuk mengisolasi senyawa kimia yang terdapat dalam jaringan tumbuhan segar dapat berupa kulit, akar, buah, atau daun dalam bentuk segar atau kering. Pengeringan jaringan tumbuhan harus dilakukan dalam keadaan terawasi sehingga tidak terjadi perubahan kimia akibat kontaminasi dengan jamur atau mikroba yang lainnya. Bahan harus dikeringkan secepatnya tanpa menggunakan suhu tinggi dan dengan aliran udara yang baik (Harborne, 1987).

2.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi (Harborne, 1987).

Ekstraksi senyawa flavonoid sebaiknya menggunakan pelarut pada suhu kamar, seperti maserasi. Untuk mengekstraksi kandungan senyawa flavonoid yang terdapat dalam jaringan tanaman dapat digunakan pelarut polar seperti metanol, etanol, atau pelarut semi polar seperti aseton. Pada umumnya senyawa metabolit sekunder termasuk senyawa flavonoid dapat terekstrak dengan pelarut metanol, etanol, atau aseton. Selanjutnya ekstrak kasar dipartisi dengan pelarut non polar untuk memisahkan lemak atau senyawa non polar dari ekstrak kasar tersebut. Jika senyawa non polar sudah terekstraksi secara keseluruhan, maka ekstraksi

dilanjutkan dengan menggunakan pelarut semi polar seperti kloroform atau etil asetat. Senyawa fenolik, termasuk di dalamnya flavonoid, dapat terekstraksi dengan pelarut semi polar (Markham, 1988).

2.5 Kromatografi

Ekstrak kasar yang diperoleh dari proses ekstraksi mengandung beberapa macam senyawa, sehingga untuk memperoleh senyawa murni harus dilakukan tahapan proses pemisahan dan pemurnian (Harborne, 1987).

Teknik pemisahan dan pemurnian yang umum digunakan adalah kromatografi. Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu campuran zat-zat kimia berdasarkan distribusinya dalam fasa gerak dan fasa diam. Metode kromatografi merupakan teknik pemisahan campuran senyawa kimia dari senyawa-senyawa yang mempunyai berat molekul rendah sampai tinggi (Gritter, 1991).

Metode kromatografi yang sering digunakan dalam pemisahan antara lain: kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom gravitasi, kromatografi cair vakum, kromatografi kolom cepat, dan sebagainya. Pemisahan dan pemurnian kandungan senyawa dalam tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari metode kromatografi atau gabungan dari metode tersebut.

2.5.1 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis merupakan salah satu jenis kromatografi cair-cair yang sering digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa kimia berdasarkan

perbedaan absorpsi atau partisi zat antara fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, pelat polimer atau logam. Fasa diam atau adsorben yang biasa digunakan antara lain: silika gel, alumina, sphadex dan selulosa. Fasa gerak dapat berupa pelarut tunggal tetapi dalam penerapannya merupakan pelarut campuran (Gritter, 1991).

Sampel dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai selanjutnya sampel ditotolkan pada plat kromatografi lapis tipis dengan pipa kapiler dan dielusi dengan pelarut yang sesuai. Kromatogram yang dihasilkan dapat dilihat di bawah sinar UV atau direaksikan dengan pereaksi warna seperti pereaksi Cerium sulfat. Dari hasil kromatogram dapat diperkirakan jumlah senyawa dari masing-masing fraksi. Harga R_f untuk masing-masing senyawa antara satu dengan yang lainnya berbeda sehingga kromatografi ini dapat juga dipakai untuk uji kemurnian suatu senyawa (Gritter, 1991).

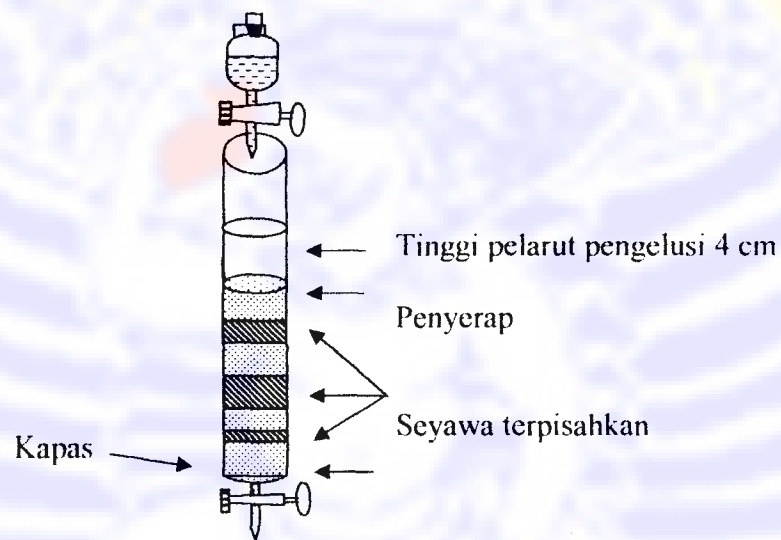
$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

2.5.2 Kromatografi kolom gravitasi

Kromatografi kolom gravitasi merupakan metode kromatografi terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar. Pada kromatografi kolom gravitasi, ekstrak senyawa yang akan dipisahkan diletakkan di atas kolom yang berisi adsorben dilanjutkan dengan elusi bertahap dari setiap komponen menggunakan pelarut (fasa gerak) yang sesuai. Sistem pelarut yang digunakan

mengelusi didasarkan pada tingkat kepolaran masing-masing pelarut. Adsorben yang biasa digunakan adalah silika gel, alumina, dan selulosa (Gritter, 1991).

Kelemahan dari kromatografi ini adalah membutuhkan waktu yang lama dan pelarut yang banyak sehingga tidak efektif jika digunakan dalam proses pemisahan. Pada kromatografi kolom gravitasi, biasanya digunakan campuran pelarut yang kepolarannya ditingkatkan secara gradien (Gritter, 1991).



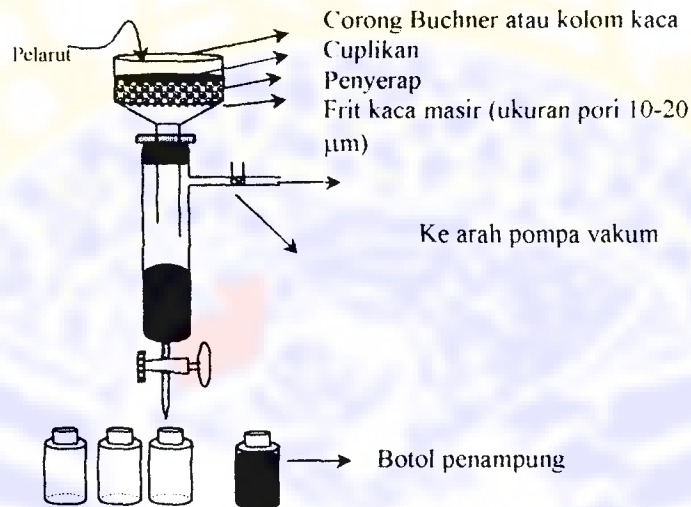
Gambar 2.2. Alat Kromatografi Kolom Gravitasi

2.5.3 Kromatografi cair vakum

Pada dasarnya kromatografi cair vakum hampir sama dengan kromatografi kolom gravitasi, hanya saja pada kromatografi cair vakum laju aliran fasa gerak ditingkatkan dengan menggunakan tekanan rendah serta menggunakan fasa diam yang ukurannya paling halus.

Kromatografi ini memerlukan waktu yang relatif lebih cepat dan hemat pelarut jika dibandingkan dengan kromatografi kolom gravitasi. Elusi senyawa sama seperti pada kromatografi kolom gravitasi, sampel dielusi dengan

menggunakan eluen yang sesuai dan ditingkatkan gradien kepolarannya secara perlahan-lahan. Kolom dalam hal ini dihisap dengan vakum sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettman, 1995).



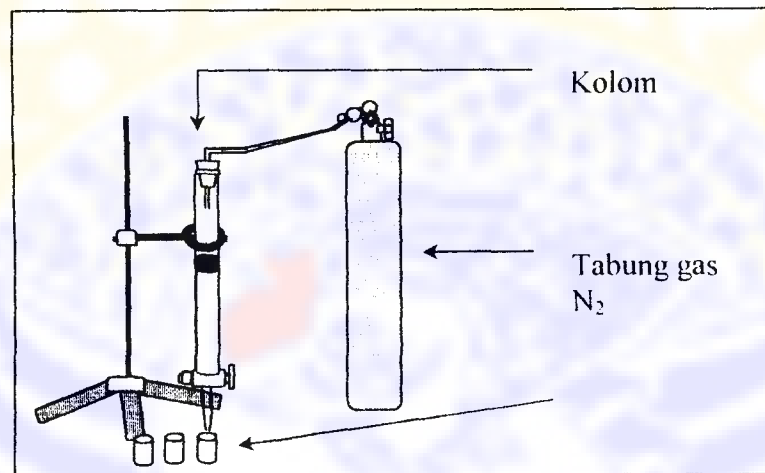
Gambar 2.3. Alat Kromatografi Cair Vakum

2.5.4 Kromatografi kolom cepat

Konsep kromatografi kolom cepat sangat sederhana yaitu pemisahan preparatif menggunakan kromatografi kolom biasa yang dimodifikasi dengan bantuan tekanan gas nitrogen. Laju aliran kromatografi kolom cepat ini 50-60 mL per menit. Keuntungan kromatografi ini dibanding kromatografi kolom biasa adalah waktu yang diperlukan relatif lebih singkat. Cuplikan sebanyak 0,01-10,0 g dapat dipisahkan dalam waktu relatif cepat.

Pemilihan kolom disesuaikan dengan jumlah cuplikan yang akan dipisahkan. Banyaknya cuplikan berbanding lurus dengan luas penampang kolom. Berbagai penyerap telah dipakai pada kromatografi ini, dan jika dipakai silika gel,

yang paling sering digunakan adalah silika gel G_{60} 63-200 μm (Hostettman, 1995).



Gambar 2.4. Alat Kromatografi Kolom Cepat

Tabel 2.1. Hubungan antara diameter kolom dan ukuran cuplikan (tinggi lapisan penyerap ± 15 cm).

Diameter kolom (mm)	Volume pengelusi (mL)	Besarnya cuplikan (mg)		Volume fraksi (mL)
		$\Delta R_f \geq 0,2$	$\Delta R_f \geq 0,1$	
10	100	100	40	5
20	200	400	160	10
30	400	900	360	20
40	600	1600	600	30
50	1000	2500	1000	50

(sumber : Still dalam Hostettman, 1995).

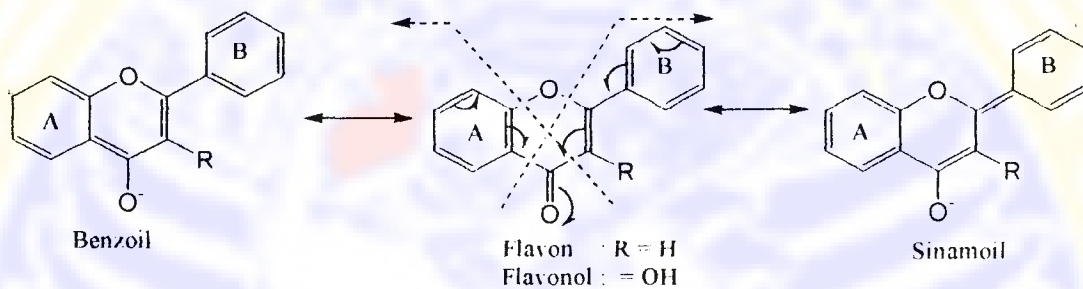
2.6 Analisis Spektroskopi

2.6.1 Spektroskopi ultraviolet

Spektroskopi ultraviolet merupakan salah satu cara yang sangat penting dalam menganalisis dan mengidentifikasi struktur suatu senyawa flavonoid.

Untuk mengukur spektrum ultraviolet senyawa flavonoid, pada umumnya digunakan pelarut metanol atau etanol.

Analisis spektroskopi ultraviolet senyawa flavonoid memperlihatkan dua pita serapan yang lebar, yakni serapan benzoil (λ_{maks} 240-270 nm) dan sinamoil (λ_{maks} 320-380 nm).



Kedua pita serapan ini, masing-masing berhubungan dengan resonansi gugus sinamoil yang melibatkan cincin B dan gugus benzoil yang melibatkan cincin A dari senyawa flavonoid. Oleh karena itu, penambahan gugus fungsi seperti gugus hidroksi OH atau gugus metoksi OCH_3 pada cincin A dan B akan mengakibatkan pergeseran batokromik. Pola serapan golongan senyawa flavonoid dapat dilihat pada tabel 2.2 (Achmad, 1986; Markham, 1988).

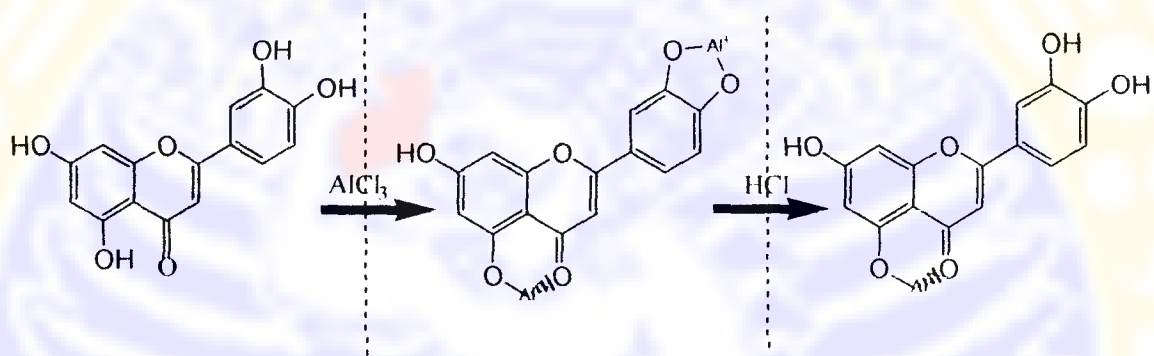
Tabel 2.2. Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis Flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330 bahu kira-kira 320 puncak	Isoflavon Isoflavon (5-deoksi-6,7-dioksigenasi)
275-295	300-330 bahu	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270 (serapan rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (serapan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan Antosianin

(sumber : Markham, 1988)

Selain pola serapan benzoil dan sinamoil, substituen atau gugus fungsi yang terikat pada cincin aromatis senyawa golongan flavonoid dapat diketahui posisinya dengan menambahkan pereaksi geser. Penambahan pereaksi geser dapat meningkatkan efek batokromik. Pereaksi geser yang sering digunakan untuk senyawa flavonoid antara lain: AlCl_3 , $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, NaOAc , $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3$, NaOH , dan NaOMe . Senyawa flavonoid dengan AlCl_3 membentuk kompleks Al yang karakteristik antara gugus karbonil $\text{C}=\text{O}$ pada atom C-4 dan gugus hidroksi OH pada atom C-5, serta o-dihidroksi pada atom C-3' dan C-4'. Adanya kompleks tersebut menyebabkan serapan panjang gelombang sinamoil meningkat sebesar 35-60 nm. Sedangkan adanya o-dihidroksi pada atom C-3' dan C-4' dapat diketahui dari menurunnya serapan panjang gelombang tersebut sebesar - 30-40 nm dikarenakan kompleks Al yang terbentuk pada posisi o-dihidroksi tidak stabil

dengan penambahan asam misalnya HCl. Perceaksi geser NaOAc akan menyebabkan serapan panjang gelombang benzoil meningkat sebesar 5-20 nm dikarenakan adanya gugus hidroksi OH pada atom C-7, sedangkan penambahan H_3BO_3 ke dalam larutan juga dapat dilakukan untuk mendeteksi adanya o-dihidroksi pada atom C-3' dan C-4' yang ditunjukkan dengan adanya pergeseran panjang gelombang sinamoil sebesar 5-30 nm (Harborne, 1987; Markham, 1988).



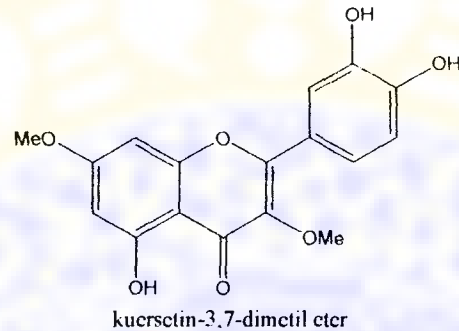
Gambar 2.5. Senyawa kompleks Al pada flavonoid yang terbentuk setelah penambahan $AlCl_3$ dan $AlCl_3/HCl$.

2.6.2 Spektroskopi inframerah

Spektroskopi inframerah berguna untuk menentukan gugus fungsi senyawa organik (Silverstein, 1991).

Senyawa flavonoid mempunyai kerangka struktur yang terdiri atas dua cincin benzen (C_6) yang terikat pada rantai propan (C_3). Pada umumnya senyawa flavonoid mempunyai substituen atau gugus fungsi yang terikat pada cincin benzen antara lain: gugus metoksi (OCH_3) atau gugus hidroksi (OH) dan adanya gugus karbonil ($C=O$) pada inti propan. Pola serapan inframerah senyawa

kuersetin-3,7-dimetil eter yang diisolasi dari penelitian sebelumnya menunjukkan adanya vibrasi ulur OH aromatis yang ditunjukkan dengan puncak yang melebar



pada bilangan gelombang $3204,05\text{ cm}^{-1}$, dan vibrasi ulur C-H aromatis pada bilangan gelombang $2924,35\text{ cm}^{-1}$, sedangkan gugus keton yang terkonjugasi ditunjukkan dengan puncak yang tajam pada bilangan gelombang $1662,79\text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang $1595,27\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan rangkap cincin aromatis dan pada bilangan gelombang $823,68\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya aromatis. Gugus C-O-C ditunjukkan pada bilangan gelombang 1100 cm^{-1} (Silverstein, 1991; Mahmiah, 2003).

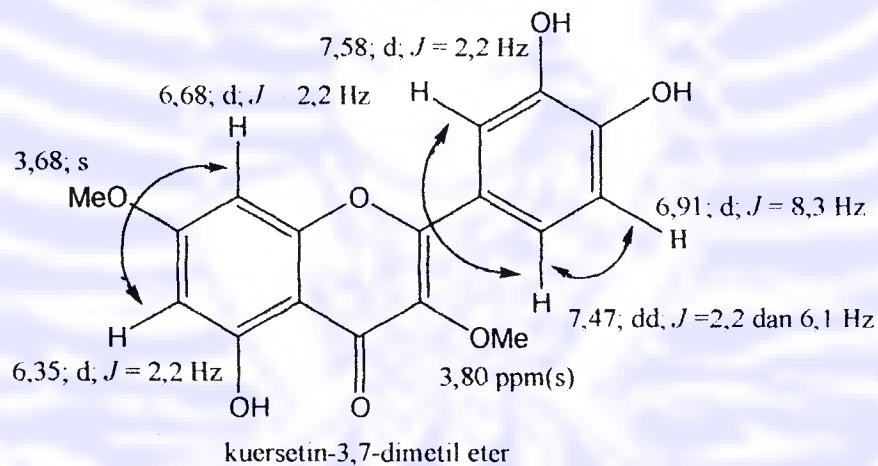
2.6.3 Spektroskopi resonansi magnet inti proton

Spektroskopi proton resonansi magnet inti berguna untuk menentukan jumlah proton atau lingkungan proton dari suatu senyawa. Daerah pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ terletak antara 0-14 ppm. Pelarut yang digunakan untuk mengukur senyawa flavonoid antara lain: aseton- d_6 , DMSO- d_6 , atau metanol- d_4 (Markham, 1988).

Proton senyawa flavonoid terdiri dari kelompok aromatis yaitu pada cincin A, dan cincin B. Pola oksigen selang-seling pada cincin A menyebabkan proton

terletak pada posisi meta. Pada cincin B pola substituen tidak beraturan seperti cincin A sehingga posisi proton tersebut bisa terletak pada posisi orto, meta, dan para. Sinyal pergeseran kimia proton aromatis terlihat pada sinyal 6,5-7,8 ppm. Sinyal proton substituen atau gugus fungsi yang terikat pada cincin aromatis antara lain : proton hidroksi (-OH) terlihat ~ 12 ppm, sedangkan proton metoksi (-OCH₃) terlihat pada 3,80-3,95 ppm (Akitt, 1992; Shriner, 1998).

Hasil spektrum ¹H-RMI senyawa kuersetin-3,7-dimetil eter dalam aseton-d₆ memberikan sinyal pada pergeseran (ppm): 3,68 (s,3H,7-OMe); 3,80 (s,3H,3-OMe); 6,35 (d, *J*=2,2 Hz,H-6); 6,68 (d, *J*=2,2 Hz,H-8); 6,91 (d, *J*=8,3 Hz,H-5'); 7,47 (dd, *J*=2,2 dan 6,1 Hz, H-6'); 7,58 (d, *J*=2,2 Hz, H-2') (Mahmiah, 2003).



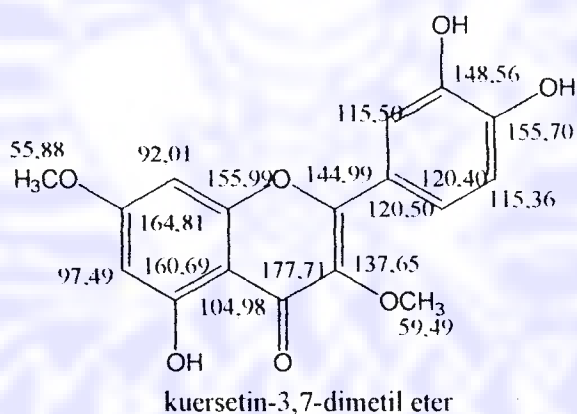
2.6.4 Spektroskopi resonansi magnet inti karbon

Spektroskopi resonansi magnet inti karbon berguna untuk menentukan jumlah atom karbon dari suatu molekul dan sifat atom karbon. Daerah pergeseran kimia untuk ¹³C-NMR terletak pada 0-200 ppm. Pelarut yang digunakan untuk pengukuran sama dengan ¹H-NMR (Hostettman, 1995).



Sinyal karbon senyawa flavonoid terdiri dari karbon kuartener, tersier, sekunder, dan primer. Atom C kuartener merupakan atom C dari gugus karbonil atau atom C pada cincin aromatis yang mengikat substituen atau gugus fungsi, atom C tersier berupa CH (metin) pada cincin aromatis yang tidak mempunyai substituen atau gugus fungsi. Atom C sekunder CH_2 (metin) terdapat pada senyawa flavonoid jenis flavanon, sedangkan C primer CH_3 terdapat pada cincin aromatis yang mempunyai substituen metoksi (OCH_3).

Hasil spektrum ^{13}C -NMR senyawa kuersetin-3,7-dimetil eter dalam aseton- d_6 memberikan sinyal pada pergeseran (ppm): 55,88 (7-OMe); 59,49 (3-OMe); 120,40 (C-6'); 115,36 (C-5'); 155,70 (C-4'); 148,56 (C-3'); 115,50 (C-2'); 120,50 (C-1'); 104,98 (C-10); 155,99 (C-9); 92,01 (C-8); 164,81 (C-7); 97,49 (C-6); 160,69 (C-5); 177,71 (C-4); 137,65 (C-3); 144,99 (C-2) (Mahmiah, 2003).

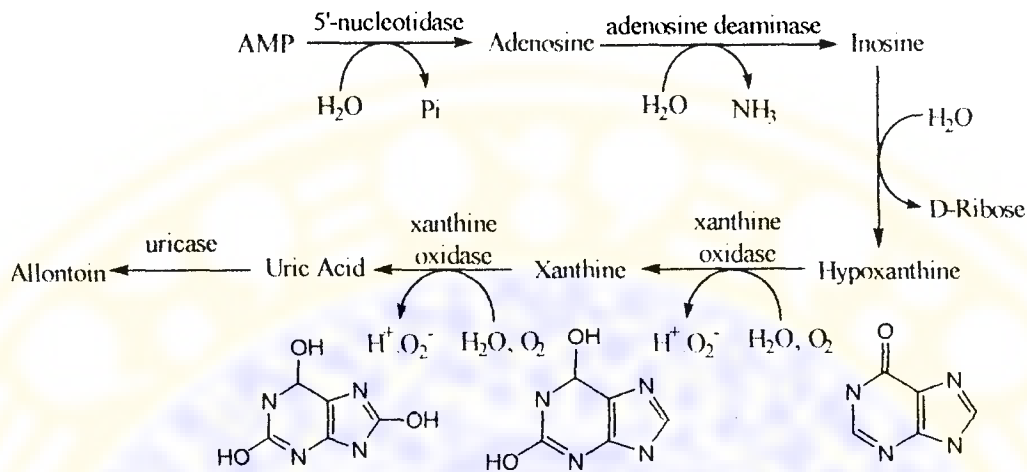


2.7. Metabolisme Asam Urat

Menurut Windholz (1976), asam urat dinyatakan sebagai suatu senyawa alkaloida turunan purin (*xanthine*). Senyawa yang pertama kali ditemukan oleh

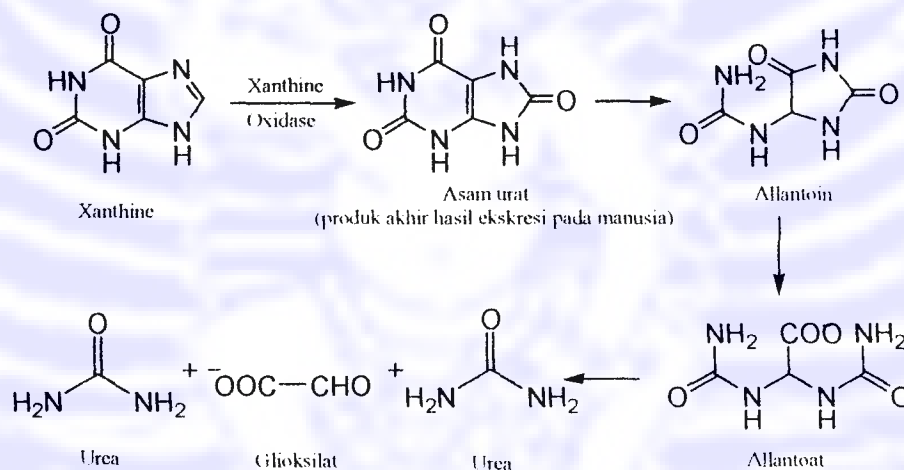
Scheele pada tahun 1776 ini merupakan produk akhir dari metabolisme nitrogen pada burung, beberapa reptil, dan serangga. Senyawa ini dapat ditemukan pada hasil ekskresi kedua jenis hewan tersebut dan pada urine hewan pemakan daging.

Asam urat berasal dari pemecahan nukleoprotein sel dalam tubuh dan nukleoprotein makanan. Nukleoprotein melalui sistem mekanisme biologis diubah menjadi basa purin dan pirimidin. Nukleoprotein akan dipecah menjadi 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 nukleotida. Enzim *fosforilase* memecah nukleotida menjadi basa purin dan basa pirimidin. Basa purin melalui siklus Krebs diubah menjadi asam urat melalui reaksi deaminasi, hidrolisis dan oksidasi. Nukleotida purin oleh enzim *5'-nukleotidase* menghasilkan adenosine yang selanjutnya oleh enzim *adenosine deaminase* menghasilkan inosine. Inosine selanjutnya dihidrolisis menghasilkan *hypoxanthine* yang selanjutnya oleh enzim *xanthine oxidase* dioksidasi menjadi *xanthine*. *Xanthine* dioksidasi oleh *xanthine oxidase* menjadi asam urat (Grossman, 1967). Pada umumnya hewan mammalia 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 (Campbell, 1995). Metabolisme pembentukan asam urat dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6. Metabolisme Nukleotida Purin

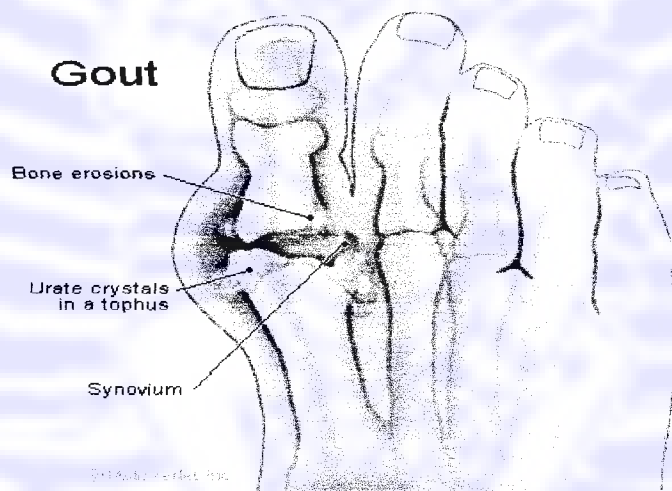
(sumber : Grossman, 1967).

Gambar 2.7. Degradasi *xanthine* menjadi urea yang dapat larut dalam air.

(sumber : Campbell, 1995).

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 protein tinggi seperti kacang-kacangan, emping, daging (terutama jeroan seperti hati, usus, otak dan ginjal), coklat, ikan dan sebagainya. Minuman

seperti teh, kopi dan cola juga dapat menyebabkan peningkatan asam urat karena mengandung alkaloid turunan purin (*xanthine*). Makanan dan minuman ini apabila dikonsumsi secara berlebihan maka akan mengganggu proses metabolisme sehingga menyebabkan kadar asam urat dalam darah dapat mengalami kejenuhan, akibatnya terjadi pengendapan asam urat dalam bentuk kristal di dalam cairan sendi dan jaringan disekitarnya sehingga menimbulkan penyakit *gout* (Grossman, 1967). Jenis *gout* yang sangat berat menyebabkan penderita tidak dapat berjalan, tidur dapat terganggu, dan menimbulkan rasa sakit yang sangat hebat (Utami, 2004).



Gambar 2.8. Bengkak pada persendian yang disebabkan oleh adanya kristal asam urat.

Obat-obatan yang beredar di pasaran yang dapat menurunkan kadar asam urat antara lain *allopurinol*, *probenecid*, *sulfinpyrazon*, *benzbromaron*, dan *febuxostat*. Di samping itu, dapat juga digunakan herbal tanaman (Cos,1998).

2.8. Hubungan Struktur Flavonoid-Aktivitas Inhibitor *Xanthine Oxidase*

Penelitian yang dilakukan Cos (1998) terhadap senyawa-senyawa flavonoid seperti kuersetin, kaempferol, rutin, katekin, epikatekin, epigallocatekin, kuersetin, rutin, luteolin dan sebagainya menunjukkan aktivitas antioksidan yakni sebagai inhibitor *xanthine oxidase*. Senyawa flavonoid tersebut ditemukan pada beberapa spesies dari Annonaceae (Hakim, 2001). Hubungan antara struktur-aktivitas senyawa flavonoid sebagai inhibitor *xanthine oxidase*, memperlihatkan bahwa senyawa flavonoid yang mempunyai gugus fungsi hidroksi pada posisi C-5 dan C-7 serta adanya ikatan rangkap pada posisi C-2 dan C-3 merupakan gugus fungsi yang esensial memperlihatkan aktivitas yang tinggi sebagai inhibitor *xanthine oxidase*. Aktivitas senyawa semakin tinggi jika semakin banyak gugus hidroksi yang terikat pada inti aromatis senyawa flavonoid. Pada prinsipnya gugus hidroksi yang terikat pada cincin aromatis dapat melakukan delokalisasi elektron sehingga bersifat sebagai antioksidan. Oleh karena itu, semakin banyak gugus hidroksi 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 gugus gula. Senyawa flavonoid dalam bentuk glikosida pada penelitian *in vivo* tidak menjadi masalah karena pada usus halus terdapat enzim β -glikosidase yang mampu menghidrolisis glikosida menjadi gugus hidroksi.

Nilai IC_{50} dari beberapa senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* dapat dilihat pada tabel 2.3 (Cos, 1998).

Tabel 2.3. Nilai IC_{50} senyawa flavonoid sebagai inhibitor *xanthine oxidase*

Compound	<i>Xanthine oxidase</i> IC_{50} (μ M) \pm SD
Katekin	>100
Epikatekin	>100
Epigallokatekin	>100
Luteolin	0,05 \pm 0,04
Kaempferol	1,06 \pm 0,03
Kuersetin	4,33 \pm 0,19
Rutin,	52,2 \pm 0,6
Kuersetrin	>100
Allopurinol	0,24 \pm 0,01

(sumber : Cos, 1998)

Menurut Cos (1998), senyawa flavonoid yang mempunyai $IC_{50} > 100 \mu$ M mempunyai daya hambat yang rendah terhadap aktivitas *xanthine oxidase*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Airlangga, Surabaya pada bulan Januari-Juni 2005.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn. Bahan tumbuhan ini diperoleh dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan Jawa Timur. Identifikasi nama ilmiah tumbuhan dilakukan di Herbarium Bogoriensis, Bogor.

3.2.2 Bahan uji

Bahan uji dalam penelitian ini adalah kemampuan daya hambat senyawa flavonoid hasil isolasi sebagai inhibitor *xanthine oxidase*. *Xanthine oxidase* merupakan enzim yang dapat mengoksidasi senyawa *xanthine* menjadi asam urat. Senyawa *xanthine* dan *xanthine oxidase* diperoleh dari Sigma.

3.2.3 Bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan adalah metanol, n-heksana, kloroform, etil asetat, aseton, diklorometana, magnesium sulfat anhidrat, asam sitrat 5 %, akuades, natrium asetat, aluminium klorida 5 %, asam klorida, silika gel G₆₀ 7733

dan 7734, pereaksi cerium sulfat, pereaksi 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazil (DPPH), kertas saring Whatman No 40, *xanthine*, *xanthine oxidase*, 0,05 M buffer natrium fosfat, pH 7,5.

Pelarut yang digunakan untuk keperluan maserasi dan ekstraksi menggunakan bahan yang berkualitas teknis dan telah didestilasi sedangkan untuk keperluan analisis dan pemurnian digunakan bahan yang berkualitas pro analisis (p.a).

3.2.4 Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah mesin giling, bejana maserasi, corong Buchner, seperangkat alat destilasi, alat kromatografi kolom, *rotary vacuum evaporator*, bejana kromatografi lapis tipis, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium Kimia Organik.

Sifat fisika dan fisikokimia menggunakan lampu UV, *Fisher Johns melting point apparatus*, Spektrofotometer UV-Vis Beckman DU 7500, FTIR Shimadzu 5300, resonansi magnetik inti Bruker yang bekerja pada 400 MHz.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Penyediaan bahan penelitian

Bahan tumbuhan yang berupa kulit batang tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn dibersihkan dari kotorannya, kemudian dikeringkan di udara terbuka setelah itu dipotong-potong dan digiling hingga berbentuk serbuk.

3.3.2 Ekstraksi

Bahan tumbuhan (4 kg) yang berupa kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn direndam menggunakan pelarut aseton dengan cara maserasi sebanyak dua kali pada suhu kamar selama 5 hari kemudian dipisahkan antara filtrat dan residunya.

Ekstrak aseton hasil ekstraksi dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* kemudian ditambah dengan metanol-air 10 % dan diekstraksi dengan n-heksana tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Ekstrak metanol selanjutnya ditambah asam sitrat 5 % (pH 3-4) untuk mengubah senyawa alkaloid menjadi garamnya sehingga dapat larut dalam fasa asam dan tidak larut dalam fasa organik. Langkah selanjutnya adalah ekstraksi menggunakan etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa-senyawa semi polar. Ekstrak etil asetat yang diperoleh, dicuci dengan akuades sampai pH netral untuk menghilangkan sisa asam yang ikut dalam ekstrak etil asetat, sedangkan untuk menghilangkan sisa akuades digunakan zat pengering magnesium sulfat anhidrat dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak etil asetat disaring dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 12,483 gram.

3.3.3 Isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid

Jumlah komponen senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etil asetat ditentukan dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen diklorometana:etil asetat (9,75:0,25) dan kloroform:metanol (9:1). Komposisi eluen ini menghasilkan pemisahan terbaik sehingga kemudian digunakan sebagai dasar pada pemisahan

selanjutnya. Pemisahan komponen senyawa kimia dalam ekstrak etil asetat (12,483 gram) dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom gravitasi. Ekstrak kental etil asetat dilarutkan dengan pelarut etil asetat, diserapkan pada silika gel G₆₀ 7733, kemudian dimasukkan ke dalam kolom berdiameter 5 cm yang berisi silika gel G₆₀ 7734. Elusi dilakukan dengan menggunakan eluen diklorometana:etil asetat (9,75:0,25) kemudian dilanjutkan dengan kloroform:metanol (9:1) hingga menghasilkan 7 fraksi yaitu A (1-4), B (5-11), C (12-15), D (16-18), E (19-24), F (25-28), dan G (29-38). Fraksi-fraksi tersebut diuji dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan dideteksi dengan menggunakan lampu UV dan pereaksi cerium sulfat. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan senyawa flavonoid yang telah berhasil diisolasi pada penelitian sebelumnya. Noda senyawa yang akan diisolasi merupakan noda yang tidak sama dengan noda senyawa yang telah diisolasi. Noda senyawa pada fraksi D dan G dijadikan target untuk diisolasi, dimana kedua fraksi tersebut memberikan hasil positif pada uji antiradikal bebas (antioksidan) yang ditandai dengan warna kuning pada plat KLT setelah disemprot dengan pereaksi DPPH (*TLC autografi*).

Fraksi D yang mengandung senyawa kuersetin-3,7,4'-trimetil eter dan senyawa flavonoid lainnya (1,464 gram) dipisahkan dengan teknik kromatografi kolom cepat (KKC) sebanyak empat kali menggunakan eluen masing-masing yaitu campuran n-heksana:aseton (9:1), kloroform:metanol (9,75:0,25), n-heksana:aseton (8:2), dan kloroform:metanol (9,9:0,1) menghasilkan senyawa flavonoid D-1. Senyawa flavonoid D-1 yang diuji dengan berbagai macam eluen berbeda tetap menunjukkan satu noda kemudian dimurnikan melalui proses

rekristalisasi menggunakan pelarut campuran n-heksana-aseton atau n-heksana-kloroform sehingga diperoleh senyawa flavonoid D-1 sebanyak 33 mg yang cukup untuk analisis spektroskopi dan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase*.

Fraksi G sebanyak 1,399 gram dipisahkan dengan kromatografi kolom cepat (KKC) sebanyak 5 kali dengan eluen sebagai berikut : campuran kloroform:metanol (9,5:0,5); (9,25:0,75); dan (9:1). Hasil kromatografi kolom cepat menghasilkan senyawa flavonoid G-1 yang selanjutnya dimurnikan melalui proses rekristalisasi menggunakan pelarut campuran n-heksana-aseton menghasilkan senyawa flavonoid G-1 sebanyak 9 mg.

Skema kerja pemisahan dan pemurnian senyawa flavonoid D-1 dan G-1 dapat dilihat pada gambar 3.2.

3.3.4 Uji sifat fisika senyawa flavonoid

Senyawa hasil isolasi diuji kemurniannya secara fisika dengan menentukan titik lelehnya menggunakan *melting points Fisher Johns apparatus* dengan mengukur suhunya pada saat senyawa mulai meleleh sampai meleleh secara keseluruhan.

3.3.5 Analisis spektroskopi senyawa flavonoid

3.3.5.1 Spektroskopi UV-Vis

Senyawa hasil isolasi sebanyak 0,1 mg dilarutkan dalam metanol sampai volumenya 10 mL, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) dengan spektrofotometer ultraviolet. Efek batokromik yang merupakan pergeseran khas dari flavonoid, diamati dengan penambahan larutan aluminium klorida 5 %, asam klorida, dan natrium asetat (Markham, 1988).

3.3.5.2 Spektroskopi inframerah

Senyawa hasil isolasi sebanyak 1 mg dicampur dengan 10-100 mg kalium bromide (KBr) dan dibuat pelet KBr dengan menggunakan cetakan kemudian diukur serapannya pada bilangan gelombang $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (Harborne, 1987).

3.3.5.3 Spektroskopi resonansi magnet inti proton

Senyawa hasil isolasi sebanyak 5 mg dilarutkan dalam pelarut piridin- d_5 dan aseton- d_6 , selanjutnya ditentukan jumlah dan lingkungan proton pada pergeseran 0-14 ppm (Markham, 1988).

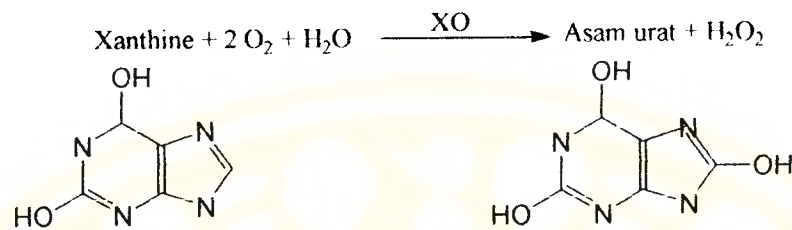
3.3.5.4 Spektroskopi resonansi magnet inti karbon

Senyawa hasil isolasi sebanyak 10-50 mg dilarutkan dalam pelarut piridin- d_5 dan aseton- d_6 , selanjutnya ditentukan jumlah dan lingkungan karbon pada pergeseran 0-200 ppm (Markham, 1988).

3.4 Uji Aktivitas Inhibitor *Xanthine Oxidase*

Prinsip penentuan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase*, dimana suatu senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi enzim *xanthine oxidase* terhadap substrat *xanthine* untuk menghasilkan asam urat.

Enzim *xanthine oxidase* merupakan kompleks enzim yang mengandung flavin, molybdenum serta kofaktor besi dan sulfur. Reaksi oksidasi dari *xanthine oxidase* (XO) terhadap *xanthine* untuk menghasilkan asam urat ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Reaksi oksidasi *xanthine oxidase* (XO) terhadap *xanthine* untuk menghasilkan asam urat.

Penentuan aktivitas senyawa flavonoid hasil isolasi sebagai inhibitor *xanthine oxidase* terhadap pembentukan asam urat ditentukan dengan metode spektrometri ultraviolet dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang λ_{290} nm pada suhu 37°C (Cos, 1998).

Prosentase konsentrasi daya hambat senyawa flavonoid hasil isolasi terhadap *xanthine oxidase* ditentukan berdasarkan perbandingan antara absorbansi asam urat setelah penambahan senyawa aktif flavonoid (bahan uji) dalam berbagai konsentrasi dengan absorbansi asam urat pada panjang gelombang λ_{290} nm pada suhu 37°C .

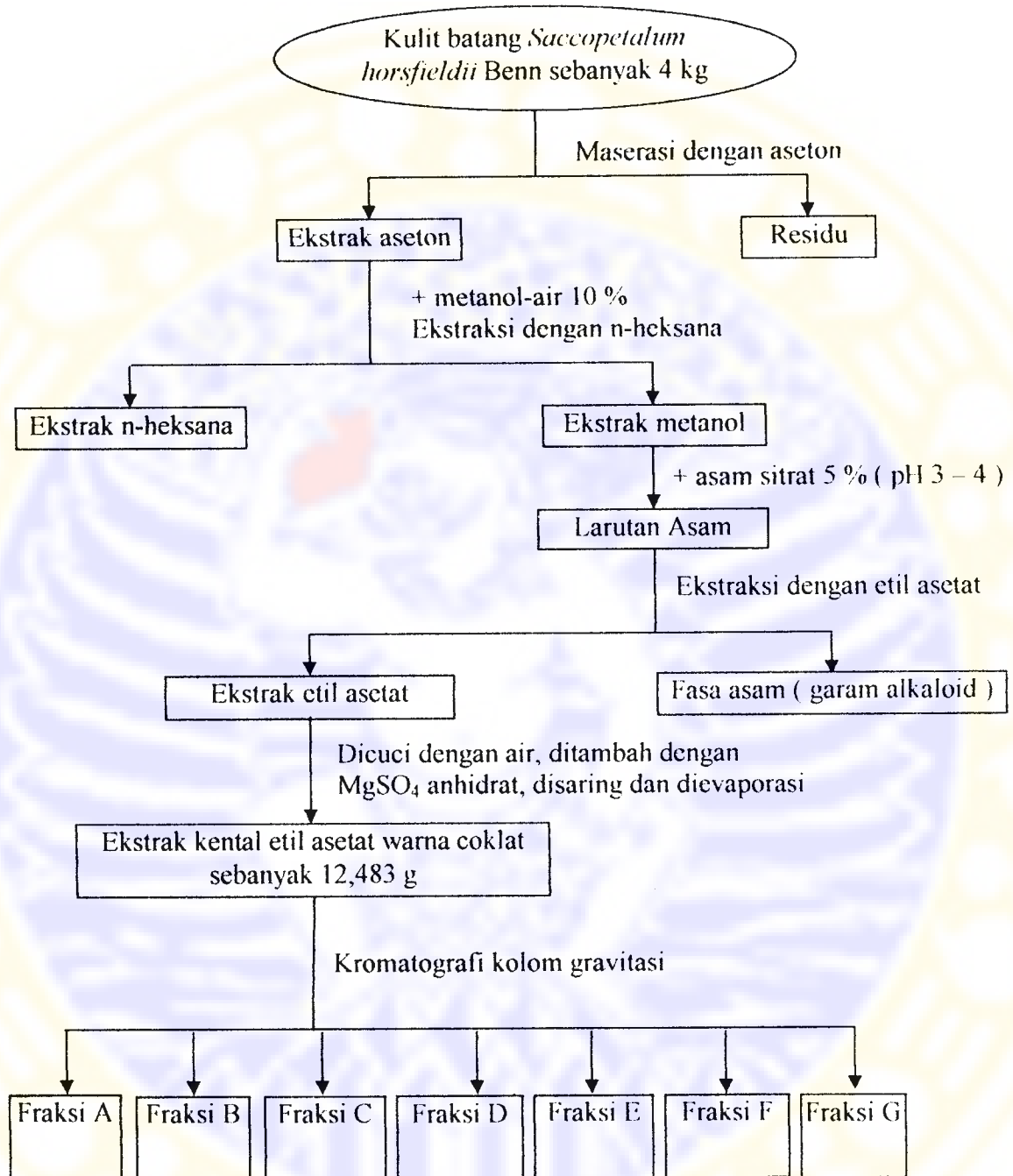
$$\% \text{ inhibitor } xanthine \text{ oxidase} = \frac{\text{absorbansi asam urat} + \text{senyawa aktif}}{\text{absorbansi asam urat tanpa senyawa aktif}} \times 100 \%$$

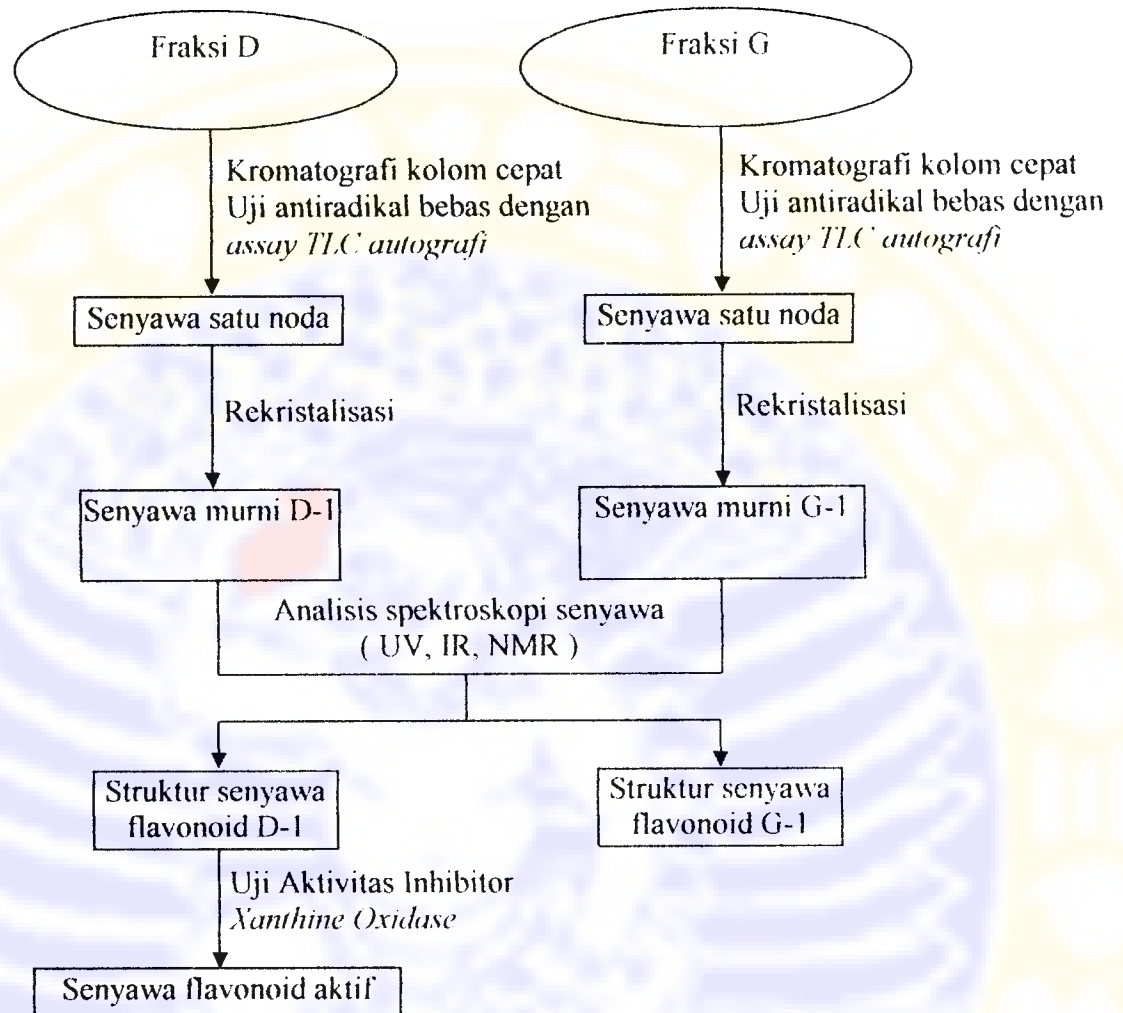
Dari % inhibitor *xanthine oxidase* dalam berbagai konsentrasi senyawa aktif flavonoid maka akan diperoleh daya hambat IC_{50} senyawa flavonoid hasil isolasi berdasarkan analisis data statistik regresi linier antara % inhibitor *xanthine oxidase* vs konsentrasi. Variasi konsentrasi senyawa flavonoid untuk uji aktivitas ditentukan pada konsentrasi 1; 0,5; 0,25; 0,125; dan 0,0625 μM .

Pengukuran absorbansi asam urat dilakukan dengan cara mereaksikan 2,9 ml *xanthine* 100 μM dengan 0,1 mL *xanthine oxidase* 0,06 U/mL yang kemudian ditambah 1 mL larutan buffer natrium fosfat 0,05 M pH 7,5 sebagai larutan

perbandingan. Pengukuran absorbansi daya hambat senyawa aktif ditentukan dengan penambahan 1 mL senyawa aktif dalam 2,9 mL *xanthine* 100 μ M dengan 0,1 mL *xanthine oxidase* 0,06 U/mL dengan variasi konsentrasi senyawa aktif seperti di atas. Larutan buffer natrium fosfat 0,05 M pH 7,5 digunakan sebagai larutan blanko dalam pengukuran.

Larutan *xanthine* 100 μ M dibuat dengan cara melarutkan 0,9 mg *xanthine* dalam 50 mL larutan buffer natrium fosfat 0,05 M pH 7,5. Larutan senyawa aktif dibuat dengan cara melarutkan senyawa aktif dengan larutan buffer natrium fosfat 0,05 M pH 7,5 jika kurang larut ditambahkan sedikit larutan NaOH 0,05 M (Cos, 1998).





Gambar 3.2. Skema Kerja Isolasi Flavonoid dan Uji aktivitas sebagai Inhibitor *Xanthine Oxidase* dari Kulit Batang Tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Flavonoid

4.1.1 Hasil ekstraksi senyawa flavonoid

Serbuk kulit batang tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn sebanyak 4 kg dimaserasi menggunakan pelarut aseton sebanyak dua kali pada suhu kamar selama 5 hari. Penggunaan pelarut aseton bertujuan untuk mengekstraksi senyawa flavonoid dan senyawa fenolik lainnya, disamping itu juga dapat mengurangi resin-resin yang larut dalam pelarut organik. Ekstrak aseton yang diperoleh disaring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak aseton. Ke dalam ekstrak aseton ditambahkan metanol—air 10 % dan selanjutnya diekstraksi dengan n-heksana sebanyak tiga kali untuk menghilangkan lemak dan senyawa non polar lainnya. Ekstrak metanol—air selanjutnya ditambahkan asam sitrat 5 % (pH 3-4) untuk mengubah senyawa alkaloid menjadi garamnya yang tidak larut dalam fasa organik. Ekstraksi dilanjutkan dengan etil asetat sebanyak tiga kali untuk mendapatkan senyawa flavonoid dan senyawa fenolik lainnya. Ekstrak etil asetat yang diperoleh, dicuci dengan akuades sampai pH netral untuk menghilangkan sisa asam yang ikut dalam ekstrak etil asetat. Ekstrak etil asetat kemudian ditambah zat pengering magnesium sulfat anhidrat dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak etil asetat disaring dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat berwarna coklat sebanyak 12,483 gram.

4.1.2 Hasil isolasi dan pemurnian senyawa flavonoid

Ekstrak etil asetat sebanyak 12,483 gram dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen campuran diklorometana:etil asetat yang kepolarannya dinaikkan secara gradien. Ekstrak etil asetat terlebih dahulu diserapkan pada silika gel G₆₀ 7733 sebelum dimasukkan ke dalam kolom gravitasi berdiameter 5 cm yang telah berisi silika gel G₆₀ 7734. Kemudian elusi dilakukan dengan menggunakan eluen campuran kloroform:metanol (9:1) hingga menghasilkan 7 fraksi yaitu A (1-4), B (5-11), C (12-15), D (16-18), E (19-24), F (25-28), dan G (29-38) (lampiran 2). Fraksi D dan G menunjukkan aktivitas antiradikal bebas (antioksidan) yang ditandai dengan warna kuning setelah disemprot dengan pereaksi DPPH (*TLC autografi*) sehingga senyawa-senyawa pada fraksi-fraksi inilah yang dijadikan target untuk diisolasi. Dipilihnya eluen campuran diklorometana:etil asetat karena diketahui eluen ini menunjukkan pemisahan terbaik oleh karena itu eluen tersebut digunakan sebagai acuan dalam proses pemisahan pada penelitian ini (Mahmiah, 2003). Hasil kromatografi kolom gravitasi diuji dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan lampu UV dan pereaksi cerium sulfat sebagai penampak noda. Hasil analisis fraksi yang diperoleh dibandingkan dengan senyawa flavonoid yang telah berhasil diisolasi pada penelitian-penelitian sebelumnya agar senyawa flavonoid yang akan dijadikan target isolasi tidak sama dengan senyawa flavonoid yang telah diisolasi. Noda senyawa dari fraksi tersebut tidak sama dengan noda senyawa yang telah diisolasi sebelumnya.

Pemisahan fraksi D sebanyak 1,464 gram yang mengandung senyawa kuersetin-3,7,4'-trimetil eter dan senyawa flavonoid lainnya dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi kolom cepat sebanyak 4 kali dengan eluen masing-masing yaitu campuran

n-heksana:aseton (9:1), kloroform:metanol (9,75:0,25), n-heksana:aseton (8:2), dan kloroform:metanol (9,9:0,1) menghasilkan senyawa flavonoid D-1 yang selanjutnya direkristalisasi menggunakan pelarut campuran n-heksana-aseton atau n-heksana-kloroform. Dari hasil rekristalisasi ini didapatkan senyawa flavonoid D-1 berbentuk padatan berwarna kuning sebanyak 33 mg dengan titik leleh 241–243 °C yang menghasilkan warna kuning pada plat KLT (*TLC autografi*) ketika disemprot dengan pereaksi DPPH. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa D-1 mempunyai aktivitas antiradikal bebas (antioksidan).

Kemurnian senyawa hasil isolasi diuji menggunakan KLT dengan tiga macam eluen berbeda. Hasil KLT dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Uji kemurnian senyawa flavonoid D-1

No.	Eluen	Jumlah noda	Harga Rf
1.	n-heksana:aseton (8:2)	1	0,25
2.	kloroform:metanol (9,9:0,1)	1	0,35
3.	kloroform 100 %	1	0,11

Dari hasil KLT tersebut menunjukkan bahwa senyawa flavonoid D-1 yang telah diperoleh merupakan senyawa tunggal dan mempunyai kemurnian tinggi.

Pemisahan fraksi G sebanyak 1,399 gram yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa flavonoid lain dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi kolom cepat sebanyak 5 kali dengan eluen masing-masing campuran kloroform:metanol (9,5:0,5); (9,25:0,75) dan (9:1), menghasilkan senyawa flavonoid G-1 yang kemudian direkristalisasi menggunakan pelarut campuran n-heksana-aseton. Dari hasil rekristalisasi ini didapatkan senyawa flavonoid G-1 berbentuk padatan berwarna kuning kecoklatan sebanyak 9 mg yang menghasilkan warna kuning pada plat TLC setelah disemprot

dengan pereaksi DPPH (TLC autografi). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid G-1 mempunyai aktivitas antiradikal bebas (antioksidan) yang sama dengan senyawa flavonoid D-1.

Kemurnian senyawa hasil isolasi diuji menggunakan KLT dengan tiga macam eluen berbeda. Hasil KLT dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.2. Uji kemurnian senyawa flavonoid G-1

No.	Eluen	Jumlah noda	Harga Rf
1.	kloroform:aseton (1:1)	1	0,28
2.	kloroform:metanol (8,5:1,5)	1	0,21
3.	Etil asetat:metanol (9,5:0,5)	1	0,51

Dari hasil KLT tersebut menunjukkan bahwa senyawa flavonoid G-1 yang telah diperoleh merupakan senyawa tunggal dan mempunyai kemurnian tinggi.

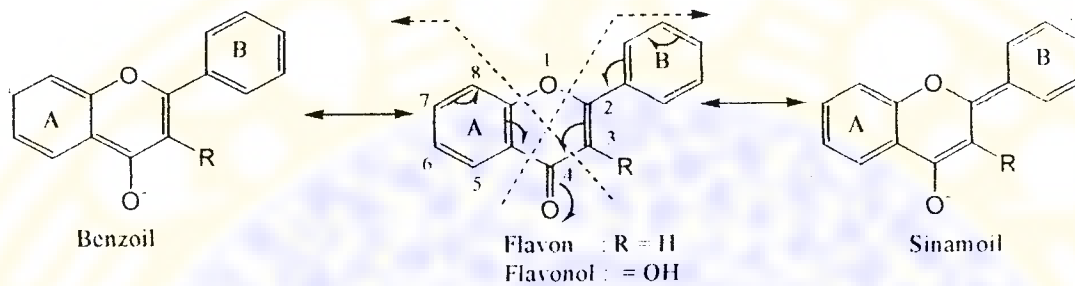
4.2 Analisis Spektroskopi Senyawa Flavonoid

4.2.1 Analisis spektroskopi senyawa flavonoid D-1

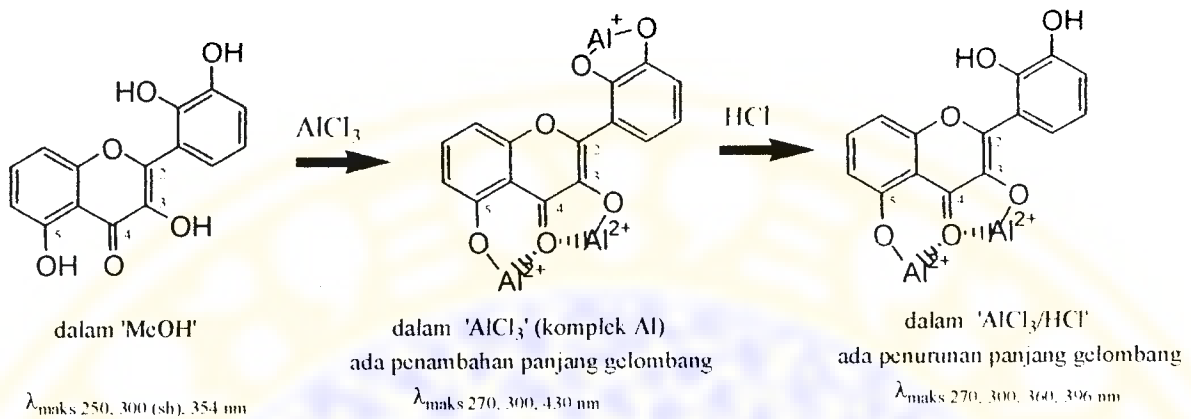
Senyawa flavonoid D-1 berbentuk padatan berwarna kuning sebanyak 33 mg dengan titik leleh 241 – 243 °C (terurai).

Hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis senyawa flavonoid D-1 menggunakan pelarut metanol menunjukkan ciri khas senyawa flavonoid dari golongan flavon dan flavonol yaitu munculnya dua puncak dengan λ_{maks} 264 nm dan 346 nm. Puncak serapan pada λ_{maks} 264 nm (pita II) merupakan puncak serapan dari gugus benzoil sedangkan pada λ_{maks} 346 nm (pita I) puncak serapan dari gugus sinamoil. Kedua pita serapan ini masing-masing berhubungan dengan resonansi gugus sinamoil yang

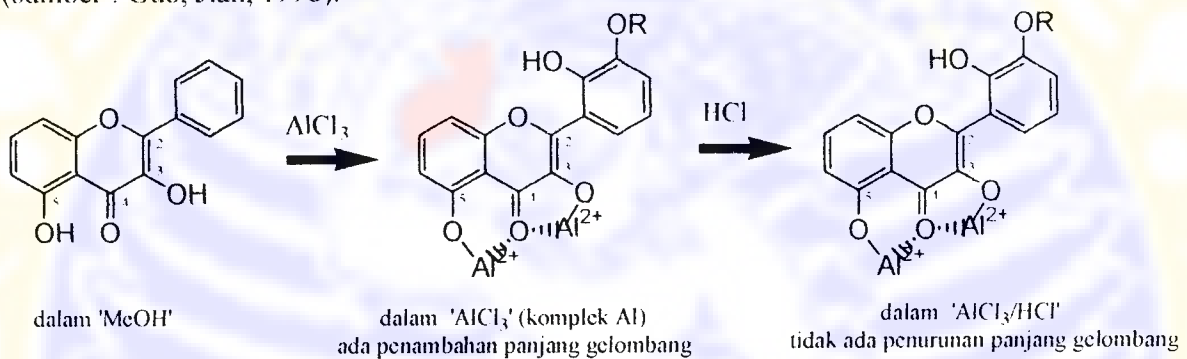
melibatkan cincin B (pita I) dan gugus benzoil yang melibatkan cincin A (pita II) dari senyawa flavonoid (Achmad, 1986).



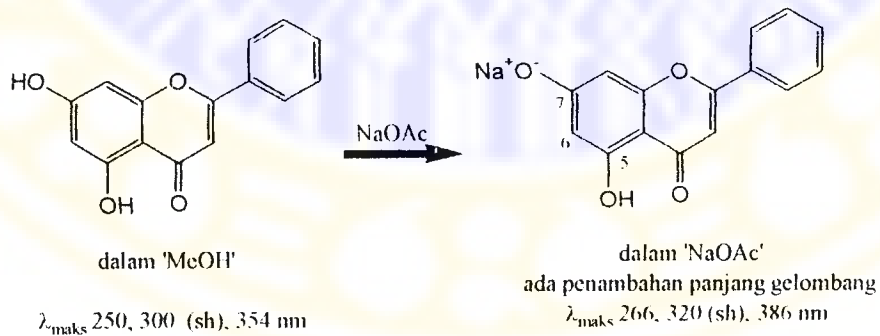
Efek batokromik ditunjukkan dengan penambahan pereaksi geser AlCl_3 yang menyebabkan pergeseran panjang gelombang pada λ_{maks} (nm): 274, 302 (sh), 348, dan 393 (sh). Hal ini menunjukkan adanya gugus karbonil $\text{C}=\text{O}$ pada atom C-4 dan gugus hidroksi OH pada atom C-5, serta adanya gugus dihidroksi pada posisi orto yang membentuk kompleks dengan logam Al. Pergeseran panjang gelombang ke arah yang lebih besar terjadi karena pembentukan kompleks antara logam Al dengan gugus hidroksi OH dan karbonil $\text{C}=\text{O}$ yang stabil. Pembentukan kompleks menyebabkan ikatan antara C-O baik pada C-OH maupun $\text{C}=\text{O}$ menjadi lebih memanjang sehingga bersifat lebih lemah, dengan demikian dibutuhkan energi yang lebih kecil untuk terjadinya transisi elektron menghasilkan panjang gelombang yang lebih besar. Kepastian adanya gugus dihidroksi pada posisi orto dapat diketahui dengan penambahan AlCl_3/HCl yang menyebabkan adanya pergeseran panjang gelombang ke arah panjang gelombang yang lebih pendek. Serapan maksimum senyawa flavonoid D-I dengan penambahan AlCl_3/HCl terlihat pada λ_{maks} (nm): 275, 302 (sh), 346, dan 393 (sh). Karena tidak ada penurunan pita serapan panjang gelombang yang terjadi, dapat dipastikan bahwa senyawa D-I tidak mempunyai gugus o-dihidroksi pada cincin B.



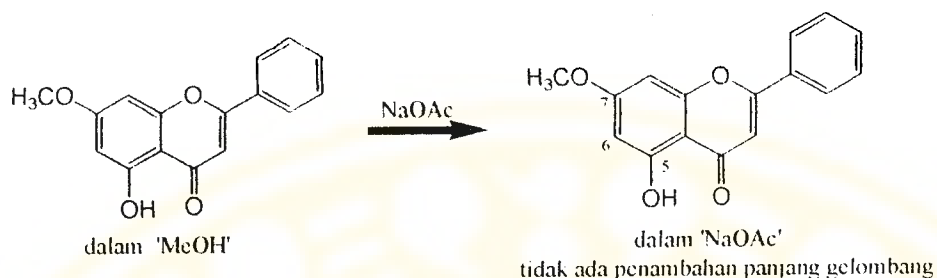
(sumber : Guo, Jian, 1998).



Penambahan pereksi geser senyawa flavonoid D-1 dengan NaOAc memperlihatkan λ_{maks} 267, dan 346 nm. Tidak teramati adanya pergeseran panjang gelombang menunjukkan bahwa pada posisi C-7 dari senyawa flavonoid D-1 tidak terdapat gugus hidroksi OH atau pada C-7 mempunyai gugus metoksi OCH₃ (Markham, 1988).



(sumber : Guo, Jian, 1998).

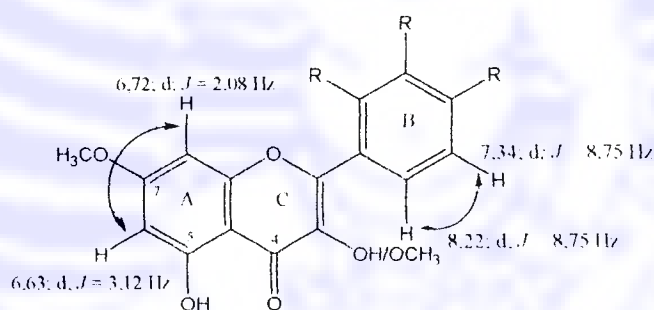


Hasil analisis spektrometer inframerah memperlihatkan adanya gugus hidroksi yang terikat pada senyawa flavonoid D-1 yaitu dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang 3246 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur dari gugus OH. Selain itu, spektrum IR juga memperlihatkan adanya gugus karbonil C=O yang terkonjugasi pada bilangan gelombang 1668 cm^{-1} , C-H aromatis pada bilangan gelombang 2920 cm^{-1} , C=C aromatis pada bilangan gelombang $1601\text{-}1498\text{ cm}^{-1}$, dan C-O-C siklis pada bilangan gelombang 1170 cm^{-1} . Pita serapan 1668 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur dari gugus karbonil C=O terkonjugasi. Adanya C=C aromatis ditunjukkan oleh pita serapan dari vibrasi ulur C=C pada $1601\text{-}1498\text{ cm}^{-1}$. Vibrasi ulur dari C-H aromatis muncul pada bilangan gelombang 2920 cm^{-1} , sedangkan vibrasi ulur dari C-O-C siklis ditunjukkan oleh munculnya pita serapan pada bilangan gelombang 1170 cm^{-1} (Silverstein, 1991).

Analisis spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$) dalam piridin- d_5 memperlihatkan jumlah proton sebanyak 10 buah di luar gugus hidroksil benzena (fenol) dan sinyal proton dari piridin pada δ 7,20; 7,58; 8,70 ppm (Shriner, 1998). Sepuluh buah proton tersebut masing-masing mewakili 4 proton aromatis dan 6 proton dari dua gugus metoksi OCH_3 . Sinyal proton aromatis terlihat pada δ (ppm): 6,63 (1H, d, $J = 3,12\text{ Hz}$); 6,72 (1H, d, $J = 2,08\text{ Hz}$); 7,34 (1H, d, $J = 8,75\text{ Hz}$); 8,22 (1H, d, $J = 8,75\text{ Hz}$) sedangkan sinyal singlet pada δ 3,81 dan 3,97 ppm merupakan ciri khas dari sinyal gugus fungsi metoksi OCH_3 . Sinyal proton aromatis pada δ 6,63 ppm (1H, d, $J = 3,12\text{ Hz}$) dan 6,72

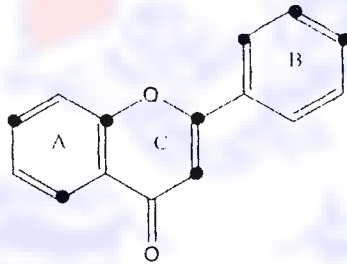
ppm (1H, d, $J = 2,08$ Hz) merupakan ciri khas proton aromatis yang masing-masing saling kopling pada posisi meta yang terdapat pada cincin A. Sedangkan sinyal pada δ 7,34 ppm (1H, d, $J = 8,75$ Hz) dan 8,22 ppm (1H, d, $J = 8,75$ Hz) merupakan ciri khas proton aromatis yang masing-masing saling kopling pada posisi orto. Sinyal proton pada δ 7,34 ppm dan 8,22 ppm ini merupakan sinyal proton aromatik yang terdapat pada cincin B. Berdasarkan analisis spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$) terlihat bahwa senyawa flavonoid D-1 tidak mempunyai proton pada cincin C, dengan kata lain ada substituen hidroksi atau metoksi pada atom C-3.

Data spektrum UV-Vis menunjukkan bahwa pada posisi C-7 tidak terdapat gugus hidroksi OH sehingga bisa disimpulkan bahwa gugus yang terikat adalah gugus metoksi OCH_3 .



Analisis spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ (piridin- d_5) memperlihatkan bahwa senyawa flavonoid D-1 mempunyai 17 atom karbon yaitu pada δ 55,91; 59,87; 92,37; 98,27; 106,18; 116,43; 121,29; 130,86; 138,61; 156,63; 156,98; 161,78; 162,18; 165,71 dan 178,92 ppm. Sinyal karbon dari pelarut piridin sendiri muncul pada δ 123,5; 135,5; dan 149,2 ppm (Shriner, 1998). Sinyal 116,43 dan 130,86 masing-masing mewakili dua atom karbon, hal ini menunjukkan bahwa atom-atom karbon tersebut mempunyai lingkungan kimia yang sama. Sinyal-sinyal karbon pada spektrum ini terdistribusi sebagai berikut:

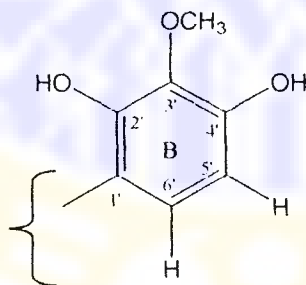
satu sinyal karbon karbonil C=O pada δ 178,92 ppm; dua sinyal karbon metoksi pada δ 55,91 dan 59,87 ppm; 12 sinyal karbon aromatis yang mewakili 14 karbon yang muncul pada δ 92,37; 98,27; 106,18; 116,43 (dua karbon); 121,29; 130,86 (dua karbon); 138,61; 156,63; 156,98; 161,78; 162,18, dan 165,71 ppm. Sinyal-sinyal karbon aromatis tersebut terdistribusi atas 8 sinyal karbon aromatis oksi aril yaitu sinyal-sinyal yang muncul pada δ 130,86 (2C); 138,61; 156,63; 156,98; 161,78; 162,18; 165,71 ppm, sedangkan sisanya adalah atom karbon tersier dan kuartener. Informasi ini mendukung data yang diperoleh pada spektrum $^1\text{H-NMR}$.



Keterangan :

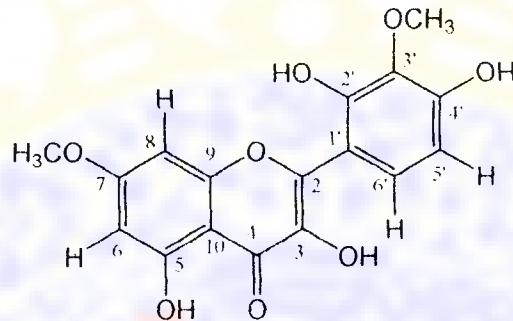
• = C-oksi aril

Untuk menentukan posisi substituen yang tersisa, dilakukan dengan cara sebagai berikut: dari data UV-Vis diketahui bahwa tidak ada gugus o-dihidroksi pada cincin B, sehingga dapat disarankan substituen pada cincin B tersusun sebagai berikut :

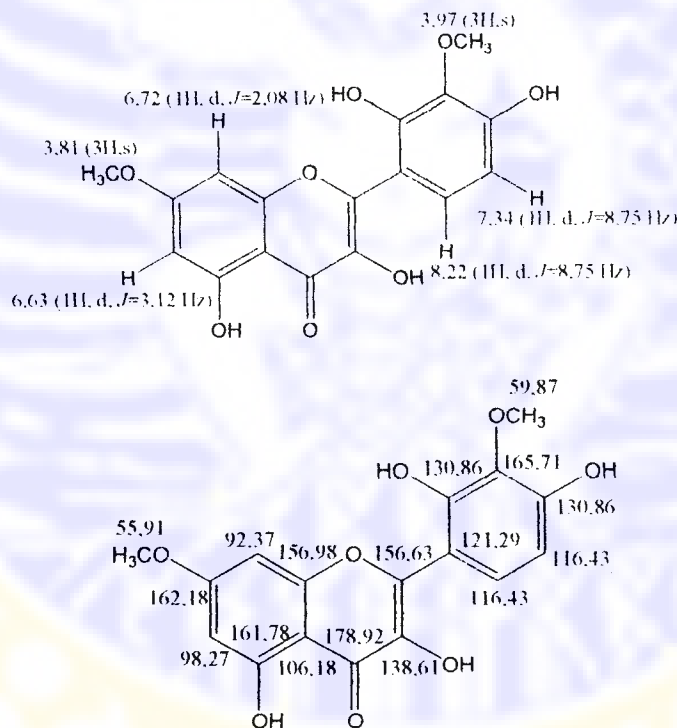


karena data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ hanya menunjukkan adanya dua gugus metoksi OCH_3 , maka dapat disimpulkan bahwa substituen yang terikat pada C-3 dari cincin C

senyawa flavonoid adalah gugus hidroksi OH. Berdasarkan penggabungan data analisis spektroskopi UV-Vis, IR, $^1\text{H-NMR}$, dan $^{13}\text{C-NMR}$ disarankan bahwa senyawa flavonoid D-1 adalah 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dengan struktur sebagai berikut :



Posisi proton dan karbon senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dapat diaktualisasikan sebagai berikut :



Posisi atom karbon senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dapat dituliskan jika dilengkapi resonansi magnet inti dengan percobaan korelasi melalui ikatan

jarak jauh COLOC (*correlation via long range coupling*) atau percobaan HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*) antara korelasi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

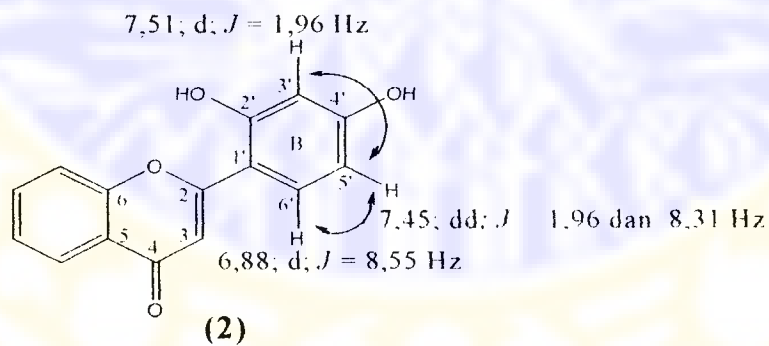
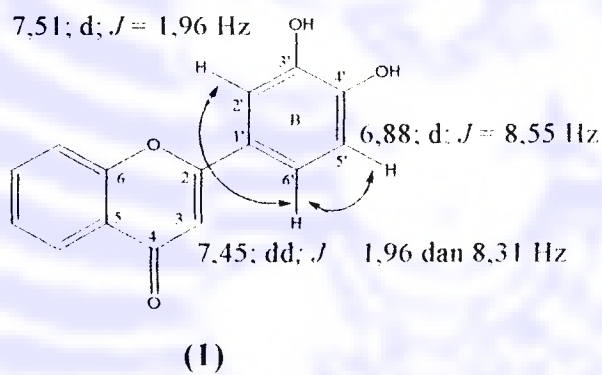
Penemuan senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon pada tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn melengkapi senyawa flavonoid pada penelitian sebelumnya yaitu Chamuvaretin (Fatatik, 2002), 2-(3',4'-dihidroksi-2'-metoksifenil)-5,7-dihidroksi-6-metoksi-kromen-4-on atau 2-(3',4'-dihidroksi-2'-metoksifenil)-5,7-dihidroksi-8-metoksi-kromen-4-on (Wibowo, 2002), Kuersetin-3,7-dimetil eter (Mahmiah, 2003), dan Kuersetin-3,7,4'-trimetil eter (Fatimah, 2004). Berdasarkan struktur senyawa tersebut menunjukkan bahwa tingkat oksidasi senyawa hasil isolasi lebih tinggi dari pada genus lain pada famili Annonaceae.

4.2.2 Analisis spektroskopi senyawa G-1

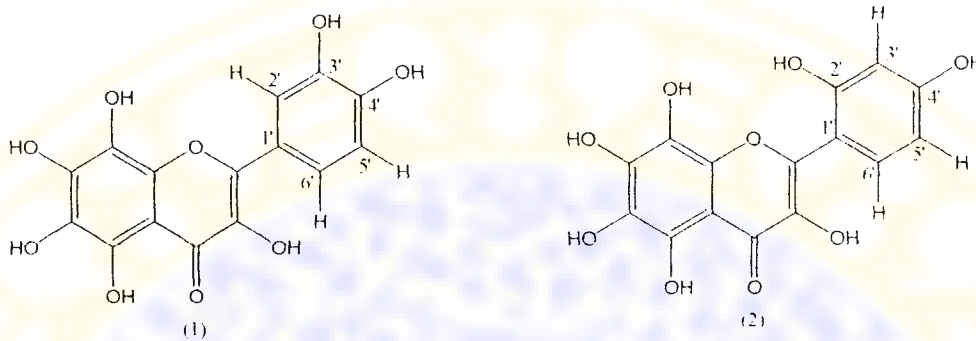
Senyawa G-1 berbentuk padatan berwarna kuning kecoklatan sebanyak 9 mg. Hasil analisis dengan spektrofotometer UV-Vis menggunakan pelarut metanol menunjukkan adanya puncak serapan benzoil (pita II) saja, yaitu pada λ_{maks} 252 nm dan 287 nm(sh). Pita serapan ini berhubungan dengan resonansi yang melibatkan cincin A dari senyawa flavonoid (Achmad, 1986).

Analisis spektroskopi resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$) dalam pelarut aseton- d_6 memperlihatkan adanya tiga sinyal yang mewakili tiga atom proton aromatis. Sinyal proton tersebut terlihat pada δ (ppm): 6,88 (1H, d, $J = 8,55$ Hz); 7,45 (1H, dd, $J = 1,96$ dan $J = 8,31$ Hz), dan 7,51 (1H, dd, $J = 1,96$ Hz), sedangkan sinyal proton dari aseton muncul pada δ 2,05 ppm (Shriner, 1998). Sinyal doublet-doublet pada δ 7,45 ppm menunjukkan adanya perjodohan proton aromatis pada posisi *meta* dan proton aromatis pada posisi *orto*. Dari konstanta kopling tersebut dapat diketahui bahwa proton aromatis

pada δ 6,88 ppm ($J = 8,55$ Hz) bertetangga dengan proton aromatis pada δ 7,45 ppm dan saling melakukan kopling *orto*, sedangkan proton aromatis pada δ 7,51 ppm ($J = 1,96$ Hz) bertetangga dengan proton aromatis pada δ 7,45 ppm saling melakukan kopling *meta*. Perjodohan ketiga proton aromatis tersebut menunjukkan perjodohan proton sistem ABC. Berdasarkan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ terlihat bahwa senyawa flavonoid G-1 tidak mempunyai gugus metoksi OCH_3 . Pola oksigenasi selang-seling dari jalur poliketida/asetat-malonat menyebabkan proton aromatis di cincin A terletak pada posisi *meta*. Jalur shikimat yang membentuk cincin B dan rantai propan menyebabkan posisi proton aromatis di cincin B tidak beraturan, sehingga kemungkinan posisi proton aromatis tersebut adalah sebagai berikut :



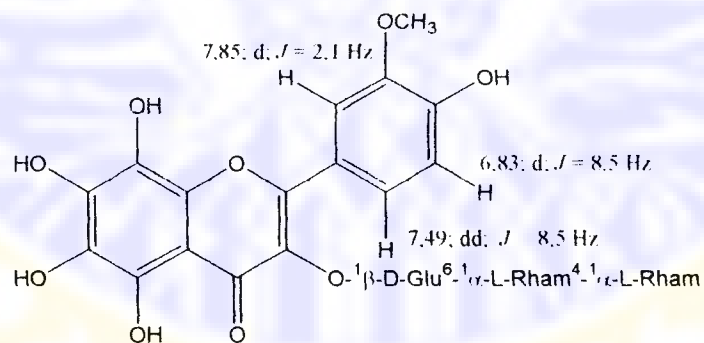
Berdasarkan hasil spektrum UV-Vis dan $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan bahwa pada cincin A dan cincin C tidak terdapat proton aromatis sehingga dapat disarankan bahwa struktur senyawa G-1 adalah :



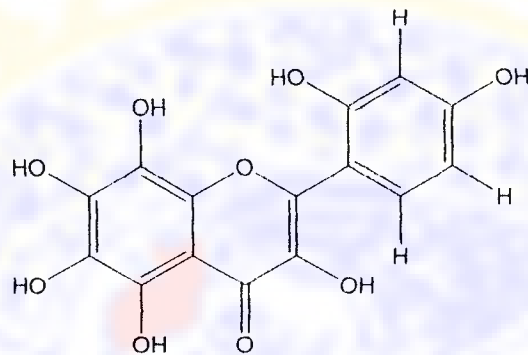
(1) 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavin

(2) 3,5,6,7,8,2',4'-heptahidroksiflavin

Dari dua kemungkinan tersebut, struktur senyawa flavonoid G-1 yang lebih mungkin adalah 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavin. Kesimpulan ini didukung pula dengan membandingkan harga geseran kimia $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa flavonoid G-1 hasil isolasi dengan senyawa flavonoid yang telah diisolasi sebelumnya, yaitu 6,8-dihidroksiisorhamnetin 3-*O* [α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranosida (Beck, 1999).



Dari struktur di atas diketahui bahwa geseran kimia $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa flavonoid G-1 memiliki kemiripan yang signifikan dengan senyawa 6,8-dihidroksiisorhamnetin 3-(α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranosida). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid G-1 hasil isolasi adalah 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon.



3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon

Oleh karena massa senyawa 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon terlalu sedikit, yakni 9 mg maka tidak dapat dilakukan analisis spektroskopi IR, $^{13}\text{C-NMR}$, percobaan COLOC atau HMBC antara korelasi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ untuk memastikan strukturnya, serta tidak dapat dilakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase*.

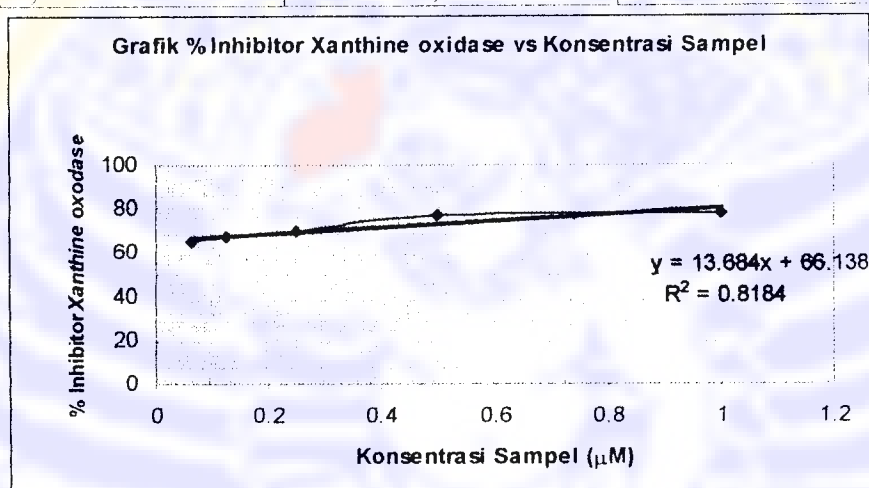
4.3 Hasil Uji Aktivitas Inhibitor *Xanthine Oxidase*

Uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang λ_{290} nm dan suhu 37 °C pada konsentrasi 0,0625 μM , 0,125 μM , 0,25 μM , 0,5 μM dan 1 μM menggunakan metode spektrometri UV-Vis. Pengukuran pada spektrofotometer UV-Vis dilakukan setelah 30 menit penambahan enzim *xanthine oxidase* 0,06 U/mL. Hasil

pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavin ditunjukkan pada tabel 4.3.

Tabel 4.3. Hasil pengukuran dan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* berbagai konsentrasi senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavin.

Konsentrasi (μM)	Nilai absorbansi pada λ_{290} nm	% inhibitor <i>xanthine oxidase</i>
Pembanding	0,208	-
1	0,162	77,9
0,5	0,160	76,9
0,25	0,146	70,2
0,125	0,140	67,3
0,0625	0,135	64,9



Gambar 4.1. Grafik hubungan antara % inhibitor *xanthine oxidase* dan konsentrasi sampel.

Berdasarkan perhitungan % inhibitor *xanthine oxidase* diketahui senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavin mempunyai IC_{50} sebesar $1,18 \mu\text{M}$ ($4,08 \cdot 10^{-4}$ ppm). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavin mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* yang tinggi (Cos, 1998).

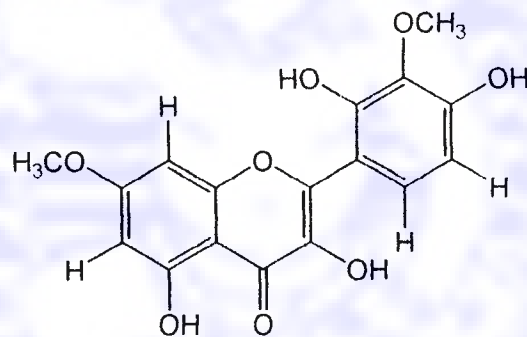
BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

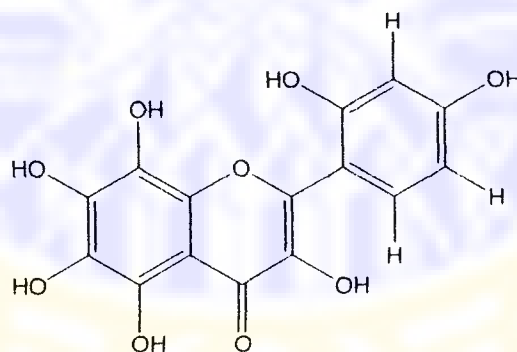
5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap serbuk kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn dapat disimpulkan bahwa:

1. senyawa flavonoid yaitu 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon dan 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon telah berhasil diisolasi dari ekstrak aseton kulit batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.



3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon



3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon

2. senyawa 3, 5, 2', 4'-tetrahidroksi-7, 3'-dimetoksiflavon mempunyai aktivitas sebagai inhibitor *xanthine oxidase* dengan IC_{50} sebesar $1.18 \mu M$ ($4.08.10^{-4}$ ppm).

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, perlu disarankan untuk:

1. melakukan uji aktivitas inhibitor *xanthine oxidase* senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon secara *in vivo*.
2. melakukan percobaan korelasi melalui ikatan jarak jauh COLOC (*correlation via long range coupling*) atau percobaan HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*) antara korelasi 1H -NMR dan ^{13}C -NMR terhadap senyawa 3,5,2',4'-tetrahidroksi-7,3'-dimetoksiflavon agar dapat menuliskan posisi karbonnya.
3. melakukan analisis spektroskopi IR, ^{13}C -NMR, percobaan COLOC atau HMBC antara korelasi 1H -NMR dan ^{13}C -NMR untuk memastikan struktur senyawa 3,5,6,7,8,3',4'-heptahidroksiflavon.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., 1986, *Kimia Organik Bahan Alam*, Penerbit Karunia, Jakarta.
- Akitt, J.W., 1992, *NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, Third Edition, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London.
- Beck, Mona-Antonia, and Häberlein, H., 1999, **A New Flavonol 3-O-Glycoside from *Eschscholtzia californica***, *Planta Medica*, **65**, 296.
- Campbell, M., k., 1995, *Biochemistry*, Second Edition, Saunders College Publishing, united States of america.
- Chopin, J., Hauteville, M., Joshi, B. S., and Gawad. D. H., 1978, *Phytochemistry*, **17**, 332.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V. Pieters, L., Berghe, D.P., 1998, **Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers**, *J. Nat. Prod.* , **61**, 71-76.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., and Potteral, U., 1997, **Flavonoids with Free Radical Scavenging from *Fagrae blumei***, *Helvetica Chimica Acta*, **80**, 1144-1152.
- Desco, Mari-Carmen; Asensi, Miguel; Marquez, Rafael; Martinez-Valls, Jose. 2002, *Xanthine Oxidase Is Involved in Free Radical Production in Type I Diabetes: Protection by Allopurinol*, LiveExtension Foundation.
- Erwin, Hakim, E.H., Achmad, S.A., 2001, **Artoindosianin-B Suatu Senyawa yang Bersifat Sitotoksik Terhadap Sel Tumor P-388 dari Tumbuhan *Artocarpus altilis***, *Buletin of the Indonesian Society of Natural Products Chemistry*, **1**, 20-27.
- Fatatik, R., 2002, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Fenolik dari Kulit Batang Tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Fatimah, N., 2004, **Isolasi dan Uji Biolarvasida Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.

- Gritter, R.J., Bobbitt, J.M., Schwarting, A.E., diterjemahkan Kosasih Padmawinata, 1991, *Pengantar Kromatografi*, terbitan ke-2, Penerbit ITB, Bandung.
- Guo, Jian, Yu, Dong-Lei, Xu, Lizhen, Zhu, Min, and Yang, Shi-Lin. 1998, **Flavonol Glycosides from *Lysimachia congestiflora***, *Phytochemistry*, **48**,1445-1447.
- Grossman, L., and K. Moldave. 1967, *Methods in Enzymology*, Vol XII, Nucleic Acids, Part A, Academic Press, New York, Page 5.
- Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, I., Mujahidin, D., Syah, Y.M., 2001 **Profil Kimia Annonaceae**, *Buletin of the Indonesian Society of Natural Products Chemistry*, **1**, 1-10.
- Harborne, J.B., (diterjemahkan oleh K. Panduwinata dan Iwoeng Soediro), 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, terbitan ke-2, Penerbit ITB, Bandung.
- Hegnauer, R., 1969, *Chemotaxonomie der Pflanzen III*, 116-123.
- Heyne, K., (diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan), 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid III, Edisi ke-2, Penerbit Yayasan Wanajaya, Jakarta.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M., Maston, A., 1995, *Cara kromatografi Preparatif*, Penerbit ITB, Bandung.
- Hufford, C.D. and Lasswel, Jr. W.L., 1978, **Isochamenetin and Uvarinol, Two Novel Cytotoxic C-Benzilflavonones from *Uvaria chamae***, *J. Organic Chemistry*, **41** (7), 1297-1298.
- Ismaryono, D., 2004, **Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas *Insect Antifeedant* Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Mahmiah, 2003, **Isolasi, Identifikasi, dan Uji Antiradikal Bebas Senyawa Flavonoid dari Kulit Batang Tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn**, *Skripsi*, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, Penerbit ITB, Bandung.
- Okorie, D.A., 1977, **New Benzylidihydrochalcones from *Uvaria chamae***, *Phytochemistry*, **16**, 1591-1594.

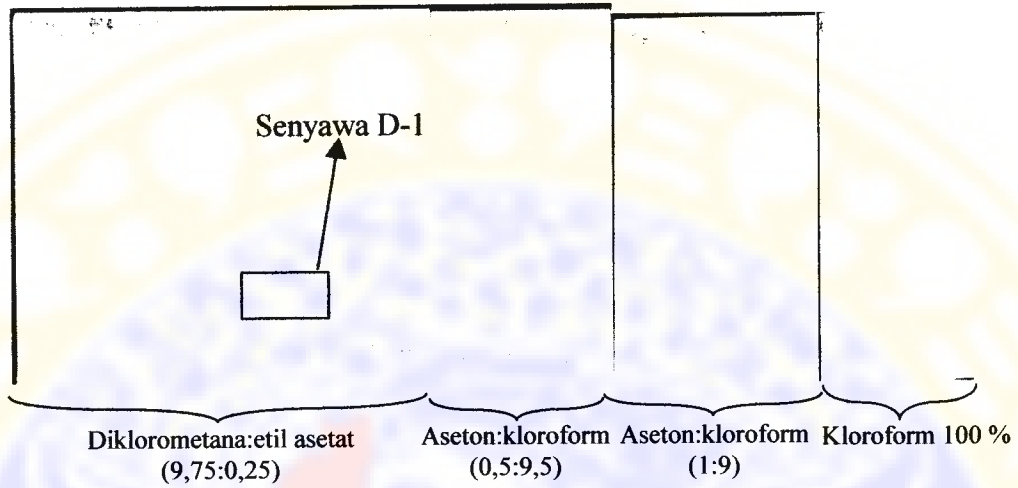
- Qomariyah, M.M., 2003, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dan Minyak Atsiri dari Kulit Batang Tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn.** Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Shriner, R.L., Hermann, C.K.F., Morrill, T., Curtin, D.Y., and Fuson, R.C., 1998. *The Systematic Identification of Organic Compounds*, Seventh Edition, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Silverstein, R.M, Bassler, G.c. and Morrill, T.C., 1991. *Spectrometric Identification of Organic Compound*, Fifth Edition, John Weley, Inc, Canada.
- Tjitrosoepomo, G., 1996, *Taksonomi Tumbuhan*, cetakan ke-9, Penerbit Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Utami, Prapti, dr., 2004, *Tanaman Obat untuk Mengatasi Rematik dan Asam Urat*, Penerbit PT. Agromedia Pustaka, Tangerang.
- Utomo, P., 2002, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Lignan dari kulit Batang Tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn.** Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Wibowo, A., 2002, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.** Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Windholz, M., *et al.*, 1976, *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs*, Ninth Edition, merck & Co., Inc, USA.
- Yuhastutik, D., 2003, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Fenolik dari Kulit Batang *Saccopetalum horsfieldii* Benn.** Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.
- Yulisaroh, L., 2003, **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang Tanaman *Saccopetalum horsfieldii* Benn.** Skripsi, Jurusan Kimia, FMIPA, UNAIR, Surabaya.

Lampiran 1. Foto tumbuhan *Saccopetalum horsfieldii* Benn.

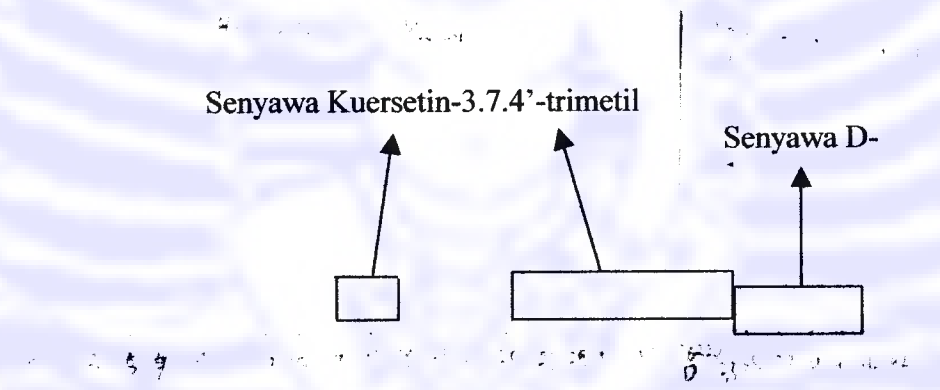


UNIVERSITAS AIR MATA
SURABAYA

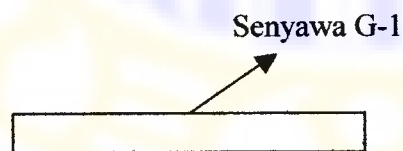
Lampiran 2. Kromatogram hasil kromatografi senyawa D-1 dan G-1



Kromatogram hasil kromatografi kolom grafitasi

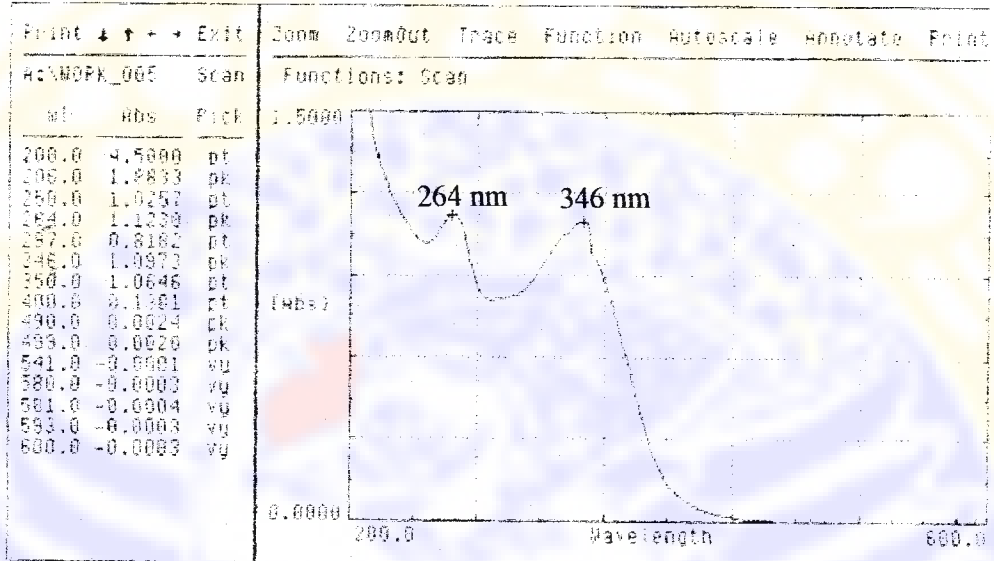


Kromatogram hasil kromatografi kolom cepat fraksi D + pereaksi DPPH

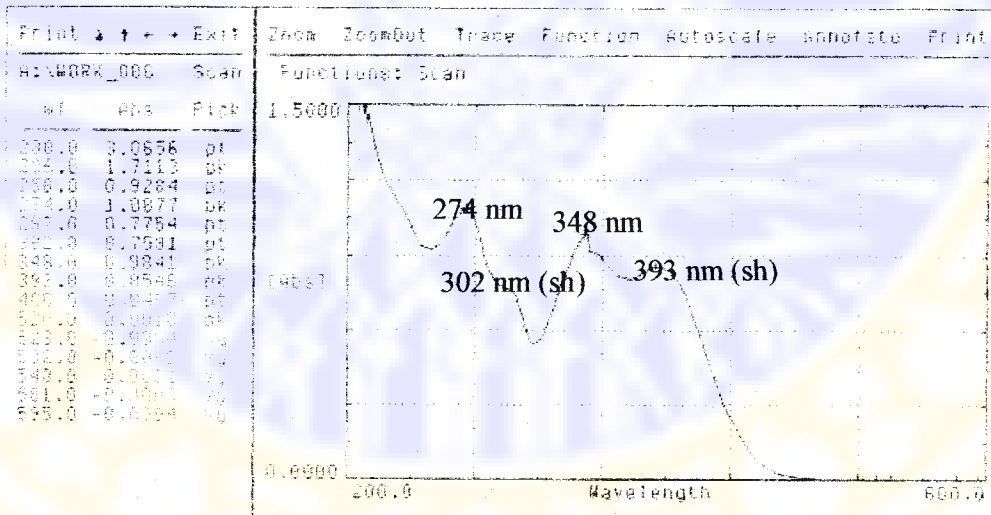


Kromatogram hasil kromatografi kolom cepat fraksi G + pereaksi DPPH

Lampiran 3. Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam MeOH dan AlCl₃

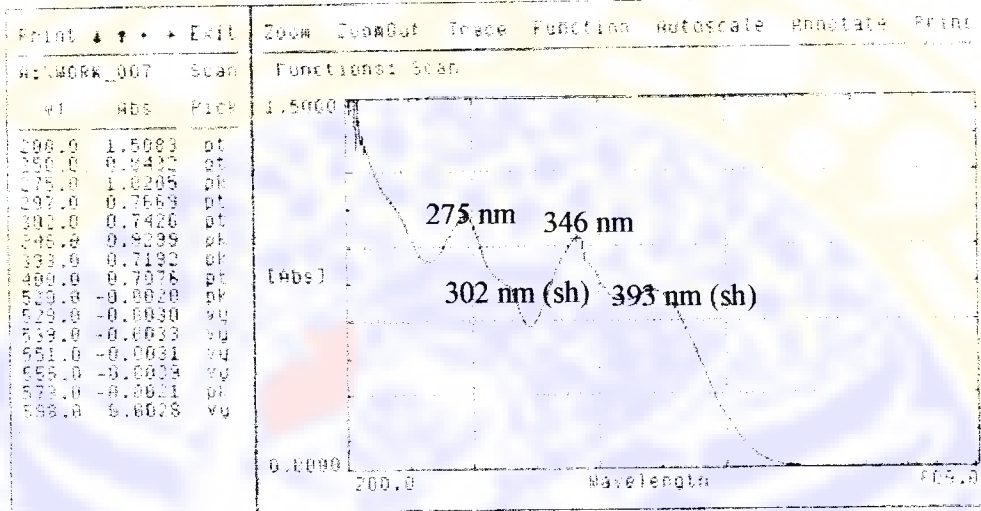


Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam MeOH

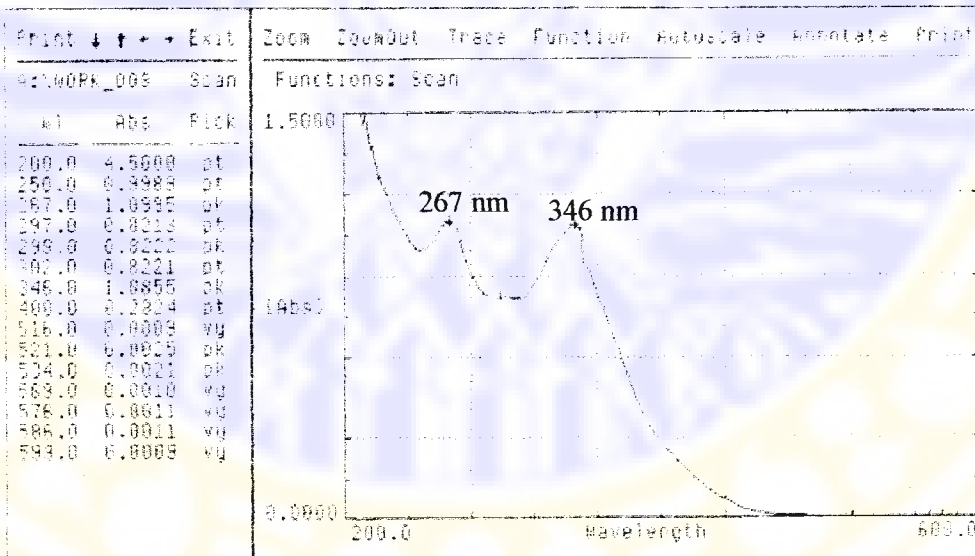


Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam AlCl₃

Lampiran 4. Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam AlCl₃/HCl dan NaOAc

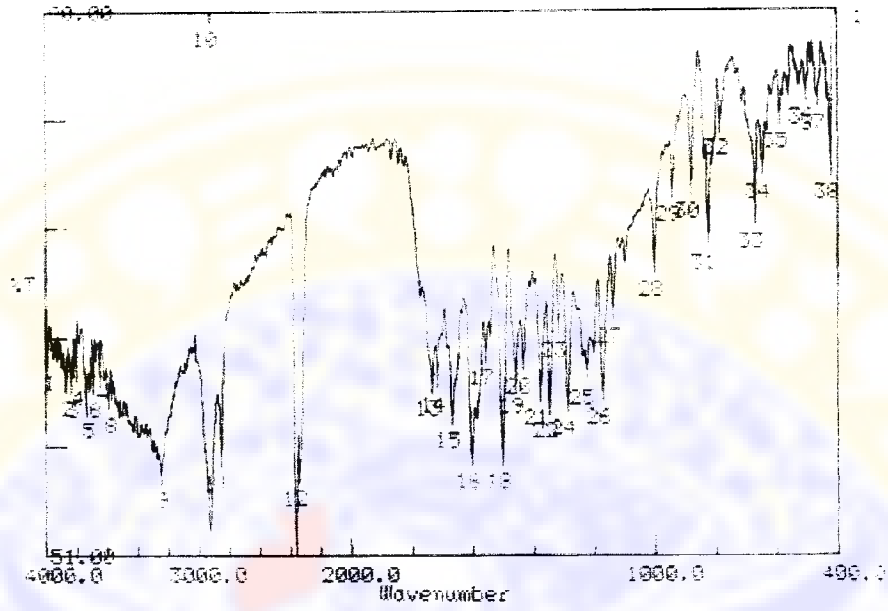


Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam AlCl₃/HCl

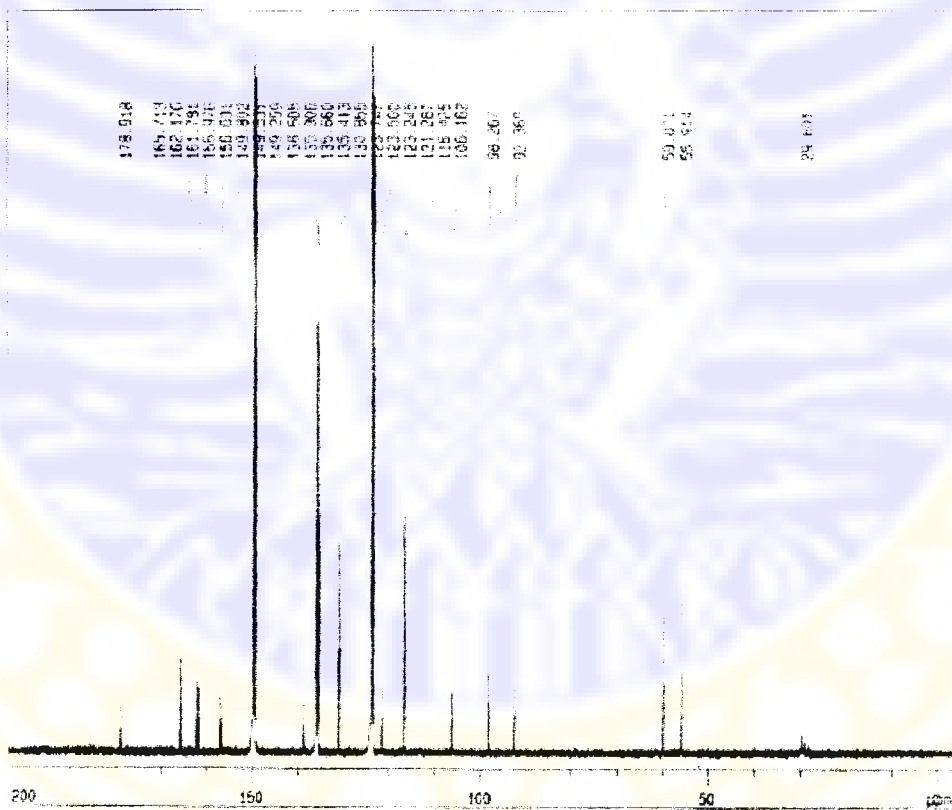


Gambar spektrum UV-Vis senyawa D-1 dalam NaOAc

Lampiran 5. Gambar spektrum IR dan ¹³C-NMR senyawa D-1

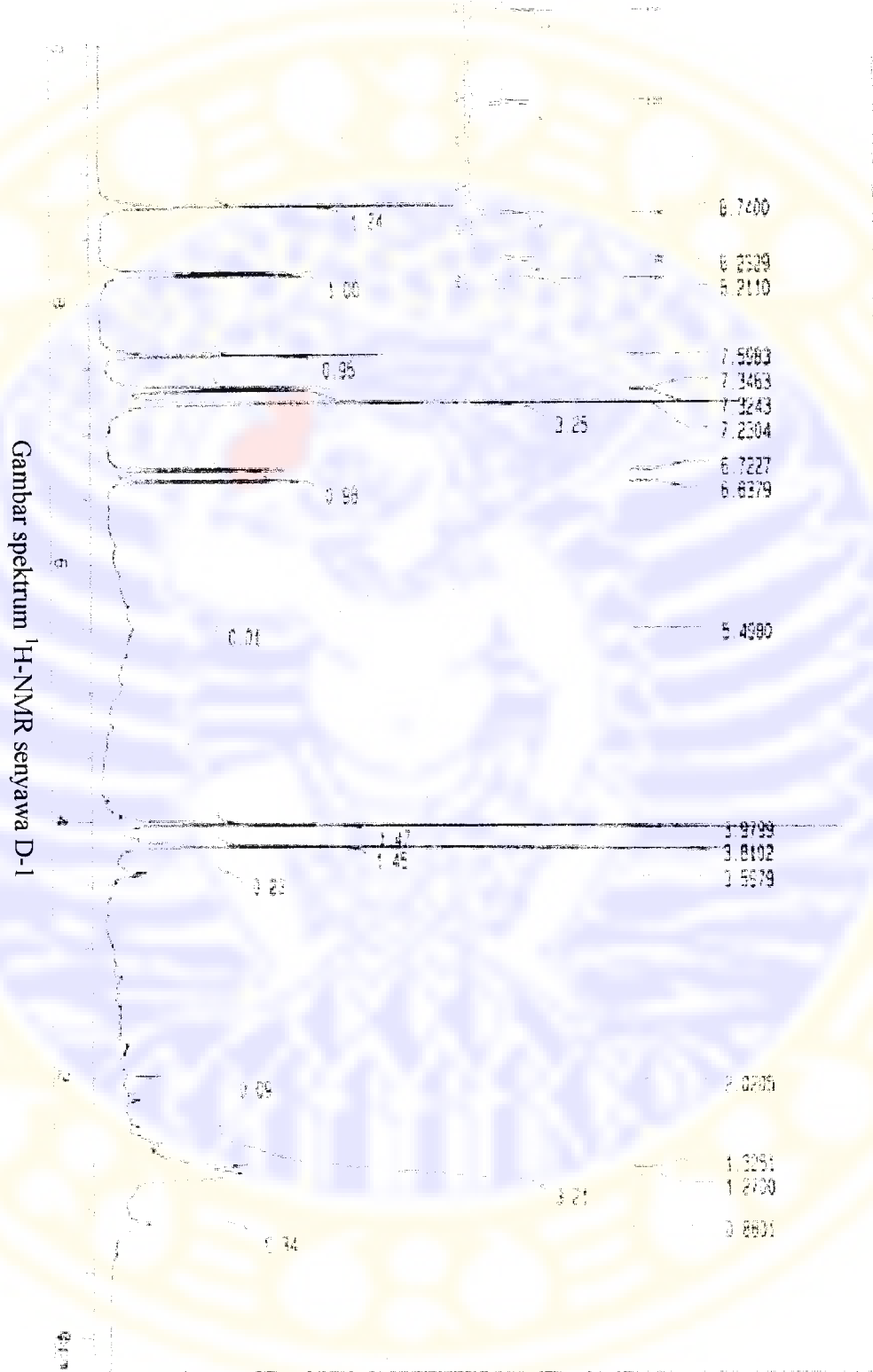


Gambar spektrum IR senyawa D-1

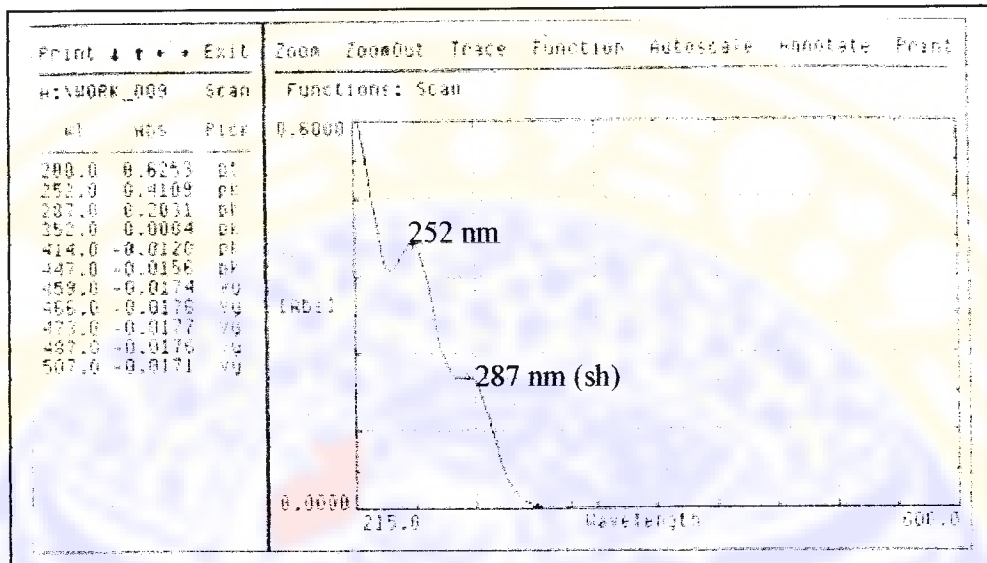


Gambar spektrum ¹³C-NMR senyawa D-1

Lampiran 6. Gambar spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa D-1



Lampiran 7. Gambar spektrum UV-Vis senyawa G-1 dalam MeOH



Gambar spektrum UV-Vis senyawa G-1 dalam MeOH

Lampiran 8. Gambar spektrum ¹H-NMR senyawa G-1

