UNIVERSITAS INDONESIA

ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR ANTIOKSIDAN DAN PENGHAMBAT ENZIM XANTIN OKSIDASE EKSTRAK DAUN PLETEKAN (*Ruellia tuberosa* L.)

TESIS

AKTSAR ROSKIANA AHMAD
1006734174

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012

UNIVERSITAS INDONESIA

ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR ANTIOKSIDAN DAN PENGHAMBAT ENZIM XANTIN OKSIDASE EKSTRAK DAUN PLETEKAN (*Ruellia tuberosa* L.)

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister farmasi

AKTSAR ROSKIANA AHMAD
1006734174

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KEFARMASIAN
DEPOK
JULI 2012

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan dibawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa tesis ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika dikemudian hari ternyata saya melakukan tindakan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok,

Aktsar Roskiana Ahmad

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : AKTSAR ROSKIANA AHMAD

NPM : 1006734174

Tanda Tangan :

Tanggal : 11 Juli 2012

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama	:	Aktsar Roskiana Ahmad
NPM	:	1006734174
Program Studi	:	Magister Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis	:	Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Antioksidan dan Penghambat Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. ( )

Pembimbing II : Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. ( )

Penguji I : Prof. Dr. Endang Hanani, MS., Apt. ( )

Penguji II : Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana ( )

Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt. ( )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Juli 2012

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan syukur atas segala karunia dan nikmat yang Allah *SWT* telah berikan sehingga kami dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Farmasi pada Departemen Farmasi Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

(1) Bapak Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt., selaku pembimbing pertama yang memiliki andil besar dalam proses penelitian dan penyelesaian tugas akhir kami ini, semoga segala bantuan dan bimbingan Bapak mendapat imbalan yang setimpal di sisi-Nya.

(2) Ibu Dr. Berna Elya, M.Si., Apt., selaku pembimbing kedua yang memiliki andil besar dalam proses penelitian dan penyelesaian tugas akhir kami ini, semoga segala bantuan dan bimbingan Ibu mendapat imbalan yang setimpal di sisi-Nya.

(3) Prof. Dr. Endang Hanani, MS., Apt., selaku evaluator yang telah banyak memberikan saran pada penelitian ini.

(4) Ibu Dr. Katrin, MS., Apt., selaku Kepala Laboratorium Fitokimia yang telah memberikan izin penelitian.

(5) Bapak Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana selaku dewan penguji yang telah memberikan masukan keilmuan.

(6) Dr. Osamu Negishi, Tsukuba of University Japan, yang telah membantu pengukuran Spektrometri NMR.

(7) Ibu Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt., selaku dewan penguji dan Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

(8) Bapak Prof. Dr. Tadjuddin Naid, M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia yang telah memberikan izin tugas belajar.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

(9) Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

(10) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

(11) Seluruh staf pengajar dan karyawan serta rekan-rekan mahasiswa Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi Universitas Indonesia.

(12) Bapak AKBP. Koeswardhani, S.Si., M.Farm., Apt., dan Tanti, S.Si., yang telah memberikan fasilitas Laboratorium GC-MS.

(13) Zakiyah Ulfah dan Agus selaku staf laboratorium Fitokimia yang telah banyak membantu selama proses penelitian ini.

(14) Ruth Elenora, S.Si., Apt., dan teman-teman penelitian laboratorium Fitokimia atas segala bantuannya selama mengerjakan penelitian ini.

(15) Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah membantu proses penelitian dan penyusunan tesis ini.

Tidak lupa kepada kedua orang tua kami, Ayahanda Ahmad Dawira dan Ibunda Siti Rachmatiah yang telah memelihara dan mendidik kami, semoga segala amalan dan jerih payah keduanya mendapat balasan disisi-Nya, kepada kakak-kakakku dan khususnya buat Abdul Karim atas segala bantuannya, serta seluruh keluarga yang turut mendorong dan senantiasa memotivasi kami untuk menyelesaikan studi kami.

Akhir kata, saya berharap Allah *SWT* berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangannya pada tesis ini. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan bermanfaat bagi rekan-rekan farmasi.

Penulis

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, sayà yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Aktsar Roskiana Ahmad
NPM	: 1006734174
Program Studi	: Magister Ilmu Kefarmasian
Departemen	: Farmasi
Fakultas	: Farmasi
Jenis karya	: Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

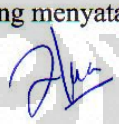
'Isolasi dan Elusidasi Struktur Antioksidan dan Penghambat Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa L.*)'.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di	: Depok
Pada tanggal	: 11 Juli 2012

Yang menyatakan



(Aktsar Roskiana Ahmad)

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

ABSTRAK

Nama : Aktsar Roskiana Ahmad
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul : Isolasi dan Elusidasi Struktur Antioksidan dan Penghambat Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) termasuk anggota suku Acanthaceae. Penggunaan secara tradisional sebagai diuresis, antidiabetes, antipiretik, antihipertensi, dan ditambahkan sebagai salah satu bahan pada minuman kesehatan di Taiwan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan struktur senyawa aktif antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase. Isolasi menggunakan teknik kombinasi kromatografi yang dipandu oleh aktivitas antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase. Penentuan struktur senyawa kimia dilakukan dengan analisis data spektroskopi UV-Vis, MS, IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR dan NMR-2 dimensi. Diperoleh dua senyawa, yaitu senyawa RTL1 adalah kamarosida dan senyawa RTL2 adalah dimetil 2,3,5,6-tetrahidroksitereftalat. Pengujian aktivitas senyawa RTL1 dan RTL2 terhadap aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 28,79 dan 20,77 µg/mL, serta mampu menghambat enzim xantin oksidase dengan nilai IC_{50} 0,67 dan 0,21 µg/mL.

Kata kunci : Acanthaceae , antioksidan, pletekan, *Ruellia tuberosa* L., xantin oksidase
xvi+135 halaman : 17 gambar; 16 tabel
Bibliography : 63 (1975-2012)

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

ABSTRACT

Nama : Aktsar Roskiana Ahmad
Program Studi : Magister Ilmu Farmasi
Judul : Isolation and Structure Elucidation of Antioxidants and Xanthin Oxidase Inhibitory From Leaves Extract of Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.)

Pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) belongs to Acanthaceae family. In traditional medicine has been used as diuretic, antidiabetic, antipyretic and antihypertensive, and it also recently been incorporated as a component in a herbal tea in Taiwan. The aims of the research were to isolate the antioxidative compounds and inhibitor of xanthin oxidase activity from *n*-butanolic extract of *Ruellia tuberosa* L. leaves. The isolation used combination of chromatography methods and guided with antioxidant and inhibitor xanthin oxidase activities. Structure of isolated compounds are determinated by spectrae data of UV-Vis, MS, IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR and 2-Dimension NMR. The research found two compounds are RTL1 as camaroside and RTL2 dimethyl 2,3,5,6-tetrahydroxyterepthalate. Antioxidant activity assay of RTL1 and RTL2 compounds with IC_{50} value of 28.79 and 20.77 µg/mL and xanthin oxidase inhibitory assay of RTL1 and RTL2 compounds with IC_{50} value of 0.67 and 0.21 µg/mL.

Key word : Acanthaceae, antioxidant, pletekan, *Ruellia tuberosa L.*, xanthin oxidase
xvi+135pages : 17 pictures; 16 tables
Bibliography : 63 (1975-2012)

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL..... i
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME……... ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS…….. iii
HALAMAN PENGESAHAN..... iv
KATA PENGANTAR……..... v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH……..... .. vii
ABSTRAK ……… viii
ABSTRACT ……..... ix
DAFTAR ISI……..... x
DAFTAR GAMBAR……..... xii
DAFTAR TABEL …….. xiii
DAFTAR RUMUS…….. xiv
DAFTAR LAMPIRAN xv

BAB 1. PENDAHULUAN ……..... 1
1.1 Latar Belakang …… 1
1.2 Rumusan Masalah ……. 2
1.3 Hipotesis ……..……. 3
1.4 Tujuan Penelitian …… 3
1.5 Manfaat Penelitian … ……..... 3

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA ……..…… 4
2.2 Uraian Tanaman ……... 5
2.3 Aktivitas Biologi..…… ……..… 6
2.4 Kandungan Kimia ……..… 7
2.5 Antioksidan……..... 8
2.5.1 Radikal Bebas……...…… 8
2.5.2 Sumber Radikal Bebas....……. 9
2.5.3 Definisi dan Pengelompokan Antioksidan…… 11
2.5.4 Jenis-jenis Antioksidan……..... 12
2.5.5 Metode Pengujian Antioksidan denga Peredaman Radikal DPPH……... 13
2.6 Enzim Xantin Oksidase…….…….…… 13
2.6.1 Definisi Enzim dan Xantin Oksidase…..……... 13
2.6.2 Kinetika Enzim……..... 15
2.7 Hubungan Antara Xantin Oksidase dan Antioksidan…… . 16
2.8 Ekstraksi……. 19
2.8.1 Ekstraksi Menggunakan Pelarut…..…..……..… 20
2.8.2 Destilasi Uap Air…..……...……..…..…….. 21
2.8.3 Cara Ekstraksi Lainnya…… 22
2.9 Kromatografi…… ……..... 22
2.9.1 *Size Exclusion Chromatography* ……..…… 23
2.9.2 Kromatografi Gas……...……...…… 23
2.9.3 Kromatografi Lapis Tipis …… ……...…… 23
2.9.4 Kromatografi Kolom …….. 24
2.10 Spektrsokopi……..... 24

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.10.1 Spektrofotometer Ultraviolet ……. 24
2.10.2 Spektrofotometer Infra Merah..……..……. 25
2.10.3 Spektroskopi Massa …….……. 25
2.10.4 Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance*…….. 26

BAB 3. METODE PENELITIAN ……..... 28
3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian……..... 28
3.2 Alat dan Bahan…… 28
3.2.1 Alat……...…… 28
3.2.2 Bahan…… ……..... 28
3.3 Cara Kerja……..……..… 29
3.3.1 Penyiapan Simplisia…….……..… 29
3.3.2 Ekstraksi Daun *R. tuberosa* L …… . 29
3.3.3 Partisi Ekstrak Daun *R. tuberosa* L..…… …… 30
3.3.4 Uji Antioksidan Ekstrak Daun *R. tuberosa* L…… 30
3.3.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim XOD Ekstrak Daun *R. tuberosa* L…… 32
3.3.6 Penapisan Fitokimia…… …….. 38
3.3.7 Kromatografi Kolom … …… ……...…… 41
3.3.8 Identifikasi Isolat…..…… ……. 42

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... 43
4.1 Penyiapan Sampel Daun *R. tuberosa* L……..……... 43
4.2 Ekstraksi…… …… 43
4.3 Partisi…….....**.** 44
4.4 Uji Aktivitas Ekstrak Daun *R. tuberosa* L….. ……. 45
4.4.1 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Peredaman Metode Radikal DPPH…… ……..……. 45
4.4.2 Uji Penghambatan Enzim XOD…...…… 48
4.5 Penapisan Fitokimia …… ……..... 52
4.6 Kromatografi Kolom……... 52
4.7 Identifikasi dan Elusidasi Struktur Senyawa……... 53
4.7.1 Identifikasi Senyawa RTL1……. 54
4.7.2 Identifikasi Senyawa RTL2…… 58
4.8 Uji Aktivitas isolat……... 62
4.8.1 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat dengan Peredaman Radikal DPPH…… ……... 62
4.8.2 Uji Penghamabtan Enzim XOD……..... 64
4.9 Penentuan Kinetika Enzim XOD……...….. 66

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN 70
5.1 Kesimpulan…… …… 70
5.2 Saran…….…… …….. 70

DAFTAR ACUAN 71

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman *R. tuberosa* L …….....	4
Gambar 2.2	Daun *R. tuberosa* L ..…….....	5
Gambar 2.3	Struktur Senyawa Flavonoid *R. tuberosa* L.....	8
Gambar 2.4	Struktur DPPH.....	13
Gambar 2.5	Reaksi Pembentukan Asam Urat Oleh Enzim Xantin Oksidase.....	14
Gambar 2.7	Struktur Xantin, Allopurinol, Flavonoid.....	19
Gambar 2.8	Kerangka Struktur Flavonoid…….....	19
Gambar 4.1	Prediksi Kerangka Senyawa RTL1……	56
Gambar 4.2	NMR-2D HMBC Senyawa RTL1.....	56
Gambar 4.3	Prediksi Fragmentasi Senyawa RTL1.....	57
Gambar 4.4	Struktur Senyawa RTL1.....	58
Gambar 4.5	Prediksi Kerangka Senyawa RTL2……..	60
Gambar 4.6	NMR-2D HMBC Senyawa RTL2.....	60
Gambar 4.7	Prediksi Fragmentasi Senyawa RTL2.....	61
Gambar 4.8	Struktur Senyawa RTL2.....	62
Gambar 4.9	Plot Lineweaver-Burk RTL1.....	68
Gambar 4.10	Plot Lineweaver-Burk RTL2.....	68

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Reagen Dan Volume Pada Uji Penghambatan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase……...	37
Tabel 4.1	Data Rendamen Ekstrak Daun *R. tuberosa* L……..…..	44
Tabel 4.2	Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Standar…….….	46
Tabel 4.3	Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *R. tuberosa* L…….……...	47
Tabel 4.4	Data Uji Pendahuluan Penentuan Suhu Optimum.…….…….	48
Tabel 4.5	Data Uji Pendahuluan Penentuan pH Optimum…….....	49
Tabel 4.6	Data Uji Pendahuluan Penentuan Konsentrasi Substrat Optimum ……..……	49
Tabel 4.7	Hasil Pengujian Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Standar….....	50
Tabel 4.8	Hasil Pengujian Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.……	51
Tabel 4.9	Hasil Penafisan Fitokimia ……..…..	52
Tabel 4.10	Pengelompokan Fraksi Kromatografi Kolom ……..…....	53
Tabel 4.11	Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Isolat……	63
Tabel 4.12	Hasil Pengujian Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Isolat…….……....	65
Tabel 4.13	Data Uji Kinetika Tanpa Inhibitor pada Penghambatan Enzim Xantin Oksidase…….....	67
Tabel 4.14	Data Uji Kinetika Senyawa RTL1 pada Penghambatan Enzim Xantin Oksidase…….……	67
Tabel 4.15	Data Uji Kinetika Senyawa RTL2 pada Penghambatan Enzim Xantin Oksidase……..……...	67

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

DAFTAR RUMUS

Persamaan 2.1	Reaksi Pembentukan Asam Urat dan ROS…….	17
Rumus 3.1	Persentasi Inhibisi Antioksidan …….…….	32
Rumus 3.2	Penentuan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase…..……	34
Rumus 3.3	Persentasi Inhibisi Enzim Xantin Oksidase…….....	38
Rumus 4.1	Indeks Kekurangan Hidrogen Senyawa RTL1……	55
Rumus 4.2	Indeks Kekurangan Hidrogen Senyawa RTL2….……....	59
Persamaan 4.3	Donasi Proton Flavonoid pada ROS……	63

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja …….....	77
Lampiran 2.	Identifikasi Antioksidan Secara Kualitatif…….....	78
Lampiran 3.	Spektrum λ Maksimum DPPH……..	79
Lampiran 4.	Skema Kerja Pengujian Antioksidan…….....	80
Lampiran 5.	Spektrum Penentuan Panjang Gelombang Enzim XOD……..……	81
Lampiran 6.	Skema Kerja Pengujian Penghambatan Enzim XOD…….....	82
Lampiran 7.	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Enzim XOD.....…….....	83
Lampiran 8.	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin…….....	84
Lampiran 9.	Hasil Determinasi Tanaman…….……....	85
Lampiran 10.	Sertifikat Analisis Enzim XOD……...……	86
Lampiran 11.	Sertifikat Analisis Xantin…..…….……..	87
Lampiran 12.	Sertifikat Analisis Allopurinol…..…….……....	89
Lampiran 13.	KLT 2-Arah Senyawa RTL1…….……....	90
Lampiran 14.	Profil Spektrofotormetri Senyawa RTL1……..……..	91
Lampiran 15.	Spektrum FTIR Senyawa RTL1…….……....	92
Lampiran 16.	Spektrum GC-MS Senyawa RTL1…….……....	93
Lampiran 17.	Profil Fragmentasi Senyawa RTL1…….……..	94
Lampiran 18.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1…….……....	95
Lampiran 18a.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1 (Perbesaran)….....	96
Lampiran 18b.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1 (Perbesaran).....	97
Lampiran 18c.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1 (Perbesaran)…..……..	98
Lampiran 19.	Spektrum ^{13}CNMR Senyawa RTL1……..……....	99
Lampiran 20.	Spektrum NMR-2D DEPT Senyawa RTL1……..……...	100
Lampiran 21.	Spektrum NMR-2D H-H COSY Senyawa RTL1…….…….	101
Lampiran 22.	Spektrum NMR-2D C-H COSY Senyawa RTL1…….……	102
Lampiran 23.	Spektrum NMR-2D HMBC Senyawa RTL1……....	103
Lampiran 23a.	Spektrum NMR-2D HMBC Senyawa RTL1 (Perbesaran)..	104
Lampran 24.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1 (+ H_2O)……..……...	105
Lampiran 25.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL1 (+ H_2O)…….....	106
Lampiran 26.	KLT 2-Arah Senyawa RTL2……..……	107
Lampiran 25.	Spektrum UV-Vis Senyawa RTL2……..……	108
Lampiran 26.	Spektrum FTIR Senyawa RTL2…….……...	109
Lampiran 27.	Spektrum GC-MS Senyawa RTL2…….……	110
Lampiran 28.	Profil Fragmentasi Senyawa RTL2…….……	111
Lampiran 29.	Spektrum ^{1}HNMR Senyawa RTL2…….……..……	112
Lampiran 30.	Spektrum 13CNMR Senyawa RTL2…….……...	113
Lampiran 31.	Spektrum NMR-2D DEPT Senyawa RTL2……...……...	114
Lampiran 32.	Spektrum NMR-2D H-H COSY Senyawa RTL2…….....	115
Lampiran 33.	Spektrum NMR-2D C-H COSY Senyawa RTL2…….	116
Lampiran 34.	Spektrum NMR-2D HMBC Senyawa RTL2 ……....	117

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan adalah senyawa yang dapat mengurangi, menahan dan mencegah proses oksidasi dengan menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Suhartono, 2002). Tubuh manusia telah memiliki antioksidan disebut antioksidan endogen meliputi enzim intrasel seperti *superoxida dismutase* (Winarsi, 2007). Akan tetapi enzim juga berperan dalam memproduksi radikal bebas dalam tubuh, seperti enzim xantin oksidase yang mengkatalisis hipoxantin menjadi xantin dan selanjutnya menjadi asam urat yang melepaskan radikal bebas dalam bentuk anion superoksida dan hidrogen peroksida. Akibatnya xantin oxidase memberikan kontribusi terjadinya stres oksidatif dalam tubuh, dan secara patologi kondisi ini dapat menyebabkan terjadinya inflamasi, rematoid artitis, parkinson, Alzheimer, kanker dan penuaan (Priyanto, 2010). Jadi kelebihan kerja dari enzim xantin oksidase dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif didalam tubuh.

Beberapa penelitian penghambatan enzim xantin oksidase dan aktivitas antioksidan telah dilaporkan, seperti yang dilakukan oleh Behera, Adawadkar dan Makhija (2003) tentang penghambatan enzim xantin oksidase dan aktivitas peredaman superoksida pada beberapa suku Graphidaceae. Muraoka dan Miura (2004) melaporkan asam fitik sebagai penghambat enzim xantin oksidase dan bersifat antioksidan. Studi mekanisme struktur aktif penghambat enzim xantin oksidase dan peredaman radikal bebas telah dilakukan pada turunan kumarin (Lin et al., 2008) dan fenilpropanoid (Chang et al., 2007).

Indonesia memiliki keankeragaman flora yang sangat melimpah, yang bisa dijadikan sebagai sumber bahan baku obat tradisional. Penggunaannnya didasarkan pada pengalaman empiris yang diwariskan secara turun temurun. Salah satu tanaman asli Indonesia yang bisa dimanfaatkan dan sebagai sumber senyawa bioaktif adalah dari suku Acanthaceae. Salah satu anggota suku Acanthaceae adalah genus Ruellia (van Steenis, 1975). Ruellia merupakan tumbuhan tropis dan banyak ditemukan di wilayah Asia Tenggara. Terdapat beberapa jenis dari Ruellia

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

diantaranya adalah *Ruellia colorata*, *Ruellia macrophylla* Vahl, *Ruellia malacosperma* Greenm, *Ruellia malocosperma* Vahl, *Ruellia napifera* Zoll et Mor, *Ruellia rosea* Hemsl dan *Ruellia tuberosa* Linn. Sekitar 32 jenis yang telah diidentifikasi kandungan kimianya termasuk *Ruellia tuberosa* Linn. (Long, 1976).

R. tuberosa L. secara tradisional digunakan untuk pengobatan sebagai diuresis, antidiabetes, antipiretik, antihipertensi dan bahan antidot. Di Taiwan, *R. tuberosa* L. termasuk simplisia yang ditambahkan dalam minuman kesehatan (Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006). Di Trinidad dan Tobago digunakan sebagai antihipertensi dan penurun panas (*cooling*) (Lans, 2006). Di Indonesia tanaman ini belum banyak digunakan, bahkan lebih dikenal sebagai gulma. Untuk meningkatkan pemanfaatannya perlu kajian ilmiah mengenai aktivitas biologi atau farmakologi dari tanaman ini.

R. tuberosa L. salah satu jenis yang banyak ditemukan di Indonesia. Flavonoid merupakan senyawa mayor pada *R. tuberosa* L. (Long, 1976). Penelitian sebelumnya telah mengisolasi beberapa senyawa flavonoid yaitu kirsimaritin, kirsimarin, kirsiliol 4′-glukosida, sorbifolin, dan pedalitin (Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006). Uji beberapa aktivitas biologis terhadap *R. tuberosa* L. berupa aktivitas antioksidan, antiurolitik, antiinflamasi, dan efek hipoglikemik.

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa senyawa alam seperti senyawa golongan fenol dapat menurunkan aktivitas enzim xantin oksidase dan dapat meredam radikal bebas. Flavonoid merupakan senyawa fenol banyak dihasilkan di alam. Secara biologi flavonoid memiliki aktivitas farmakologi sebagai, antibakteri, antivirus, antioksidan, antimutagenik, dan menghambat beberapa enzim. Cos et al., (1998) melaporkan bahwa senyawa flavonoid dapat memberikan penghambatan terhadap xantin oxidase dan peredaman superoksida.

Dari kajian pustaka diketahui bahwa *R. tuberosa* L. memiliki banyak aktivitas farmakologi, sehingga *R. tuberosa* L. berpotensi sebagai sumber senyawa antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase, dan penelitian ini pun belum pernah dilaporkan. Sehingga perlu dilakukan penelitian tentang

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

pencarian senyawa antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase pada ekstrak daun *R. tuberosa* L.

1.2 Rumusan Masalah

a. Dari kajian pustaka diketahui bahwa daun *R. tuberosa* L. kaya akan senyawa kimia yang sangat bermanfaat.
b. Apakah ekstrak daun *R. tuberosa* L. aktif sebagai antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase.
c. Apakah ekstrak daun *R. tuberosa* L. mengandung senyawa kimia yang berpotensi sebagai antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase.

1.3 Hipotesis

Ekstrak daun *R. tuberosa* L. mengandung senyawa aktif yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase.

1.4 Tujuan Penelitian

a. Mengisolasi senyawa untuk pencarian senyawa antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase.
b. Menentukan struktur dan elusidasi senyawa yang diperoleh.
c. Menguji aktivitas antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase terhadap senyawa yang diperoleh.

1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah data ilmiah mengingat masih terbatas laporan penelitian mengenai *R. tuberosa* L. Uji aktivitas biologi yang dilakukan diharapkan dapat dimanfaatkan untuk pengembangan obat tradisional. Senyawa aktif yang diperoleh diharapkan menjadi senyawa model untuk pengembangan senyawa penghambat enzim xantin oksidase dan antioksidan yang baru dengan aktivitas lebih baik, dan lebih aman dibandingkan dengan obat yang saat ini digunakan. Selain itu dapat dijadikan sebagai biomarker untuk sediaan herbal yang berbasis tanaman *R. tuberosa* L.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Tanaman

Tanaman *Ruellia tuberosa* Linn. secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Ditjen POM, 2009) :

Kerajaan : Plantae
Subkerajaan : Tracheobionta
Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Bangsa : Lamiales
Suku : Acanthaceae
Marga : Ruellia
Jenis : *Ruellia tuberosa* L.

[Sumber : Dokumentasi pribadi]

Gambar 2.1 Tanaman Pletekan (*R. tuberosa* L.)

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.2 Uraian Tanaman

2.2.1 Nama Lain

Nama Indonesia : Ceplikan.

Nama Jawa : Pletekan, ceplikan (Ditjen POM, 2009).

2.2.2 Morfologi

Herba tegak atau pangkalnya berbaring, dengan berkas akar bentuk umbi memanjang, tinggi 0,4-0,9 m. Batang segiempat tumpul. Tangkai daun 0,5-1,5 cm, helaian daun bentuk memanjang hingga bulat telur terbalik, dengan pangkal meruncing dan ujung tumpul, tepi daun bergigi, gundul. Tangkai bunga 0,5-2,5 cm. Kelopak bunga tingginya 2-3 cm. Mahkota dengan tinggi 5-6 cm, kebanyakan berwarna ungu cerah, terkadang ungu pucat hingga merah atau hampir putih, sebelah luar berambut, tabung sempit pada pangkalnya, diatasnya melebar dan berusuk. Diameter bunga 3,5-5 cm, taju sama, oval hingga bulat telur terbalik, bergigi bergelombang tidak beraturan. Benang sari tertancap pada puncak dari tabung. Tangkai sari berlekatan berpasangan pada pangkalnya. Kepala sari putih. Tonjolan dasar bunga berbentuk bantal. Taju kepala putik 2, yang terdepan lebar, yang paling belakang sangat kecil. Buah gundul, panjangnya 2-3 cm, membuka dengan 2 katup. Biji tiap ruang 2-20 (van Steenis, 1975).

[Sumber : Dokumentasi pribadi]

Gambar 2.2 Daun tanaman Pletekan (*R. tuberosa* L.)

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.2.3 Bagian Tanaman yang Digunakan

Berdasarkan penggunaan dan pemanfaatan sebagai bahan obat bagian tanaman yang sering digunakan adalah daun *R. tuberosa* L. sehingga dalam penelitian ini bagian tanaman yang digunakan adalah daun (Gambar 2.2).

2.3 Aktivitas Biologi

Beberapa uji aktivitas yang telah dilakukan, yaitu :

2.3.1 Antioksidan

Ekstrak etil asetat batang *R. tuberosa* L. aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} 28,6 µg/mL (Chen, Wu, Shieh dan Hsieh, 2006). Ekstrak etanol dan etil asetat *R. tuberosa* L. memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan hasil pengujian model *in-vitro* dengan peredaman radikal DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl-hydrazyl*), hidrogen peroksida, superoksida, nitrit oksida dan FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power*) (Arirudran, Saraswathy, dan Vi Jayalakshmi, 2011).

2.3.2 *Antinociceptive* dan Antiinflamasi

Pengujian aktivitas biologi *antinociceptive* dan antiinflamasi ekstrak etanol *R. tuberosa* L. pada tikus dengan dosis 500 dan 250 mg/kg BB signifikan menghambat pembentukan serotonin dan bersifat sebagai antiinflamasi (Alam et al., 2009).

2.3.3 Hipoglikemik

Ekstrak etil asetat signifikan menurunkan gula darah dan ekstrak *n*-heksana cukup baik menurukan kadar gula darah pada dosis pemberian 100 dan 150 mg/kg BB terhadap kelinci dibetes (diinduksi aloksan) (Ullah, Shahwar dan Ahmad, 2012). Ekstrak air daun *R. tuberosa* L. berpengaruh terhadap kadar SGOT, SGPT dan gambaran histologis hepar tikus diabetes (Adriani, Wiryatun, dan Huriyati, 2011). Ekstrak 50% hidroetanol dari *R. tuberose* L. dan *D. patulus* dosis 500 mg/kg BB tidak hanya mengontrol tingkat lipida peroksida tetapi juga membantu meningkatkan potensi antioksidan (Manikandan dan Doss, 2006).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.3.4 Antiurolitik

Ekstrak etanol akar *R. tuberosa* L. signifikan memberikan efek antiurolitik (B. Sailaja, Bharathi dan Prasad, n.d).

2.3.5 Gastroprotektif

Ekstrak air akar *R. tuberosa* L memiliki aktivitas gastroprotektif pada tikus dengan dosis pemberian 470, 940 dan 1880 mg/kg BB (Arambewela, Thambugala dan Ratnasooriya, 2003).

2.3.6 Antiproliferatif

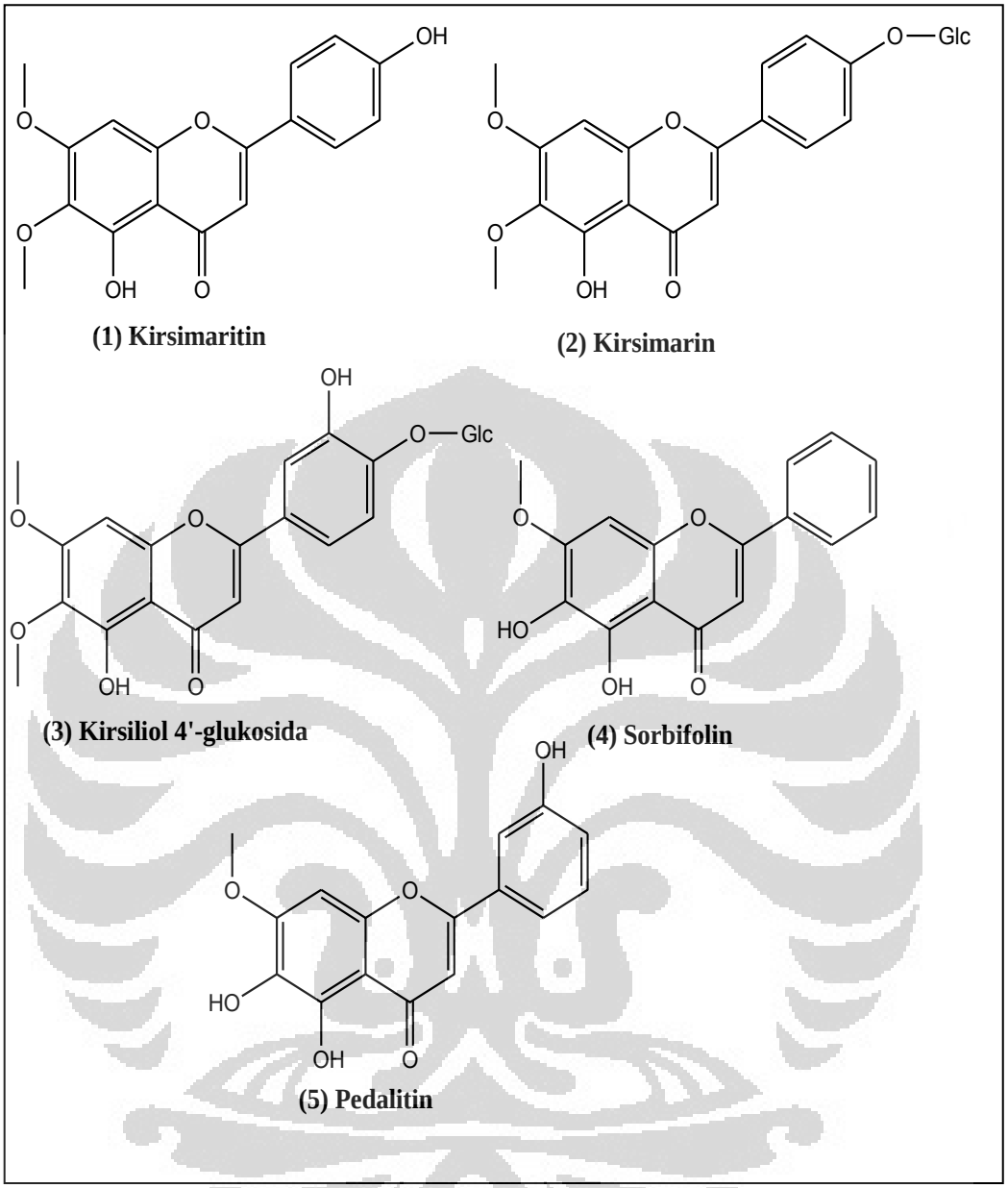
Isolasi senyawa dari ekstrak etil asetat buah *R. tuberosa* L. diperoleh beberapa senyawa golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antiproliferatif terhadap HepG2 dan KB kanker *cell line* (Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006).

2.4 Kandungan Kimia *R. tuberosa* L.

Tanaman *R. tuberosa* L. mengandung senyawa betulin, indol-3-karboksaldehid, asam vanilat, fenol (0,43 mg/g), tanin (10 mg/g) dan senyawa golongan flavonoid yaitu apigenin, antosianidin, malvidin 3,5-diglukosida, luteolin, antosianin, kirsimaritin (**1**), kirsimarin (**2**), kirsiliol 4′-glikosida (**3**), sorbifolin (**4**), dan pedalitin (**5**) (Long, 1976; Manikandan dan Doss, 2010 & Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006).

Kandungan nutrisi pada ekstrak 50% hidroetanol daun *R.tuberosa* L. yaitu asam askorbat 0,44; likopen 0,896; karotenoid 0,046; tokoferol 0,187 mg/g, lemak 1,32; protein 4,3; karbohidrat 56,4; serat 2,7 dan kadar air 5,2%. Kandungan mineral yaitu kadar abu 6,2% (Manikandan dan Doss, 2010).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012



[Sumber : Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006]

Gambar 2.3 Struktur senyawa flavonoid pada *R. tuberosa* L.

2.5 Antioksidan dan Radikal Bebas

2.5.1 Radikal Bebas

Radikal bebas (*free radical)* adalah senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Meskipun radikal bebas yang pertama dapat dinetralkan, akan tetapi radikal bebas lain terbentuk dalam proses tersebut yang menyebabkan terjadinya reaksi berantai (Percival, 1998). Istilah *spesies oxygen reactive* (ROS) bukan hanya radikal OH (hidroksi) $^{\cdot}$, ROO $^{\cdot}$ (peroksil), NO $^{\cdot}$ (nitrit oksida), RO $^{\cdot}$ (alkoksil) dan $O_2^{\cdot}$ (anion superoksida) tetapi juga yang non radikal HOCl (asam hipoklorat), $^1O_2$ (singlet oksigen), $^1O_2$ (triplet oksigen), ONOO- (peroksinitrit), dan H_2O_2 (peroksida) (Aruoma, 1998).

Stres oksidatif (*oxidative stress*) adalah suatu keadaan dimana tingkat *oksigen reactive intermediate* (ROI) melebihi pertahanan antioksidan endogen (Percival, 1998). Kondisi stres oksidatif dapat diinduksi oleh berbagai faktor seperti kurangnya antioksidan dan kelebihan produksi radikal bebas. Keadaan ini dapat mempengaruhi proses fisologis maupun biokimia tubuh, yang mengakibatkan terjadinya gangguan metabolisme fungsi sel dan dapat berakhir pada kematian sel. Oksigen reaktif dapat bereaksi dengan beberapa makromolekul seperti DNA, protein, dan lemak. Kerusakan sel oleh radikal bebas tampaknya menjadi penyebab utama penuaan dini dan penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, katarak, penurunan sistem kekebalan tubuh dan disfungsi otak. Secara keseluruhan, radikal bebas pemicu patogenesis beberapa penyakit (Wresdiyati, Astawan dan Adnyane, 2003).

2.5.2 Sumber Radikal Bebas dalam Tubuh

Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara yaitu secara endogen sebagai respon normal proses biokimia intrasel maupun ekstrasel dan secara eksogen misalnya dari polusi dan makanan (Winarsih, 2007).

2.5.2.1 Sumber Internal (Priyanto, 2010)

a. Enzim

Sekitar 10-15% oksigen yang diambil saat bernafas digunakan oleh enzim seperti oksidase, oksigenase dan xantin oksidase dengan reaksi samping menghasilkan radikal superoksida ($O_2^{\cdot}$).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

b. Proses Fagositosis

Proses fagositosis melibatkan sel-sel neutrofil, eosinofil, monosit dan makrofag. Proses tersebut dapat menghasilkan radikal superoksida ($O_2^{\cdot}$), radikal hidroksi ($OH^{\cdot}$), dan peroksida (H_2O_2).

c. Oksidasi Hemoglobin

Diperkirakan 3% dari Hb yang terdapat pada sel darah merah mengalami oksidasi menjadi oksihemoglobin. Oksihemoglobin secara lambat akan melepaskan anion superoksida ($O_2^{\cdot}$)dalam jumlah yang bermakna.

d. Reaksi Fenton

Dalam tubuh manusia terdapat logam seperti besi (Fe) dan tembaga (Cu) baik dalam bentuk bebas atau terikat. Reaksi fenton akan terjadi dan menghasilkan radikal hidroksi ($OH^{\cdot}$) jika logam bereaksi atau teroksidasi dengan adanya peroksida (H_2O_2).

2.5.2.2 Sumber Eksternal (Priyanto, 2010)

a. Polutan (ozon)

Ozon yang bereaksi secara kompleks dengan polutan (hidrokarbon dan nitrogen) dan sinar matahari (adanya sinar UV) dapat membentuk radikal hidroksi ($OH^{\cdot}$) dan radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot}$).

b. Nitrogen Oksida (NO)

Nitrogen oksida merupakan oksidator kuat yang dapat menyebabkan peroksidasi lipid. Polutan $NO^{\cdot}$ dapat berasal dari asap rokok dan hasil pembakaran kendaraan bermotor.

c. Sulfur Dioksida (SO_2)

Sulfur dioksida merupakan hasil pembakaran minyak yang mengandung sulfur atau dari pembakaran batu bara.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

d. Peroksida (H_2O_2)

Adanya peroksida akan memacu terjadinya reaksi fenton dan menghasilkan radikal hidroksi (OH˙).

2.5.3 Definisi dan Pengelompokan Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (Packer dan Yoshikawa, 1999).

Secara umum antioksidan dikelompokkan menjadi dua yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis yang secara sinergis meredam radikal bebas didalam tubuh. Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya digolongkan menjadi tiga kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier (Winarsih, 2007).

2.5.3.1 Antioksidan Primer

Antioksidan primer atau antioksidan endogen disebut juga antioksidan enzimatis, yang dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas atau merubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi kurang reaktif (Winarsi, 2007).

Enzim superoksida dismutase, glutation peroksidase dan glutation reduktase menghambat katalisis reaksi radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi) kemudian mengubahnya menjadi lebih stabil atau disebut juga *chain-breaking-antioxidant* (Winarsi, 2007).

2.5.3.2 Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder atau antioksidan eksogen disebut juga antioksidan non-enzimatis. Antioksidan kelompok ini melakukan pertahanan preventif terhadap radikal bebas. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya radikal bebas

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

dihambat dengan cara pengkelatan logam atau dirusak pembentukannya. Antioksidan non-enzimatis juga bekerja dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*). Antioksidan sekunder dapat berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, flavonoid, bilirubin dan albumin (Winarsi, 2007).

2.5.3.3 Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berperan dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya *single* dan *double strand* (Winarsi, 2007).

2.5.4 Jenis-Jenis Antioksidan

Untuk mencegah atau memperlambat oksidasi, antioksidan telah secara luas digunakan dan dikenal ada dua yaitu (Pokorny, Yanishlieva dan Gordon, 2001) :

a. Antioksidan Sintetik

Beberapa dari antioksidan yang populer digunakan adalah komponen fenol seperti *butylated hydroxyanisol* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tersier butylhydroquinone* (TBHQ), dan ester dari asam galat, contohnya propil galat (PG). Antioksidan sintetik telah sepenuhnya diuji reaksi toksisitasnya, tapi beberapa menjadi toksik setelah penggunaan dalam waktu lama, data toksikologi menentukan beberapa peringatan dalam penggunaannya. Dalam hal ini produk alami tampak lebih sehat dan aman daripada antioksidan sintetik.

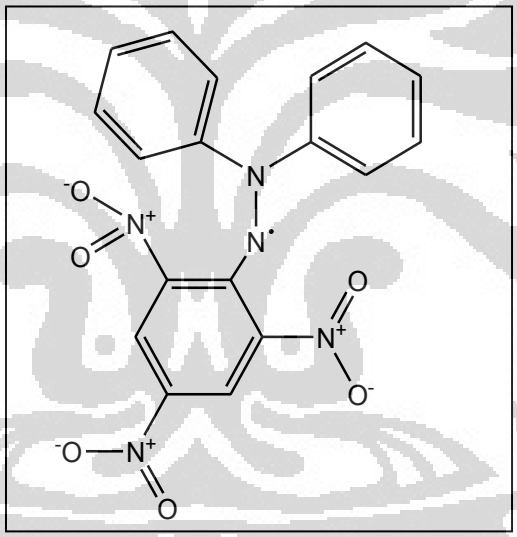
b. Antioksidan Alami

Antioksidan alami ditemukan pada sebagian besar tanaman, mikroorganisme, jamur dan jaringan binatang. Sebagian besar antioksidan alami adalah kelompok fenolik seperti tokoferol, flavonoid, lignin dan asam fenol. Sedangkan antioksidan alami dari golongan nitrogen adalah kafein dan asam amino.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.5.5 Metode Pengujian Antioksidan dengan Peredaman Radikal DPPH

Metode pengujian antioksidan yang paling sering digunakan adalah metode peredaman radikal bebas DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) seperti yang telah dilakukan oleh Blois 1958 dan Brand-William (1995) yang pertama kali melaporkan metode peredaman radikal bebas dengan menggunakan spektrofotometer. Radikal DPPH adalah nitrogen organik stabil dengan inti radikal bebas yang berwarna ungu tua dan warnanya memudar jika direduksi menjadi nonradikal oleh antioksidan (Liangli Yu, 2008). Pengujian peredaman radikal DPPH berdasarkan pengurangan absorbansi pada panjang gelombang 515 nm akibat reduksi antioksidan setelah diinkubasi (waktu reaksi) 15-30 menit. Selanjutnya dihitung nilai IC_{50} berdasarkan peredaman 50% radikal DPPH pada periode waktu tersebut (Pokorny, Yanishlieva dan Gordon, 2001).



[Sumber : Liangli Yu, 2008]

Gambar 2.4 Struktur DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

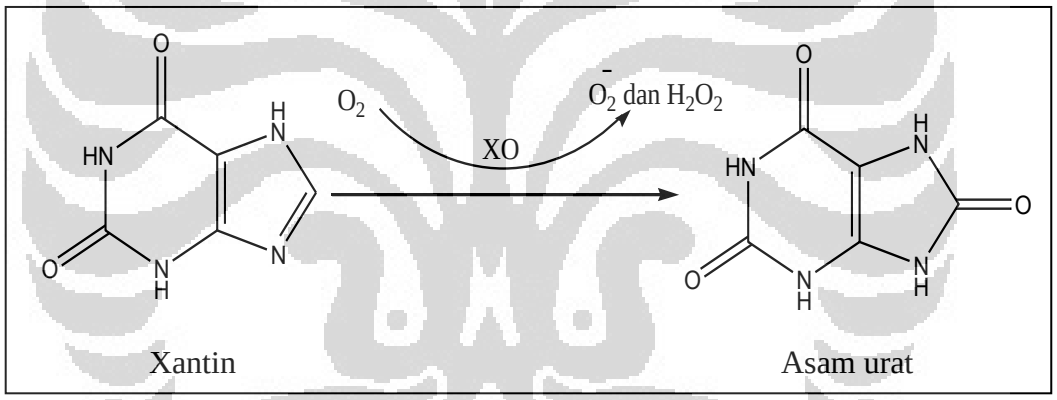
2.6 Enzim Xantin Oksidase

2.6.1 Definisi Enzim dan Xantin Oksidase

Enzim adalah protein yang mengkatalisis reaksi biokimia. Enzim biasanya terdapat dalam konsentrasi yang sangat rendah di dalam sel, dimana mereka meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah posisi kesetimbangan (Ngili, 2010).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Xantin oksidase merupakan kompleks enzim yang terdiri dari molibdoflavo-protein (Ozyurek, Bektasoglu, Guclu dan Apak, 2009). Xantin oksidase (XO) dan xantin dehidrogenase (XHD) adalah bentuk *interconvertibel* pada produk gen yang sama dikenal sebagai xantin oksireduktase (XOR). Xantin oksidase mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat yang dengan mudah menghasilkan radikal superoksida yang mengakibatkan oksidasi pada organisme. Hidroksilasi pada posisi pusat molibdoprotein (Mo-pt) dengan oksigen Mo-OH yang akan membentuk ikatan dengan atom karbon pada substrat. Bentuk aktif xantin oksidase adalah homodimer dengan berat molekul 290 kDa, setiap monomer bereaksi bebas selama katalisis. Setiap sub unit mengandung kofaktor molibdoprotein, 2 pusat berbeda yaitu 2FE-2S, dan 1 kofaktor FAD (Lin, Huang, Cheng, Sheu, Chen, 2006).



[Sumber : Ozyurek, Bektasoglu, Guclu dan Apak, 2009]

Gambar 2.5 Reaksi pembentukan asam urat oleh xantin oksidase

Allopurinol secara klinik digunakan sebagai penghambat xantin oksidase, akan tetapi banyak menimbulkan efek samping seperti syndrom hipersensitivitas, syndrom *steven Johnson* dan toksisitas renal (Umamaheswari, Asokkumar, Sivashammugam dan Kemyaraju, 2009). Beberapa senyawa dari bahan alam seperti xanton, flavonoid, kumarin, polifenol, hidroksikalkon, tanin dan senyawa-senyawa fenol telah dilaporkan memiliki aktivitas inhibisi xantin oksidase (Gonzales, Bazzocchi, Moujir, Ravelo, Correa dan Gupta, 1995; Owen dan Johns, 1999).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Pengujian aktivitas enzim xantin oksidase dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer di bawah kondisi aerob berdasarkan pembentukan asam urat pada panjang gelombang 295 nm dan xantin sebagai substrat (Chang et.al., 2007).

2.6.2 Kinetika Enzim

Kinetika enzim berkaitan dengan pengukuran laju reaksi enzimatik dengan faktor-faktor yang mempengaruhi laju tersebut. Faktor-faktor penting yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik adalah konsentrasi substrat dan enzim, pH, suhu dan adanya kofaktor serta ion logam (Ngili, 2010). Mekanisme regulasi enzim dilakukan melalui kontrol ketersediaan enzim dan kontrol aktivitas enzim. Aktivitas katalitik enzim dipengaruhi oleh struktur sisi aktif tempat enzim dan substrat berikatan. Aktivitas struktur tersebut dapat dilakukan melalui mekanisme penambahan suatu molekul tertentu (efek allosterik) atau dengan modifikasi kovalen seperti fosforilasi dan defosforilasi pada residu asam amino spesifik pada sisi aktif enzim tersebut (Voet, Voet dan Pratt, 2008).

Mekanisme inhibisi dapat berlangsung secara kompetitif, unkompetitif atau nonkompetitif. Pada jenis inhibisi kompetitif, terjadi kompetisi antara substrat dengan inhibitor dalam memperebutkan sisi aktif dari enzim. Reaksi akan terjadi dan produk akan dihasilkan, walaupun enzim bereaksi dengan inhibitor. Produk yang dihasilkan dari inhibitor akan berbeda jenisnya dengan produk yang dihasilkan dari subtrat.

Inhibitor kompetitif, umumnya memiliki struktur yang serupa dengan substrat. Sebagai contoh adalah allopurinol, yang strukturnya hampir sama dengan xantin. Allopurinol dapat berikatan dengan enzim xantin oksidase pada sisi aktifnya membentuk ikatan yang terdiri dari kombinasi ikatan kovalen, elektrostatik, dan ikatan hidrogen. Allopurinol memiliki afinitas puluhan kali lebih kuat terhadap enzim xantin oksidase dibandingkan xantin. Oleh karena itu, apabila dalam lingkungan terdapat inhibitor ini bersama-sama dengan substrat (xantin), maka allopurinol yang akan lebih bereaksi dengan xantin oksidase membentuk produk (oksipurinol) dibandingkan dengan substratnya sendiri, sehingga efek penghambatan pembentukan asam urat dapat berlangsung terus selama masih terdapat allopurinol dalam lingkungan (Voet, Voet dan Pratt, 2008).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Pada jenis inhibisi unkompetitif, inhibitor terikat pada sisi allosterik enzim setelah terbentuk kompleks enzim-substrat. Pada jenis inhibisi ini, inhibitor tidak dapat langsung berikatan dengan enzim dalam keadaan bebas, namun hanya dapat terikat jika telah terbentuk kompleks enzim-substrat. Dalam bentuk kompleks enzim-substrat-inhibitor, enzim akan kehilangan sifat katalisatornya (inaktif) dan produk tidak akan terbentuk. Produk hanya akan terbentuk, jika inhibitor terlepas dari kompleks enzim-substrat-inhibitor. Umumnya, inhibisi unkompetitif terjadi akibat adanya akumulasi produk dari reaksi enzim itu sendiri dan sangat jarang dijumpai pada reaksi enzim yang melibatkan hanya satu substrat dan satu produk (Voet, Voet dan Pratt, 2008).

Pada jenis inhibisi nonkompetitif, antara substrat dan inhibitor tidak terjadi kompetisi dalam memperebutkan sisi aktif enzim. Inhibitor dan substrat tidak memiliki kemiripan struktur. Inhibitor berikatan dengan enzim pada lokasi diluar sisi aktifnya. Efek penghambatan akan terjadi karena inhibitor berikatan dengan sisi allosterik enzim, dan akan mengubah bentuk sisi aktif enzim. Inhibisi nonkompetitif, inhibitor dapat membentuk ikatan dengan enzim dalam keadaan bebasnya disamping dapat membentuk ikatan dengan kompleks enzim-substrat. Ikatan inhibitor terhadap enzim bebas dan kompleks enzim-substrat dapat meyebabkan terbentuknya kompleks enzim-inhibitor dan enzim-substrat-substrat yang bersifat tidak produktif, karena kedua kompleks ini tidak dapat membentuk produk. Produk hanya akan terbentuk jika ikatan inhibitor terlepas dari kompleks enzim-substrat-inhibitor. Penentuan pola kinetika inhibisi enzim dapat ditentukan dengan menggunakan metode Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Dixon, Hanes atau Eddie-Hofstee (Voet, Voet dan Pratt, 2008).

2.7 Hubungan antara Xantin Oksidase dan Antioksidan

Xantin oksidase mengkatalisis oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat menghasilkan radikal superoksida dan menyebabkan meningkatnya oksidatif pada organisme. Pada saat bereaksi dengan xantin untuk membentuk asam urat, atom oksigen ditransfer dari molibdenum ke xantin dan memproduksi ROS yaitu radikal superoksida dan hidrogen peroksida. Mekanisme reaksi yaitu (Cos et al., 1998) :

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

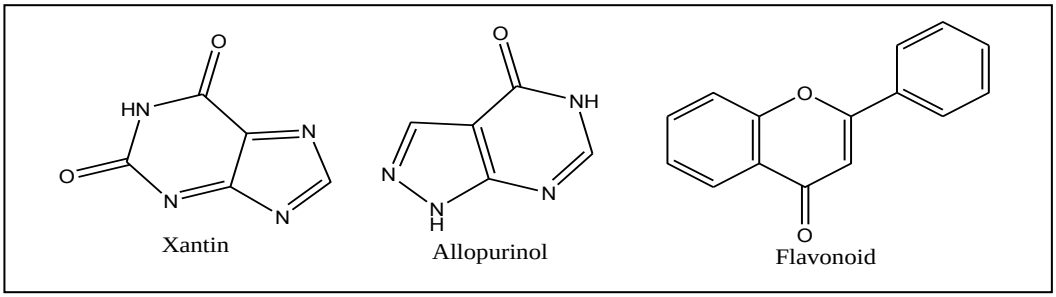
$$\text{Hipoxantin} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{asam urat} + H_2O_2^{\cdot}$$
$$\text{Xantin} + 2O_2 + H_2O \longrightarrow \text{asam urat} + 2O_2^{\cdot} + 2H^{+} \qquad (2.1)$$

Xantin oksidase merupakan sumber terpenting ROS dan menyebabkan hiperurisemia (gout) dan bertanggung jawab terhadap kerusakan oksidatif pada jaringan. Enzim ini mengurangi oksigen molekul, mengarah ke pembentukan anion superoksida dan hidrogen peroksida (Chang, Lee, Chen, Huang, Tsai, Huang dan Lin, 2007). Akibatnya aktivitas enzim xantin oksidase memberikan kontribusi terjadinya stres oksidatif. Sehingga pengurangan aktivitas xantin oksidase bermanfaat untuk mencegah terjadinya stres oksidatif dengan menggunakan inhibitor xantin oksidase seperti senyawa polifenol. Polifenol, mulai dari senyawa sederhana hingga polimerasi tinggi memiliki aktivitas antioksidan pada beberapa cara seperti *ROS-scavenging*, pengkelat logam transisi, penghambatan ROS hasil produksi enzim, dan interaksi dengan antioksidan lainnya (Ozyurek, Bektasoglu, Guclu dan Apak, 2009).

Flavonoid memiliki beberapa efek yaitu sebagai antioksidan, antiviral, antikanker, antiinflamasi, antialergi, anti aterogenesis, dan antitrombosit (Van Hoorn et al., 2002). Cos et al., (1998) juga melaporkan beberapa senyawa flavonoid bersifat antioksidan dan dapat menghambat kerja enzim xantin oksidase. Studi *in-vitro* menunjukkan bahwa beberapa flavonoid terutama letuolin dan apigenin dapat juga bekerja sebagai inhibitor xantin oksidase dengan daya kerja yang hampir sama dengan allopurinol (Cos et al., 1998).

Flavonoid memiliki efek utama sebagai inhibitor xantin oksidase dan aktivitas antioksidan. Oleh karena itu, ada korelasi positif antara inhibitor xantin oksidase dan kadar flavonoid pada ekstrak. Contohnya pada kaemferol dan kuersetin masing memiliki aktivitas inhibisi 85 dan 90% pada konsentrasi 50 µg/mL. Kedua senyawa ini memiliki beberapa gugus fenol, yang menyebabkan bersifat hidrofilik. Jumlah dan posisi gugus gula pada flavonoid juga dapat mengurangi efek inhibisi, karena dapat menyebabkan molekul menjadi besar dan bersifat hidrofilik, hasilnya akan mengurangi kontak antara glikosida flavonoid dengan enzim (Owen dan Johns, 1999).

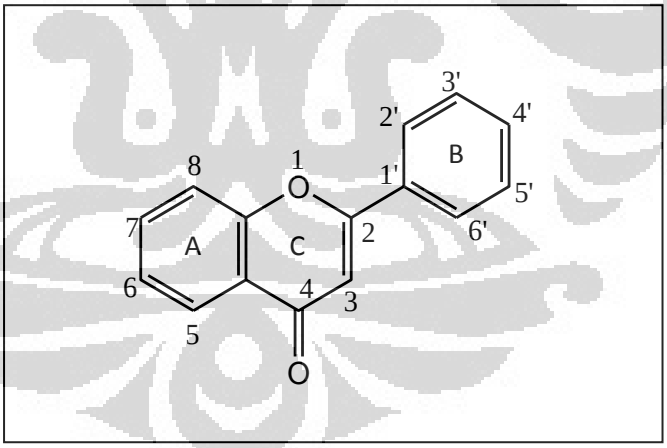
Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012



[Sumber : Cos et al., 1998]

Gambar 2.7 Rumus strukur xantin, allopurinol dan flavonoid

Sebagai salah satu antioksidan, flavonoid memberikan kontribusi mengurangi stres oksidatif melalui penghambatan aktivasi pada regulasi enzim (*key regulating enzyme*), seperti xantin oksidase, fosfolipase, dan nirit oksida sintase. Selain itu flavonoid dapat menghambat pembentukan nitrit peroksida melalui penghambatan induksi nitrit oksida dalam aktivasi makrofag yang dapat mempercepat stres kondisi (Van Hoorn et al., 2002).



[Sumber : Plazonic, Bucar, Males, Mornar, Nigovic, dan Kujundzic, 2009]

Gambar 2.8 Kerangka struktur flavonoid

Gugus hidroksi yang memberikan efek positif pada penghambatan xantin oksidase yaitu dengan urutan menurun pada posisi C5>7>4′=3′. Contohnya pada luteolin, 7-hidroksiflavon, dan 5-hidroksiflavon (Van Hoorn et al., 2002). Gugus hidroksi pada C5 dan C7 dan ikatan rangkap antara C2 dan C3 memiliki aktivitas

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

sebagai inhibitor xantin oksidase. Flavon menunjukkan aktivitas inhibisi lebih tinggi daripada flavonol (Cos et al., 1998). Gugus hidroksi pada posisi C2′, C8 dan C3 memberikan kontribusi negatif pada penghambatan xantin oksidase. Efek negatif disebabkan adanya gangguan ikatan hidrogen pada pusat *allosterik* karena adanya penghalang (Van Hoorn et al., 2002). Sedangkan untuk aktivitas *scavenging* superoksida adanya gugus OH pada posisi C3′ dan C3 pada cincin B memberikan kontribusi positif (Cos et al.,1998).

Menurut Cos et al., (1998) berdasarkan efek terhadap xantin oksidase dan *scavenging* superoksida, flavonoid dikelompokkan kedalam 6 kategori yaitu :

a. Tanpa inhibisi xantin oksidase dan s*cavenging* superoksida
b. Inhibisi xantin oksidase tanpa *scavenging* superoksida
c. Inhibisi xantin oksidase dan *scavenging* superoksida
d. Inhibisi xantin oksidase dan efek pro-oksidan pada produksi superoksida
e. Marginal efek inhibisi xantin oksidase dengan penambahan pro-oksidan pada produksi *scavenging* superoksida
f. Tanpa inhibisi xantin oksidase dan tanpa *scavenging* superoksida.

2.8 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Simplisia yang diekstraksi mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat dan lain-lain (Depkes RI, 2000).

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987). Berdasarkan pada parameter standar ekstrak Indonesia (Depkes RI, 2000), terdapat beberapa cara ekstraksi yaitu :

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.8.1 Ekstraksi dengan menggunakan pelarut

2.8.1.1 Cara dingin

a. Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara dibasahkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, menggunakan 2,5 bagian sampai 5 bagian cairan penyari dimasukkan ke dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Massa dipindahkan sedikit demi sedikit ke dalam perkolator, ditambahkan cairan penyari. Perkolator ditutup dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran dibuka dengan kecepatan 1 mL/menit, sehingga simplisia tetap terendam.

b. Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian ditambahkan cairan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu disaring dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah lima hari lalu endapan dipisahkan.

2.8.1.2 Cara panas

a. Soxhletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai pipa sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

b. Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan dikondensasi dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali ekstraksi selama 4 jam.

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinyu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50^{o} C.

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98^{o} C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama ($\geq$ 30^{o} C) dan temperatur sampai titik didih air.

2.8.2 Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (segar atau simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna dan diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

2.8.3 Cara ekstraksi lainnya

a. Ekstraksi berkesinambungan

Proses ekstraksi yang dilakukan berulangkali dengan pearut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berturutan beberapa kali. Proses ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana maserasi.

b. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variabel tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah, sehingga hampir langsung diperoleh ekstrak.

c. Ekstraksi ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan (cavitation) sebagai stres dinamika serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ekstraksi.

d. Ekstraksi energi listrik

Energi listrik digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta "*electric-discharges*" yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan untrasonik.

2.9 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Teknik

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

kromatografi yang sering digunakan yaitu kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, kromatografi kertas dan kromatografi gas. Sebagai adsorban selain kertas digunakan juga zat penjerap berpori misalnya aluminium oksida, silika gel, sephadex dan selulosa. Kromatografi kertas dan kromatografi lapis tipis umumnya digunakan untuk identifikasi, karena cara ini khas dan mudah dilakukan untuk senyawa yang mudah menguap dan untuk identifikasi dan penetapan kadar, sedangkan kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih banyak (Harborne, 1987). Jenis kromatografi lainnya adalah sebagai berikut :

2.9.1 *Size Exclusion Chromatography*

Size exclusion chromatography, atau yang dikenal juga dengan *gel permeation* atau *filtration chromatography* biasa digunakan untuk memisahkan dan memurnikan protein. Metode ini tidak melibatkan berbagai macam penyerapan dan sangat cepat. Perangkat kromatografi berupa gel berpori yang dapat memisahkan molekul besar dan molekul kecil. Molekul besar akan terelusi terlebih dahulu karena molekul tersebut tidak dapat berpenetrasi pada pori-pori (Carrier, Bordanaro, dan Yip, 1997).

2.9.2 Kromatografi Gas

Kromatografi gas digunakan untuk pemisahan komponen-komponen yang dapat menguap pada suhu hingga 400^{o}C dengan menggunakan gas sebagai fase gerak. Fase diam dapat berupa zat padat atau atau zat cair. Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Hargreaves, 2010).

2.9.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kelebihan kromatografi lapis tipis (KLT) diantaranya keserbagunaan, kecepatan dan kepekatan. Keserbagunaan KLT karena dapat menggunakan penjerap selulosa, atau penjerap lainnnya. Silika gel merupakan penjerap yang paling sering digunakan, beberapa penjerap yang dapat juga digunakan seperti aluminium oksida, celite, kalsium hidroksida, dammar penukar ion, magnesium fosfat, poliamida, sephadex, pilivinil pirolidon, selulosa, dan dapat juga dengan

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

menggunkan dua atau lebih bahan penjerap tersebut. Kecepatan KLT disebebkan oleh sifat penjerap yang lebih padat jika disaputkan pada pelat, dan akan lebih baik untuk senyawa yang tidak stabil. Kepakatan KLT yaitu dapat digunakan untuk jumlah sampel yang sedikit atau dala ukuran mikro (Harborne, 1987).

2.9.4 Kromatogafi Kolom

Salah satu metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar adalah menggunakan kromatografi kolom. Pada kromatografi kolom fasa diam yang digunakan dapat berupa silika gel, selulose, sephadex atau poliamida. Sedangkan fasa geraknya dapat dimulai dari pelarut non polar kemudian ditingkatkan kepolarannya secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal ataupun kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai tingkat kepolaran yang dibutuhkan (Stahl, 1969).

2.10 Spektroskopi

Spektroskopi adalah suatu studi mengenai interaksi antara energi cahaya dengan materi. Identifikasi dapat dilakukan jika telah didapatkan senyawa murni yang telah diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis dan kristalisasi. Identifikasi dilakukan dengan analisis data spektroskopi. Warna yang tampak adalah akibat adsorbsi energi cahaya oleh senyawa organik maupun anorganik. Panjang gelombang pada suatu senyawa tergantung dari struktur senyawa tersebut, maka teknik-teknik spektroskopi dapat digunakan untuk menentukan adanya struktur senyawa yang belum diketahui dan mempelajari karakteristik suatu senyawa (Silverstein, Webster, dan Kiemble, 2005).

2.10.1 Spektrofotometri Ultraviolet

Penyerapan sinar ultraviolet (ultra lembayung) dan tampak oleh suatu molekul organik akan menghasilkan transisi diantara tingkat energi elektronik pada molekul tersebut, dan karenanya sering disebut spektrometri elektronik (Supratman, 2010). Molekul menyerap energi dalam ultraviolet dan spektrum sinar tampak bergantung pada struktur elektronik dari molekul. Energi serapan

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

menghasilkan elevasi elektron dari orbital dasar ke orbital energi lebih tinggi di kedudukan tereksitasi. Spektrofotometer ultraviolet akan memberikan informasi yang berguna pada sistem terkonjugasi (Kosela, 2010).

2.10.2 Spektrofotometri Infra Merah

Spektrum infra merah suatu molekul adalah hasil transisi antara tingkat energi getaran (vibrasi) yang berlainan. Inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi (*oscillation*) (Supratman, 2010).

Kebanyakan energi vibrasi dari suatu molekul sesuai dengan daerah infra merah dari spektrum elektromagnetik. Vibrasi molekul dapat ditera atau diukur dengan spektrofotometer Rahman. Vibrasi yang informatif dan diperlukan yaitu di daerah frekuensi tinggi 4000 cm^{-1} hingga frekuensi rendah 400 cm^{-1} atau 2,5–25 µ. Besarnya frekuensi bergantung pada kekuatan ikatan dan massa atom yang berikatan. Ikatan rangkap tiga lebih besar kekuatannya dibandingkan ikatan rangkap dua, dan ikatan rangkap dua lebih besar kekuatannya dibandingkan ikatan tunggal (Kosela, 2010). Spektrometri infra merah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul (Supratman, 2010).

2.10.3 Spektroskopi Massa

Spektroskopi massa adalah suatu instrumen yang dapat menyeleksi molekul-molekul gas bermuatan berdasarkan massa atau beratnya. Teknik ini tidak dapat dilakukan dengan spekstroskopi, akan tetapi nama spektroskopi dipilih disebabkan persamaannya dengan pencatat fotografi dan spektrum garis optik. Umumnya spektrum massa diperoleh dengan mengubah senyawa suatu sampel menjadi ion-ion yang bergerak cepat yang dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan. Proses ionisasi menghasilkan partikel-partikel bermuatan positif, dimana massa terdistribusi adalah spesifik terhadap senyawa induk (Silverstein, Webster, dan Kiemble, 2005) .

Secara umum cara yang terbaik untuk memulai elusidasi struktur adalah dengan menentukan ion molekul (M^+) pada spektra massa, yang dapat memberikan informasi tentang berat molekul umumnya adalah M^+. Selanjutnya setelah menentukan rumus molekul (CxHyOzX) ditentukan jumlah ikatan rangkap

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

(derajat ketidakjenuhan) dalam molekul untuk menentukan derajat kompleksitas molekul (kerangka molekul), apakah rantai lurus, siklik atau lainnya (Supratman, 2010). Lazimnya semua senyawa organik mempunyai berat molekul genap bila tidak mengandung nitrogen atau mengandung sejumlah atom nitrogen yang genap, sedang semua senyawa organik dengan berat molekul ganjil mengandung jumlah atom nitrogen ganjil. Aturan ini berlaku untuk senyawa-senyawa kovalen yang mengandung C, H, O, S, dan Halogen. Pola fragmen dipergunakan untuk mengidentifikasi senyawa, juga memungkinkan terdapat pengenalan gugus fungsi dengan melihat fragmentasi spesifik (Silverstein, Webster, dan Kiemble, 2005).

2.10.4 Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) atau Resonansi Magnet Inti (RMI) berhubungan dengan sifat magnetik dari inti atom. Spektroskopi NMR didasarkan pada penerapan gelombang radio oleh inti tertentu dalam molekul organik, bila molekul ini berada dalam magnet yang sangat kuat dan homogen. Spektroskopi NMR memberikan gambaran perbedaan sifat magnet dari berbagai inti dan untuk menduga letak inti dalam molekul. Dari spektra resonansi magnet inti proton (^{1}HNMR) akan diperoleh informasi tentang jenis hidrogen, jumlah hidrogen dan lingkungan hidrogen dalam suatu senyawa begitu halnya dengan spektra resonansi magnet inti karbon (^{13}CNMR) (Supratman, 2010).

Pergeseran kimia ^{13}CNMR dapat dibagi yaitu pergeseran kimia karbon sp3 bila tidak ada atom elektronegatif maka pergeseran kimianya antar 0-60 ppm, karbon sp2 (100-160 ppm), karbonil antara 160-230 ppm, karbon sp (63-95 ppm), efek konjugasi (mengakibatkan penurunan pergeseran kimia) (Kosela, 2010).

Perbandingan antar letak resonansi suatu proton atau karbon tertentu dengan letak resonansi proton atau karbon standar disebut pergeseran kimia (*chemical shift*) dari proton atau karbon tersebut dan diberi simbol delta (δ). Faktor-faktor yang mempengaruhi pergeseran kimia yaitu (Supratman, 2010):

2.10.4.1 Faktor Intramolekular

a. Efek Induksi

Rapatan elektron suatu ikatan kovalen karbon-hidrogen dipengaruhi oleh elektronegatifitas atom-atom lain yang terikat pada karbon itu. Karena karbon

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

mempunyai muatan positif parsial, maka elektron-elektron dalam tiap ikatan sigma C-H akan tertarik ke arah karbon dan menjauhi atom hidrogen.

b. Senyawa Aromatik

Pada senyawa aromatik elektron terdelokalisasi di seputar cincin aromatik. Putaran elektron dengan adanya medan magnet menghasilkan arus yang kuat yang disebut arus cincin. Proton disekitar tepi cincin mengalami medan magnet yang lebih besar sehingga proton mengalami resonansi pada pergeseran kimia yang lebih besar.

c. Senyawa Karbonil

Proton aldehid tergeser ke medan lemah oleh efek anisotropik maupun efek induski sehingga proton menghasilkan serapan yang lemah dan karbon mengalami resonansi.

2.10.4.2 Faktor Intermolekular

a. Ikatan Hidrogen

Adanya ikatan hidrogen akan mempengaruhi pergeseran proton pada suatu gugus fungsi yang terikat oleh ikatan hidrogen seperti O-H, N-H dan S-H.

b. Temperatur

Posisi resonansi proton yang terikat pada karbon (C-H) sedikit terpengaruh dengan temperatur, tetapi proton O-H, N-H, dan S-H yang terikat oleh ikatan hidrogen akan mengalami pergeseran ke medan kuat dengan kenaikan temperatur hal ini diakibatkan oleh putusnya ikatan hidrogen.

c. Pelarut

Pelarut yang terikat pada karbon (C-H) sedikit terpengaruh oleh pergeseran kimia (± 0,1 ppm) dengan perubahan pelarut dari CCl_4 ke $CDCl_3$.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Januari 2011 – Mei 2012, di Laboratorium Fitokimia, Departemen Farmasi, Universitas Indonesia, Depok dan di Laboratorium Badan Narkotika Nasional, Jakarta.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat penggiling, alat-alat gelas, bejana maserasi, *freezer* (Sanyo, Jepang), peralatan kromatografi kolom, peralatan kromatografi lapis tipis, pH meter (Eutech Instrumen pH 510, Amerika Serikat), penguap putar (*rotary vacuum evaporator*) (Buchi, Jerman), pipet mikro 100-1000 µL (Eppendorf, Amerika Serikat) dan 10-100 µL (Thermo, Amerika Serikat), spektrofotometer UV-Vis (PG-Instrument Ltd, Inggris), spektrofotometer infra merah (Shimadzu, Jepang), spektrometer resonansi magnetik inti (Jeol, Jepang), Sonikator (Elmasonic 60, Amerika Serikat), spektrometer GC-MS (Shimadzu, Jepang), timbangan analitik (And, Jepang), timbangan mikro (Sartorius, Jerman), *melting point* (Struart Scientific, Inggris), *vortex mixer* (Health, Jepang), penangas air (Imperial IV, Amerika Serikat).

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Uji

Bagian tanaman yang diteliti adalah daun *R. tuberosa* L. diperoleh dari hutan kampus Universitas Indonesia, Depok dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

3.2.2.2 Bahan Kimia

Air suling demineral (Brataco Chemika, Indonesia), aseton teknis (Brataco Chemika, Indonesia), allopurinol (Pyridam Farma, Indonesia), asam klorida

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

(Merck, Jerman), asam oksalat (Merck, Jerman), asam borat (Merck, Jerman), asam asetat glasial (Merck, Jerman), aluminium korida (Merck, Jerman), bismut nitrat (Merck, Jerman), benzen (Merck, Jerman), dikorometana teknis (Brataco, Indonesia), dimetil sulfoksida p.a (Merck, Jerman), DPPH (Wako, Jepang), gelatin, enzim xantin oksidase (Sigma Aldrich, Singapura), etil asetat teknis (Brataco, Indonesia), metanol p.a (Merck, Jerman), metanol teknis (Brataco Chemika, Indonesia), NaCl (Merck, Jerman), *n*-butanol teknis (Brataco Chemika, Indonesia), *n*-butanol p.a (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Merck, Jerman), *n*-heksana teknis (Brataco Chemika, Indonesia), pelat KLT silika gel 60 F_{245} (Merck, Jerman), kalium dihidrogen fosfat (Analar, Inggris), kalium yodida (Merck, Jerman), kalium bromida (Merck, Jerman), raksa (II) klorida (Merck, Jerman), silika gel G 60 (0,063-0,200 mm) (Merck, Jerman), sephadex LH-20 (Amersham Bioscience, Swedia), substrat xantin (Sigma Aldrich, Singapura), serbuk seng (Merck, Jerman), serbuk magnesium (Merck, Jerman).

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Penyiapan Simplisia

Daun pletekan (*R. tuberosa* L.) yang telah dikumpulkan, disortasi untuk menghilangkan kotoran yang melekat pada daun. Kemudian dikeringkan di lemari pengering selama 5 hari. Daun *R. tuberosa* L. yang sudah kering disortasi kering untuk menghilangkan pengotor yang masih tertinggal pada daun. Simplisia yang telah disortasi kemudian dihaluskan menggunakan penggiling simplisia. Serbuk simplisia disimpan dalam wadah botol dan siap untuk diekstraksi.

3.3.2 Ekstraksi Daun *R. tuberosa* L

Serbuk daun *R. tuberosa* L. sebanyak 2500 mg diekstraksi dengan metode maserasi. Lima buah bejana maserasi masing-masing diisi 500 mg serbuk daun *R. tuberosa* L. ditambahkan diklorometana 1500 mL hingga merendam serbuk, dan dikocok selama 6 jam, didiamkan selama 18 jam. Cairan penyari dipisahkan dari ampas dan disimpan dalam wadah penampung. Ampas diekstraksi kembali dengan penambahan 1000 mL diklorometana dengan cara yang sama. Dilakukan pengulangan remaserasi sebanyak 5 kali, dengan jumlah pelarut diklorometana

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

yang digunakan sebanyak 7 L. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 50^{o} C.

Ekstraksi dilanjutkan menggunakan pelarut metanol. Masing-masing bejana ditambahkan 1000 mL metanol, dikocok selama 6 jam, didiamkan selama 18 jam. Kemudian ampas dipisahkan dengan cairan penyari. Ampas diekstraksi kembali dengan cara yang sama. Dilakukan remaserasi sebanyak 15 kali dengan jumlah pelarut metanol yang digunakan sebanyak 15 L. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 50^{o} C.

3.3.3 Partisi Ekstrak Daun *R. tuberosa* L

Ekstrak kental metanol sebanyak 400 g dipartisi. Sebanyak 30 g ekstrak metanol dilarutkan dalam 100 mL air suling, kemudian ditambahkan 100 mL etil asetat, dikocok dan didiamkan selama 12 jam. Lapisan air dipisahkan dan lapisan etil asetat ditampung. Lapisan air ditambahkan kembali 100 mL etil asetat, dikocok dan didiamkan selama 12 jam, lapisan air dipisahkan. Proses ini diulangi lagi hingga 5 kali dan jumlah pelarut etil asetat yang digunakan sebanyak 5 L. Lapisan ekstrak etil asetat yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 50^{o} C.

Partisi dilanjutkan dengan menambah 100 mL *n*-butanol pada lapisan air, dikocok dan dibiarkan selama 12 jam. Lapisan air dipisahkan dan lapisan *n*-butanol ditampung. Lapisan air ditambahkan 100 mL *n*-butanol, dikocok dan didiamkan selama 12 jam. Proses ini diulangi hingga 8 kali. Jumlah pelarut *n*-butanol yang digunakan sebanyak 7 L. Lapisan ekstrak *n*-butanol yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu 50^{o} C.

3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak daun *R. tuberosa* L. (ekstrak diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol, air) diuji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH yang merujuk pada prosedur Brand-William (1995) dengan beberapa modifikasi. Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.4.1 Uji Pendahuluan Antioksidan

a. Uji Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan menotolkan masing-masing ekstrak pada pelat KLT, kemudian disemprot dengan larutan DPPH.

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum yaitu larutan DPPH yang telah dibuat dengan konsentrasi 35 µg/mL ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 hingga 700 nm.

3.3.4.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *R. tuberosa L.*

Ekstrak (diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol, air) ditimbang masing-masing sebanyak 10,0 mg dan dilarutkan dalam 100,0 mL metanol p.a, dibuat seri konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40 dan 50 µg/mL. Larutan uji ekstrak dipipet 0,1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 3,9 mL DPPH 35 µg/mL, dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

3.3.4.3 Pengujian Antioksidan Standar

Standar kuersetin dan butilated hidroksitoluen (BHT) masing-masing ditimbang 10,0 mg dan dilarutkan dalam 10,0 mL metanol p.a, selanjutnya dibuat larutan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/mL. Larutan uji standar dipipet 0,1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 3,9 mL DPPH 35 µg/mL, dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

3.3.4.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan Isolat

Senyawa isolat yang diperoleh diuji aktivitas antioksidan. Masing-masing isolat ditimbang sebanyak 5,0 mg, kemudian dilarutkan dalam 5,0 mL

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

metanol p.a. Dibuat larutan seri konsentrasi yaitu 10, 25, 50, 75, dan 100 µg/mL. Larutan uji dipipet 0,1 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 3,9 mL DPPH 35 µg/mL, dikocok hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

3.3.4.5 Perhitungan Nilai IC_{50} Antioksidan

Nilai IC_{50} dihitung berdasarkan presentasi inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus :

% inhibisi = (Abs. blanko – Abs. sampel/ Abs. blanko) x 100% (3.1)

Setelah didapatkan presentasi inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan y = a + bx dengan perhitungan secara regresi linear dimana x adalah konsentrasi (µg/mL) dan y adalah presentasi inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50.

3.3.5 Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Xantin Oksidase

Pengujian penghambatan enzim xantin oksidase dilakukan pada semua ekstrak yaitu ekstrak diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol dan air. Prosedur penelitian merujuk pada Owen dan Johns, (1999) dan Umamaheswari, Asokkumar, Sivashammugam dan Kemyaraju, (2009).

3.3.5.1 Uji Pendahuluan

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Berdasarkan pada prosedur Sigma Aldrich (1994), maka untuk penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada pH 7,5 dan suhu 25^{o}C dengan konsentrasi substrat 0,15 mM.

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin dengan

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

konsentrasi 0,15 mM kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 25^{o}C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi pada suhu 25^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi segera ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk memperoleh panjang gelombang maksimum pengukuran. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 284 nm dan digunakan pada pengukuran selanjutnya.

b. Penentuan Konsentrasi Substrat Xantin

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,10; 0,15; 0,020 dan 0,25 mM kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 25^{o}C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi pada 25^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai segera ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

c. Optimasi Suhu

Larutan dapar fosfat 0,05 M pH 7,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin dengan konsentrasi 0,15 mM kemudian dilakukan prainkubasi masing-masing pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40^{o}C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai segera ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

d. Optimasi pH

Larutan dapar fosfat (pH 7,5; 7,8; 8,0; 8,3; dan 8,5) masing-masing sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin konsentrasi 0,15 mM dan dilakukan prainkubasi pada 30^{o}C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan xantin oksidase ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Campuran diinkubasi pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi segera ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm.

e. Perhitungan Aktivitas Enzim Xantin Oksidase

Kondisi optimum dapat ditentukan dengan menentukan aktivitas enzim yang dihitung dengan menggunakan :

$$\text{Aktivitas} = \frac{(\text{Serapan blangko} - \text{serapan kontrol blangko}) \times \text{vol} \times \text{df}}{12{,}2 \times 0{,}1} \qquad (3.2)$$

Keterangan vol : Total volume saat pengujian
df : faktor pengenceran
12,2 : Koefisien asam urat (mM)
0,1 : Volume xantin oksidase yang digunakan

Satu unit xantin oksidase akan mengkonversi 1,0 µmol xantin menjadi asam urat per menit (Sigma Aldrich, 1994).

3.3.5.2 Pembuatan Larutan

a. Pembuatan Larutan Substrat Xantin

Sebanyak 15,21 mg xantin ditimbang dan ditambahkan dengan lima tetes NaOH 1 M hingga larut, setelah itu diencerkan dengan air suling demineral bebas karbondioksida sampai dengan 100,0 mL (konsentrasi 1 mM). Larutan xantin dibuat dengan mengencerkan larutan induk sampai diperoleh larutan xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,; 0,15; 0,2 dan 0,25 mM.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

b. Pembuatan Larutan Enzim Xantin Oksidase 0,1 unit/mL

Perhitungan yang diperoleh dari keterangan pada label kemasan xantin oksidase diperoleh : 1,0 mg protein ~ 7,27 mg *solid* ~ 0,8 unit. Konsentrasi larutan enzim yang dibuat adalah 0,1 unit/mL. Ditimbang 9,09 mg xantin oksidase dilarutkan dengan dapar fosfat hingga 10,0 mL.

3.3.5.3 Pengujian Penghambatan Enzim Xantin Oksidase

a. Blangko

Sebanyak 3,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL larutan xantin oksidase 0,1 U/mL dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Larutan campuran diinkubasi pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

b. Kontrol Blangko

Dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 sebanyak 4,0 mL, ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM. Larutan dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit, kemudian ditambahkan larutan HCl 1 N. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

c. Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.

Ekstrak *R. tuberosa* L. (diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol dan air) konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 5; 10 µg/mL diukur aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase. Larutan uji sebanyak 1,0 mL ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin. Setelah dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, diukur

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

d. Kontrol Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.

Larutan uji ekstrak (konsentrasi 0,1; 0,5; 1; 5; 10 µg/mL) masing-masing sebanyak 1,0 mL ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM. Larutan dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan HCl 1 N. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

e. Standar Allopurinol

Larutan standar allopurinol sebanyak 1,0 mL (konsentrasi 0,1 ; 0,25 ; 0,5 dan 1 µg/mL) ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM, dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit. Setelah prainkubasi selesai 0,1 mL larutan enzim xantin oksidase 0,1 U/mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi dan dihomogenkan menggunakan *vortex mixer*. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

f. Kontrol Standar Allopurinol

Larutan standar allopurinol sebanyak 1,0 mL (konsentrasi 0,1 ; 0,25 ; 0,5 dan 1 µg/mL) ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit pada suhu 30^{o}C, kemudian ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm. Pengujian dilakukan sebanyak 2 kali.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

g. Senyawa Isolat

Isolat yang diperoleh diuji penghambatan enzim xantin oksidase, ditimbang masing-masing sebanyak 5,0 mg dan dilarutkan dalam 5,0 mL air suling demineral bebas karbondioksida (100 µg/mL), kemudian dibuat seri konsentrasi yaitu 0,1; 0,5; 1; 5; 10 µg/mL. Larutan uji sebanyak 1,0 mL ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin. Setelah dilakukan prainkubasi pada suhu 30^{o}C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim 0,1 U/mL. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

h. Kontrol Senyawa Isolat

Larutan uji senyawa murni sebanyak 1,0 mL (konsentrasi 0,1 ; 0,25 ; 0,5 dan 1 µg/mL) ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat 0,05 M pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM. Larutan dilakukan prainkubasi selama 10 menit pada suhu 30^{o}C, kemudian ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N. Larutan campuran diinkubasikan pada suhu 30^{o}C selama 30 menit. Setelah inkubasi selesai, larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 284 nm.

Tabel 3.1 Reagen dan volume pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase

Reagen	Volume			
	Blanko (A_1)	Kontrol Blanko (A_2)	Sampel (B_1)	Kontrol Sampel (B_2)
Sampel ekstrak(inhibitor)	-	-	1 mL	1mL
Dapar fosfat pH 7,8	3,9 mL	4,0 mL	2,9 mL	3,0 mL
Substrat xantin 0,15 mM	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Pra inkubasi suhu 30^{o}C			10 menit	
Enzim	0,1 mL	-	0,1 mL	-
HCl 1 N	-	1,0 mL	-	1,0 mL
Inkubasi suhu 30^{o}C			30 menit	
HCl 1 N	1,0 mL	-	1,0 mL	-
Serapan diukur menggunakan spektrofotometer λ 284 nm				

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.5.4 Perhitungan Nilai IC_{50} Penghambatan Enzim Xantin Oksidase

Perhitungan aktivitas penghambatan xantin oksidase dapat dihitung dengan rumus :

% Inhibisi = (1-B/A) x 100% (3.3)

Dimana A : Perubahan absorbansi larutan uji blangko
(Blangko – kontrol blangko)

B : Perubahan absorbansi larutan uji dengan ekstrak
(Sampel – kontrol sampel)

Nilai IC50 dihitung menggunakan rumus persamaan regresi untuk menentukan y = a + bx. Aktivitas inhibisi dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% (IC_{50}) yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat kerja enzim xantin oksidase sebanyak 50%. Nilai IC_{50} didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50.

3.3.5.5 Kinetika Enzim

Uji kinetika dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi xantin sebagai substrat yaitu 0,01; 0,1; 0,15; 0,20 dan 0,25 mM. Kinetika penghambatan enzim dilakukan pada senyawa murni. Jenis inhibisi ditentukan dengan analisis data menggunakan metode Lineweaver-Burk untuk memperoleh tetapan kinetika Michaelis-Menten. Tetapan kinetika Michaelis-Menten (Km) dihitung berdasarkan persamaan regresi y = a + b x, dimana x adalah konsentrasi subtrat [S] dan y adalah absorbansi sampel (Murray, Granner, Mayes dan Rodwell, 2003).

3.3.6 Penapisan Fitokimia

3.3.6.1 Saponin (Departemen Kesehatan, 1995)

Sebanyak 0,5 g ekstrak, dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Positif mengandung saponin jika terbentuk buih setinggi 1–10 cm dan dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.6.2 Flavonoid (Departemen Kesehatan, 1995)

Larutan uji : 1 g ekstrak ditambahkan 10 mL metanol dan 5 mL petroleum eter, dikocok dan didiamkan. Diambil lapisan metanol, diuapkan pada suhu 40^{o} C. Sisa larutan ditambahkan 5 mL etil asetat P, disaring. Percobaan dilakukan sebagai berikut :

a. Larutan uji sebanyak 1 mL diuapkan hingga kering, sisanya dilarutkan dalam 1-2 mL etanol (95%) P, ditambahkan 0,5 g serbuk seng P dan 2 mL asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit. Ditambahkan 10 tetes asam klorida pekat. Jika terbentuk warnah merah intensif menunjukkan adanya flavanoid (glikosida-3-flavonol).
b. Larutan uji sebanyak 1 mL diuapkan, sisa dilarutkan dalam 1 mL etanol (95%) P, ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium P dan 10 tetes asam klorida P. Jika terjadi warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan adanya flavanoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.
c. Diuapkan hingga kering 1 mL larutan uji, sisa dibasahkan dengan aseton P, ditambahkan sedikit serbuk asam borat P dan serbuk asam oksalat P, dipanaskan. Sisa dicampur dengan 10 mL eter P. Diamati dibawah sinar UV 366 nm, jika larutan berflurosensi kuning intensif menunjukkan adanya flavanoid.

3.3.6.3 Alkaloid (Departemen Kesehatan, 1995)

Larutan uji : 1 g ekstrak ditambahkan 1 mL asam klorida 2 N dan 9 mL air, dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Percobaan dilakukan sebagai berikut :

a. Larutan uji ditambahkan Bauchardat LP, jika terbentuk endapan coklat sampai hitam maka positif mengandung alkaloid.
b. Larutan uji ditambahkan Mayer LP, jika terbentuk endapan putih sampai kuning maka mengandung alkaloid.
c. Larutan uji ditambahkan 2 tetes Dragendorff LP, positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan jingga coklat.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.6.4 Glikosida (Depkes RI, 1995)

Larutan uji : Sebanyak 1 g ekstrak disari dengan 30 mL pelarut campuran (7 bagian etanol 95% P dan 3 bagian air) selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Pada 20 mL filtrat ditambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok, didiamkan dan disaring. Filtrat disari 3 kali dengan menggunakan larutan campuran (3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol P). Filtrat ditambahkan natrium sulfat anhidrat P, disaring dan diuapkan pada suhu 50^{o} C. Sisa ditambahkan 2 mL metanol P. Percobaan :

a. Diuapkan 0,1 mL larutan uji, sisa ditambahkan 5 mL asam asetat anhidrat P. Ditambahkan 10 tetes asam sulfat P, terjadi warna biru atau hijau, menunjukkan adanya glikosida (reaksi Liebermann-Burchard).
b. Sebanyak 0,1 mL larutan uji dalam tabung reaksi diuapkan. Sisa ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes Molish LP. Ditambahkan 2 mL asam sulfat P. Terbentuk cincin warna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya ikatan gula (reaksi Molish).

3.3.6.5 Terpen (Farnsworth, 1966)

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan 5 mL larutan eter, disaring. Filtrat ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Warna merah, hijau atau biru menunjukkan positif terpen.

3.3.6.6 Antrakuinon (Departemen Kesehatan, 1995 dan Farnsworth, 1966)

Ekstrak sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan asam sulfat 2 N. Larutan dipanaskan sebentar kemudian didinginkan. Larutan ditambahkan 10 ml benzen P, dikocok dan didiamkan. Lapisan benzen dipisahkan, disaring. Filtrat berwarna kuning menunjukkan adanya antrakuinon. Dikocok lapisan benzen dengan 1–2 mL natrium hidroksida 2 N, didiamkan, lapisan air berwarna merah intensif dan lapisan benzen tidak berwarna.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.6.7 Tanin (Farnsworth, 1966; Trease & Evans, 1978)

Larutan uji : Ekstrak sebanyak 1 g ditambah 15 ml air panas. Larutan dipanaskan hingga mendidih selama 5 menit, disaring. Percobaan dilakukan sebagai berikut :

a. Filtrat sebanyak 5 mL ditambah beberapa tetes $FeCl_3$ 1 %, menghasilkan warna hijau violet.
b. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan gelatin 10% membentuk endapan putih.
c. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) membentuk endapan putih.

3.3.7 Kolom Kromatografi

Ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat enzim xantin oksidase yang paling baik kemudian dikolom kromatografi. Sebanyak 50 g ekstrak *n*-butanol dikolom kromatografi menggunakan fase diam Sephadex LH-20 sebanyak 500 g, dan fase gerak metanol:air (50:50), eluat ditampung setiap 10 mL, dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 200, 250, 275, 300 dan 350 nm untuk pengelompokan fraksi. Hasil kromatografi kolom diperoleh 490 fraksi yang selanjutnya digabung berdasarkan profil serapan spektrofotometer UV-Vis sehingga diperoleh 6 fraksi (I-VI). Pada fraksi gabungan F-III terdapat serbuk kuning, kemudian dimurnikan dengan pelarut metanol dan diperoleh serbuk putih kekuningan.

Selanjutnya fraksi F-I di kolom kromatografi kembali menggunakan fase diam silika gel G 60 dan fase gerak isokratik metanol:kloroform (3:1). Hasil kromatografi kolom diperoleh 32 fraksi, selanjutnya digabungkan berdasarkan kesamaan nilai Rf pada KLT dan diperoleh 4 (A-D) fraksi gabungan. Pada fraksi B terdapat kristal jarum, kemudian dimurnikan dan direksristalisasi menggunakan pelarut metanol sehingga diperoleh kristal jarum.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

3.3.8 Identifikasi Isolat

Senyawa diidentifikasi dengan menganalisis data spektroskopi dari spektrofotometri UV-Vis, IR, MS, spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* proton (^{1}H-NMR) dan karbon (^{13}C-NMR) serta teknik NMR-2D yang meliputi HMBC, DEPT, H-H COSY, dan C-H COSY.

3.3.8.1 Pemeriksaan Spektrum UV-Vis

Pemeriksaan dilakukan dengan alat spektrometer UV-Vis yaitu dengan melarutkan isolat 1 dan isolat 2 masing-masing 10 mg sampel dalam metanol p.a sampai 10 mL. Kemudian dimasukkan kedalam kuvet, diukur serapannya pada panjang gelombang 200 hingga 700 nm.

3.3.8.2 Pemeriksaan Spektrum Infra Merah (IR)

Isolat 1 dan isolat 2 masing-masing sejumlah 1 mg digerus dengan 100 mg KBr hingga homogen. Campuran dikempa dengan kekuatan 10 ton/cm^3 sehingga terbentuk sebuah pelet yang tipis, kemudian diukur serapan infra merahnya.

3.3.8.3 Pemeriksaan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Isolat 1 sebanyak 10 mg dilarutkan dalam DMSO dan isolat 2 sebanyak 10 mg dilarutkan dalam D_2O, masing-masing dimasukkan ke dalam tabung kaca yang diletakkan ditengah tangki medan magnet yang berisi gas helium dan disekat dengan nitrogen cair. Dari hasil pengolahan data akan diperoleh spektrum spektrum resonansi magnetik inti proton (^{1}H-NMR), karbon (^{13}C-NMR), teknik NMR-2D yang meliputi H-H COSY, dan C-H COSY, HMBC dan DEPT.

3.3.8.4 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan GC-MS

Masing-masing sebanyak 5 mg senyawa isolat 1 dan isolat 2 ditimbang dan dilarutkan dalam metanol. Diambil 10 µL sampel dan disuntikkan pada GC-MS melalui kolom Heliflex AT-5 ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm kecepatan alir 0,5 mL/menit.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

BAB 4
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Sampel Daun *R. tuberosa* L.

Bagian tanaman yang digunakan adalah daun pletekan (*R. tuberosa* L.) dan telah dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, LIPI (Lampiran 9). Tanaman *R. tuberosa* L. yang telah dikumpulkan, daunnya dipisahkan, kemudian disortasi untuk membersihkan dari kotoran. Daun *R. tuberosa* L. dikeringkan di dalam lemari pengering selama 5 hari. Selanjutnya diserbukkan menggunakan penggiling simplisia, yang bertujuan untuk memperkecil ukuran dan memperluas permukaan simplisia sehingga dapat menyari komponen kimia lebih banyak (Depkes RI, 1986).

4.2 Ekstraksi Daun *R. tuberosa* L.

Serbuk daun *R. tuberosa* L. diekstraksi dengan metode maserasi, metode ini termasuk ekstraksi cara dingin sehingga tidak merusak kandungan senyawa pada simplisia, dan prosesnya menggunakan peralatan sederhana sehingga mudah dilakukan.

Sebanyak 2500 g serbuk daun *R. tuberosa* L. terlebih dahulu diekstraksi dengan menggunakan pelarut diklorometana. Remaserasi dengan pelarut diklorometana sebanyak 5 kali dengan jumlah pelarut yang digunakan sebanyak 7 L. Filtrat dipekatkan dengan rotavapor. Tujuan ekstraksi dengan pelarut diklorometana untuk menarik senyawa-senyawa semipolar dan klorofil yang banyak terdapat di daun. Selanjutnya ampas diekstraksi lagi dengan menggunakan pelarut metanol. Remaserasi dilakukan sebanyak 15 kali dengan jumlah pelarut metanol yang digunakan sebanyak 15 L. Filtrat dipekatkan dengan rotavapor. Sesuai dengan hukum kelarutan *like disolves like*, artinya kelarutan akan terjadi bila memiliki sifat kepolaran yang sama. Seperti halnya etanol, metanol merupakan pelarut universal, yang dapat melarutkan metabolit-metabolit sekunder di dalam tumbuhan. Pelarut metanol relatif lebih murah dibandingkan pelarut etanol (Harborne, 1987). Rendemen hasil ekstraksi daun *R. tuberosa* L. dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

4.3 Partisi Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.

Partisi disebut juga sebagai ekstraksi cair-cair adalah proses pemisahan zat terlarut didalam 2 macam zat pelarut yang tidak saling bercampur. Partisi dilakukan secara bertahap dari pelarut semi polar etil asetat hingga pada pelarut yang bersifat polar yaitu *n*-butanol, hal ini bertujuan untuk memisahkan senyawa sesuai dengan tingkat kepolaran. Pada penelitian ini partisi dilakukan terhadap ekstrak metanol karena berdasarkan uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} 11,55 µg/mL lebih kecil dibandingkan ekstrak diklorometana dengan nilai IC_{50} 14,57 µg/mL (Tabel 4.2).

Ekstrak metanol yang akan dipartisi terlebih dahulu dilarutkan dengan air suling, sesekali dipanaskan di *waterbath* suhu 40^{o}C untuk meningkatkan kelarutan ekstrak, selanjutnya ditambahkan etil asetat. Partisi dengan etil asetat dilakukan sebanyak 5 kali dengan jumlah pelarut etil asetat yang digunakan sebanyak 5 L. Lapisan air sebelum ditambahkan pelarut *n*-butanol diuapkan di *waterbath* untuk menguapkan sisa pelarut etil asetat yang masih tercampur pada lapisan air, kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut *n*-butanol. Partisi dengan *n*-butanol dilakukan hingga 8 kali dengan jumlah pelarut *n*-butanol yang digunakan sebanyak 7 L. Lapisan etil asetat dan *n*-butanol dipekatkan dengan rotavapor. Lapisan air dipekatkan dengan menggunakan *frezee dryer* (ekstrak air). Rendemen hasil ekstraksi pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data rendemen ekstrak daun pletekan (*R. tuberosa* L.)

Ekstrak	Hasil (g)	Jumlah penyarian	Jumlah pelarut (L)	Rendemen (%)
Diklorometana	67	5x	7	2,68
Metanol	440	15x	15	17,62
Etil asetat	65	5x	5	2,60
n-butanol	150	8x	7	6,00
Air	170	-	-	6,80

Keterangan : Berat serbuk simplisia daun pletekan (*R. tuberosa* L.) adalah 2500 gram

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

4.4 Uji Aktivitas Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.

Spesies oxygen reactive (ROS) atau radikal bebas dapat dihambat melalui beberapa cara yaitu mencegah atau menghambat terbentuknya ROS, peredaman radikal bebas dengan donasi elektron dan memperbaiki kerusakan akibat reaktivitas radikal (Winarsih, 2007). Metode peredaman dapat dilakukan dengan menggunakan radikal DPPH dan pencegahan terbentuknya ROS dengan menghambat enzim penghasil ROS, salah satunya adalah enzim xantin oksidase.

4.4.1 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *R. tuberosa* L. Dengan Metode Peredaman Radikal DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada standar (kuersetin dan BHT) dan ekstrak (diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol dan air). Terlebih dahulu dilakukan uji kualitatif yaitu masing-masing ekstrak ditotolkan pada pelat silika gel dan disemprot menggunakan DPPH, jika memiliki aktivitas antioksidan akan menunjukkan hasil berupa daerah penotolan ekstrak berwarna kuning dengan latar plat berwarna ungu (Lampiran 2).

Untuk pengujian kuantitatif, ekstrak dilarutkan menggunakan pelarut metanol p.a dengan waktu reaksi (inkubasi) 30 menit pada suhu 37^{o}C (Pokorny, Yanishlieva dan Gordon, 2001 & Molyneux, 2004), pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm (Lampiran 3).

Pada pengujian ini digunakan kuersetin dan BHT sebagai standar (konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 µg/mL), diperoleh nilai IC_{50} BHT sebesar 3,17 dan kuersetin 2,87 µg/mL (Tabel 4.4).

Ekstrak daun *R. tuberosa* L. yaitu ekstrak diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol dan air masing-masing ditimbang sebanyak 10,0 mg dilarutkan dan dicukupkan volumenya dengan metanol p.a hingga 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Setiap ekstrak dilakukan pengenceran dengan menggunakan metanol p.a sehingga diperoleh larutan ekstrak uji 5, 10, 20, 30, 40 dan 50 µg/mL.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Tabel 4.2 Hasil pengujian aktivitas antioksidan standar

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (λ 517 nm)		% Inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
			Blangko	Sampel		
BHT	5	0,125	0,903	0,869±0,0005	3,69	3,17
	10	0,250		0,839±0,0002	7,02	
	15	0,375		0,822±0,0002	8,90	
	20	0,500		0,808±0,0002	10,43	
	25	0,625		0,797±0,0002	11,74	
Persamaan linear				y = 2,501 + 15,624x		
Kuersetin	5	0,125	0,653	0,647±0,0007	0,92	2,87
	10	0,250		0,626±0,0003	4,13	
	15	0,375		0,618±0,0011	5,36	
	20	0,500		0,602±0,0014	7,81	
	25	0,625		0,587±0,0001	10,11	
Persamaan linear				y = -0,952 + 17,684x		

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan nilai IC_{50} pada masing-masing ekstrak yaitu ekstrak diklorometana 14,57; metanol 11,55; etil asetat 8,79; *n*-butanol 7,42 dan air 21,69 µg/mL (Tabel 4.3).

Aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} paling kecil adalah ekstrak *n*-butanol dan etil asetat yaitu IC_{50}<10 µg/mL termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat. Ekstrak diklorometana, metanol dan air menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak berada pada rentang 10-50 µg/mL termasuk dalam kelas antioksidan kuat (Phongphaichit, 2007).

Proses peredaman radikal bebas melalui mekanisme pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas, sehingga radikal bebas menangkap satu elektron dari antioksidan. Radikal bebas sintetik yang digunakan adalah DPPH. Senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Pokorny, Yanishlieva dan Gordon, 2001).

Senyawa radikal DPPH berwarna ungu tua akan memudar menjadi kuning jika direduksi oleh antioksidan menjadi DPPH non radikal (Liangli Yu, 2008), ketika elektron ganjil dari radikal DPPH telah berpasangan dengan elektron dari senyawa penangkap radikal bebas (antioksidan) akan membentuk DPPH-H

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

tereduksi selanjutnya radikal bebas DPPH akan membentuk senyawa bukan radikal yaitu DPP Hidrazin yang stabil (Molyneux, 2004).

Tabel 4.3 Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun *R. tuberosa* L dengan metode peredaman radikal DPPH

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (λ 517 nm)		% Inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
			Blangko	Sampel		
Diklorometana	5	0,125	0,843	0,817±0,0017	3,02	14,57
	10	0,25		0,815±0,0020	3,26	
	20	0,5		0,812±0,0018	3,62	
	30	0,75		0,804±0,0032	4,57	
	40	1		0,802±0,0009	4,77	
	50	1,25		0,782±0,0009	7,19	
Persamaan linear				y = 2,289 + 3,274x		
Etil asetat	5	0,125	0,843	0,802±0,0024	4,83	8,79
	10	0,25		0,799±0,0005	5,23	
	20	0,5		0,787±0,0020	6,63	
	30	0,75		0,769±0,0011	8,68	
	40	1		0,762±0,0007	9,61	
	50	1,25		0,756±0,0011	10,26	
Persamaan linear				y = 4,173 + 5,211x		
n-butanol	5	0,125	0,843	0,806±0,0003	4,34	7,42
	10	0,25		0,805±0,0014	4,46	
	20	0,5		0,775±0,0008	8,04	
	30	0,75		0,772±0,0006	8,42	
	40	1		0,761±0,0007	9,65	
	50	1,25		0,747±0,0016	11,31	
Persamaan Linear				y = 3,673+ 6,242x		
Air	5	0,125	0,720	0,716±0,0009	0,54	21,69
	10	0,25		0,711±0,0001	1,26	
	20	0,5		0,706±0,0021	1,86	
	30	0,75		0,705±0,0011	1,99	
	40	1		0,702±0,0012	2,43	
	50	1,25		0,689±0,0001	4,22	
Persamaan linear				y = 0,712 + 2,272x		
Metanol	5	0,125	0,720	0,700±0,0006	2,75	11,55
	10	0,25		0,693±0,0001	3,79	
	20	0,5		0,692±0,0002	3,92	
	30	0,75		0,680±0,0005	5,57	
	40	1		0,678±0,0012	5,87	
	50	1,25		0,663±0,0013	7,87	
Persamaan linear				y = 2,289 4,129x		

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

4.4.2 Uji Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Ekstrak Daun *R. tuberosa* L.

Pengujian penghambatan enzim xantin oksidase dilakukan pada semua ekstrak daun *R. tuberosa* L. dan standar allopurinol. Aktivitas enzim xantin okidase (XOD) ditunjukkan dengan terbentuknya asam urat (Sweeney, Wyllie, Shalliker, dan Markham, 2001) yang dapat diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 295 nm pada kondisi aerob (Kong, Huang, Cheng, dan Tan, 2000).

Pada penelitian ini, pengujian dilakukan pada kondisi optimum, sehingga terlebih dahulu dilakukan optimasi kondisi dan penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang masimum merujuk pada kondisi prosedur Sigma yaitu pH 7,5 dengan konsentrasi substrat 0,15 mM. Dari hasil pengujian diperoleh panjang gelombang maksimum di daerah 284 nm. Profil spektrum panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada Lampiran 5.

Optimasi suhu dilakukan pada suhu 20, 25, 30, 35 dan 40^{o}C. Hasil pengujian menunjukkan aktivitas masksimum enzim pada kondisi suhu 30^{o}C dibandingkan pada suhu 20, 25, 35 dan 40^{o}C, sehingga pengujian selanjutnya dilakukan pada suhu 30^{o}C (Tabel 4.4).

Tabel 4.4 Data uji pendahuluan penentuan suhu optimum

Suhu (^{o}C)	Serapan (λ 284 nm)			Aktivitas (Unit/mL)
	Kontrol Blangko (KB)	Blangko (B)	B-KB	
20	0,099	0,340±0,0007	0,241	0,98
25	0,099	0,490±0,0247	0,391	1,97
30	0,099	0,556±0,0014	0,457	2,25
35	0,075	0,222±0,0021	0,147	0,72
40	0,071	0,200±0,0035	0,129	0,63

Pada optimasi pH dilakukan pada suhu optimum 30^{o}C dengan beberapa variasi yaitu pH 7,5; 7,8; 8,0; 8,3 dan 8,5. Hasil pengujian aktivitas enzim paling besar pada pH 7,8 dibandingan pada pH 7,5; 8,0; 8,3 dan 8,5 sehingga pengujian selanjutnya dilakukan pada kondisi pH optimum yaitu pH 7,8 (Tabel 4.5).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Tabel 4.5 Data uji pendahuluan penentuan pH optimum

pH	Serapan (λ 284 nm)			Aktivitas (Unit/mL)
	Kontrol Blangko (KB)	Blangko (B)	B-KB	
7,5	0,099	0,555±0,0042	0,456	2,24
7,8	0,101	0,605±0,0035	0,504	2,47
8,0	0,094	0,320±0,0014	0,226	1,11
8,3	0,085	0,272±0,0049	0,187	0,92
8,5	0,074	0,211±0,0028	0,137	0,67

Optimasi konsentrasi substrat xantin adalah untuk mengetahui konsentrasi optimum yang sesuai dengan unit enzim yang digunakan yaitu 0,1 mL/Unit. Pengujian dilakukan pada suhu optimum 30^{o}C dan pH optimum 7,8 dengan konsentrasi substrat adalah 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; dan 0,25 mM. Aktivitas enzim paling besar ditunjukkan pada konsentrasi substrat 0,15 mM dibandingkan konsentrasi 0,05; 0,10; 0,20; dan 0,25 mM, pengujian selanjutnya dilakukan dengan konsentrasi substrat 0,15 mM (Tabel 4.6).

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan jumlah enzim-substrat. Namun, pada konsentrasi tertentu, ketika jumlah enzim-substrat sudah jenuh dan tidak ada lagi enzim bebas yang tersedia, peningkatan laju konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan laju pembentukkan enzim-substrat (Murray, Granner, Mayes dan Rodwell, 2003).

Tabel 4.6 Data uji pendahuluan penentuan konsentrasi substrat optimum

Konsentrasi Xantin (mM)	Serapan (λ 284 nm)			Aktivitas (Unit/mL)
	Kontrol Blangko(KB)	Kontrol (B)	B-KB	
0,05	0,034	0,188±0,0063	0,154	0,76
0,1	0,098	0,383±0,0042	0,285	1,40
0,15	0,113	0,637±0,0021	0,524	2,58
0,2	0,150	0,583±0,0056	0,433	2,13
0,25	0,202	0,620±0,0007	0,418	2,06

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase dilakukan beberapa pengujian yaitu pengukuran blangko, kontrol blangko, sampel, dan kontrol sampel. Kontrol blangko dan kontrol sampel bertujuan sebagai faktor koreksi adanya zat lain yang memberikan serapan.

Allopurinol digunakan sebagai standar pada konsentrasi 0,1; 0,25; 0,5 dan 1 µg/mL dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 0,02 µg/mL. Data serapan, persen inhibisi dan IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil pengujian penghambatan enzim xantin oksidase standar

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Serapan (λ 284 nm)		% Inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
		Kontrol Sampel	Sampel		
Allopurinol	0,1	0,014	0,024	0,333±0,0028	45,11	0,02
	0,25	0,036	0,024	0,275±0,0353	55,42	
	0,5	0,071	0,028	0,171±0,0042	74,60	
	1	0,143	0,034	0,104±0,0014	87,56	
Persamaan linear			y = 44,21 + 325,05x			
Blangko : 0,660			Kontrol blangko : 0,097			

Ekstrak daun *R. tuberosa* L. yaitu ekstrak diklorometana, metanol, etil asetat, *n*-butanol dan air diukur penghambatannya terhadap enzim xantin oksidase. Masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 10,0 mg dan ditambahkan beberapa tetes DMSO hingga larut dicukupkan volumenya dengan air bebas karbondioksida hingga 100,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Setiap ekstrak dilakukan pengenceran dengan menggunakan air bebas karbondioksida sehingga diperoleh larutan ekstrak uji 0,1; 0,5; 1; 5 dan 10 µg/mL.

Dari hasil pengujian ekstrak diklorometana diperoleh nilai IC_{50} sebesar 0,32 µg/mL, ekstrak metanol diperoleh nilai IC_{50} 0,16 µg/mL, ekstrak *n*-butanol dengan IC_{50} 0,15 µg/mL, ekstrak etil asetat dengan nilai IC_{50} 0,18 µg/mL. Sedangkan ekstrak air dengan nilai IC_{50} 0,43 µg/mL (Tabel 4.8). Penghambatan enzim xantin oksidase dengan nilai IC_{50} terkecil yaitu IC_{50} 0,15 µg/mL ditunjukkan oleh ekstrak *n*-butanol. Ekstrak metanol, etil asetat dan *n*-butanol memiliki nilai IC_{50} yang kecil, hal ini karena senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak tersebut adalah senyawa yang bersifat polar seperti senyawa fenol,

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

flavonoid dan tanin. Owen dan Johns (1999) melaporkan senyawa golongan flavonoid, fenol dan tanin berpotensi menghambat xantin oksidase.

Tabel 4.8 Hasil pengujian penghambatan enzim xantin oksidase ekstrak daun *R. tuberosa* L.

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (λ 284 nm)		% inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
			Kontrol sampel	Sampel		
Diklorometana	0,1	0,014	0,011	0,398±0,0014	33,73	0,32
	0,5	0,071	0,027	0,393±0,0021	37,33	
	1	0,143	0,068	0,290±0,0035	61,98	
	5	0,714	0,040	0,240±0,0028	65,75	
	10	1,429	0,022	0,220±0,0007	66,09	
Persamaan linear			y = 43,91 + 19,10x			
Metanol	0,1	0,014	0,036	0,386±0,0021	40,06	0,16
	0,5	0,071	0,040	0,372±0,0056	43,15	
	1	0,143	0,020	0,243±0,0014	61,81	
	5	0,714	0,016	0,236±0,0042	62,32	
	10	1,429	0,071	0,288±0,0014	62,84	
Persamaan linear			y = 47,95 + 12,82x			
Etil asetat	0,1	0,014	0,034	0,382±0,0070	40,41	0,18
	0,5	0,071	0,044	0,367±0,0023	44,69	
	1	0,143	0,052	0,268±0,0328	58,73	
	5	0,714	0,049	0,272±0,0014	61,82	
	10	1,429	0,048	0,241±0,0028	66,95	
Persamaan linear			y = 47,11 + 15,60x			
n-butanol	0,1	0,014	0,028	0,333±0,0028	47,77	0,15
	0,5	0,071	0,032	0,334±0,0007	48,28	
	1	0,143	0,125	0,405±0,0021	52,05	
	5	0,714	0,030	0,288±0,0014	55,82	
	10	1,429	0,145	0,336±0,0014	65,14	
Persamaan linear			y = 48,3 + 11,62x			
Air	0,1	0,014	0,033	0,382±0,0014	40,24	0,43
	0,5	0,071	0,008	0,332±0,0021	44,52	
	1	0,143	0,040	0,372±0,0035	43,15	
	5	0,714	0,078	0,289±0,0042	62,33	
	10	1,429	0,028	0,238±0,0049	64,04	
Persamaan linear			y = 42,59 + 17,43x			
Blangko : 0,647			Kontrol blangko : 0,099			

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

4.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa pada ekstrak sebagai identifikasi dan menjadi informasi atau petunjuk sebelum melakukan isolasi senyawa. Penafisan fitokimia dilakukan pada ekstrak dengan nilai IC_{50} terkecil pada pengujian aktivitas antioksidan nilai IC_{50} 7,42 µg/mL dan penghambat enzim xantin oksidase dengan nilai IC_{50} 0,15 µg/mL yaitu ekstrak *n*-butanol. Pengujian dilakukan untuk beberapa golongan senyawa yaitu alkaloid, antrakuinon, flavonoid, terpen, saponin, tanin dan glikosida. Identifikasi dilakukan menggunakan pembanding berupa simplisia yang telah diketahui memiliki kandungan golongan senyawa. Pembanding tersebut antara lain kulit batang kina untuk golongan senyawa alkaloid, Rhei Radix untuk golongan senyawa antrakuinon, daun benalu mangga untuk golongan senyawa flavonoid, Nerii Folium untuk golongan senyawa glikosida, daun teh untuk golongan senyawa tanin, Herba Patikan Kebo untuk golongan senyawa terpen, dan Liquiritae Radix untuk golongan senyawa saponin. Dari hasil pengujian diperoleh hasil bahwa ekstrak *n*-butanol mengandung senyawa flavonoid, terpen, saponin, tanin dan glikosida (Tabel 4.9).

Tabel 4.9 Hasil Penafisan Fitokimia

Golongan senyawa	Ekstrak *n*-butanol
Alkaloid	-
Antrakuinon	-
Flavonoid	+
Terpen	+
Saponin	+
Tanin	+
Glikosida	+

4.6 Kromatografi Kolom

Proses kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan fase diam Sephadex LH-20 dan fase gerak metanol:air. Digunakan fase diam sephadex karena ekstrak *n*-butanol bersifat polar, sedangkan penggunaan fase gerak metanol:air (50:50) untuk menarik senyawa aktif yang bersifat polar seperti flavonoid. Sebanyak 50 g ekstrak *n*-butanol di kromatografi kolom, eluat

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

ditampung setiap 10 mL, kemudian di ukur serapannya pada panjang gelombang 250, 275, 300, 350, 375 nm. Senyawa memberikan serapan pada spektrofotometer UV-Vis adalah memiliki ikatan rangkap dan sistem terkonjugasi (Kosela, 2010), contohnya pada senyawa fenol sederhana memberikan serapan sekitar ±250 nm dan senyawa golongan flavonoid memberikan serapan sekitar ±350 nm (Harborne, 1987). Pengelompokan fraksi berdasarkan profil spektrum UV-Vis dan diperoleh 6 fraksi (Tabel 4.10). Fraksi III diperoleh senyawa, dimurnikan dan rekristalisasi menggunakan pelarut metanol, sehingga diperoleh serbuk putih kekuningan sebanyak 296,6 mg yang selanjutnya disebut *Ruellia tuberosa* L.1 (RTL1). Selanjutnya fraksi F-I sebanyak 7,1879 g dikromatografi kolom kembali menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak isokratik metanol:kloroform (3:1), dari fraksi B diperoleh senyawa kemudian dimurnikan dan direkristalisasi, sehingga diperoleh senyawa berupa kristal jarum sebanyak 45,8 mg, selanjutnya disebut senyawa *Ruellia tuberosa* L.2 (RTL2).

Tabel 4.10 Pengelompokan fraksi hasil kolom kromatografi

Fraksi	Fase gerak	Jumlah (gram)
I	Metanol : air (50:50)	7,1879
II	Metanol : air (50:50)	12,2632
III	Metanol : air (50:50)	2,4824
IV	Metanol : air (50:50)	1,3762
V	Metanol : air (50:50)	1,0893
VI	Metanol : air (50:50)	4,957

4.7 Identifikasi dan Elusidasi Struktur Isolat

Penentuan struktur senyawa RTL1 dan RTL2 dilakukan dengan menganalisis data spektroskopi yang meliputi spektroskopi UV, spektroskopi infra merah (IR), spektroskopi massa (MS), resonansi magnetik inti proton (^{1}HNMR), resonansi magnetik inti karbon (^{13}CNMR), DEPT dan spektroskopi NMR-2D meliputi H-H COSY, C-H COSY dan HMBC.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

4.7.1 Identifikasi senyawa RTL1

Senyawa RTL1 berbentuk serbuk putih kekuningan dengan jarak lebur antara 150-152^{o}C. Dari Hasil pengukuran spetrofotometer UV-Vis senyawa RTL1 menunjukkan seraparan maksimum pada panjang gelombang 229, 278 dan 327 nm hal ini menujukkan adanya ikatan rangkap. Adanya serapan pada spektrofotometer UV-Vis karena adanya gugus kromofor yaitu ikatan rangkap terkonjungasi (Lampiran 14).

Spektrum FTIR senyawa RTL1 pada bilangan gelombang υ=3294 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus O-H, υ=2929,97 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur C-H, υ=1654,98 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O, υ=835,21 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus cincin aromatik yang tersubtitusi. Gambar spektrum FTIR dapat dilihat pada Lampiran 15.

Spektrum ^{1}HNMR (400 MHz, DMSO) senyawa RTL1 memiliki pergeseran kimia pada 3,74 (*s*, 3H); 3,93 (*s*, 3H): 4,57 (*s*, 1H); 5,03 (*t*, 1H); 5,11 (*d*); 5,36 (*d*), 6,95 (*s*, 1H); 6,97 (*d*, 1H); 7,15 (*d*, 2H, *J*=8,8 Hz), dan 8,07 ppm (*d*, 2H, *J*=7,2 Hz). Data ^{1}HNMR dapat dilihat pada Lampiran 18. Hasil ^{1}HNMR menunjukkan proton pada pergerseran kimia 3,744 (*t*, 3H) dan 3,93 ppm (*t*, 3H) adalah metoksi (-OCH$_3$), proton pada δ_H 4,57 (*s*, 1H); 5,03 (*t*); 5,11 (*d*) dan 5,36 ppm (*d*) menunjukkkan proton alifatis dan δ_H 6,95 (*s*, 1H); 6,97 (*d*, 1H); 7,15 (*d*, 2H) dan 8,07 ppm (*d*, 2H) menunjukkan proton pada cincin aromatis.

Spektrum ^{13}CNMR (100 MHz, DMSO) nilai pergeseran kimia 56,4; 60,0; 60,6; 69,6; 73,1; 76,5; 77,1; 91,6; 99,8; 103,6; 105,1; 116,5; 123,8; 128,1; 131,9; 151,9; 152,6; 158,6; 160,3; 163,3 dan 182,2 ppm (Lampiran 19). Karbon pada δ_C 56,4; 60,0; 60,6; 69,6; 73,1; 76,5; 77,1 ppm merupakan karbon sp3 (C-C), karbon pada δ_C 91,6; 99,8; 103,6; 105,1; 116,5; 123,8 dan 128,1 ppm adalah karbon sp2 (C=C), karbon δ_C 131,9; 151,9; 152,6; 158,6; 160,3 dan 163,3 ppm adalah karbon sp2 yang mengalami pergeseran akibat adanya pengaruh elektronegativitas (*downfield*) dan karbon pada 182,2 ppm adalah karbonil (C=O).

Data NMR-2D *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT) menunjukkan karbon pada 60,6 ppm adalah metilen (CH_2), karbon pada 60,0 dan 56,4 ppm adalah metil (CH_3) dan terdapat 9 karbon kuarterner pada cincin aromatis, karbon 182,2 ppm adalah karbonil (Lampiran 20).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Spektrum NMR-2D *Correlated Spektroscopy* (H-H COSY) menggambarkan posisi proton yang saling berdampingan. Data H-H COSY senyawa RTL1 (Lampiran 21) menunjukkan proton pada δ_H 7,15 berdampingan dengan proton 8,07 ppm dan proton δ_H 3,74 berdampingan dengan proton 4,57 ppm.

Data NMR-2D C-H COSY (Lampiran 22) menunjukkan hubungan langsung proton terhadap karbon. Proton δ_H 5,03 berhubungan dengan karbon 99,8 ppm, proton δ_H 8,07 terhadap karbon 128,5 ppm, proton δ_H 7,15 terhadap karbon 116,5 ppm, proton δ_H 6,97 terhadap karbon 91,6 ppm, proton δ_C 3,7 terhadap karbon 60,6 ppm, dan proton δ_H 3,93 terhadap 56,4 ppm (Gambar 4.1).

Berdasarkan spektrum GC-MS diperkirakan bobot molekul senyawa RTL1 adalah 476 (BM 476) (Lampiran 16). Berdasarkan analisis spektrum ^{1}HNMR dan ^{13}CNMR senyawa RTL1 diketahui jumlah proton sebanyak 24 dan karbon 23. Bobot molekul karbon (23x12=276) dan proton (24x1=24) adalah 300, dan diperkirakan adanya atom oksigen (11x16=176), sehingga diperkirakan rumus molekul senyawa RTL1 adalah $C_{23}H_{24}O_{11}$.

Untuk mengetahui jumlah ikatan rangkap pada senyawa RTL1 dengan perkiraan rumus molekul $C_{23}H_{24}O_{11}$ dapat dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (*double bound equivalen*) sebagai berikut :

$$F = X - 0{,}5Y + 0{,}5\,Z + 1 \qquad (4.1)$$

F = Jumlah cincin atau ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen

Y = Jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

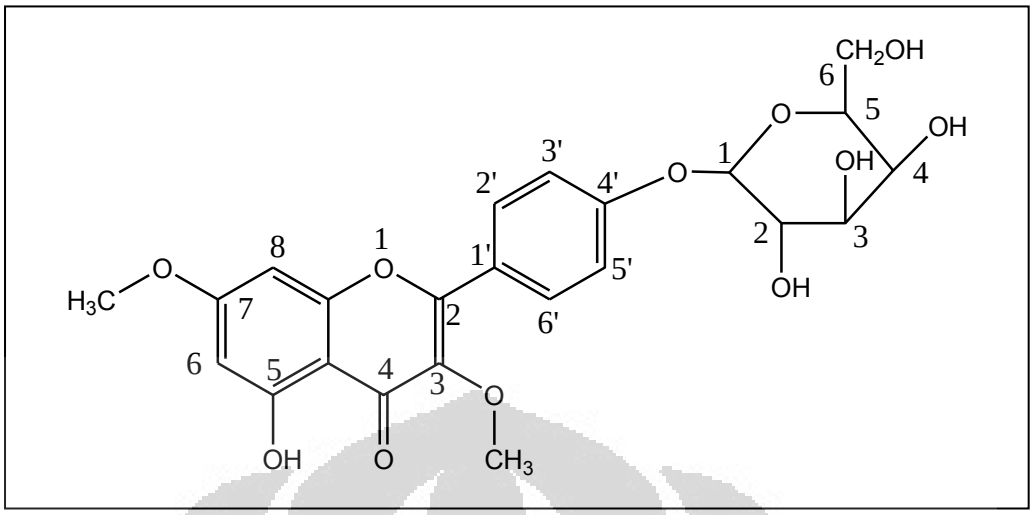
Z = Jumlah atom N, P atau atom trivalen

maka F = 23 - (0,5 x 24) + 1

= 23 – 12 + 1 = 12

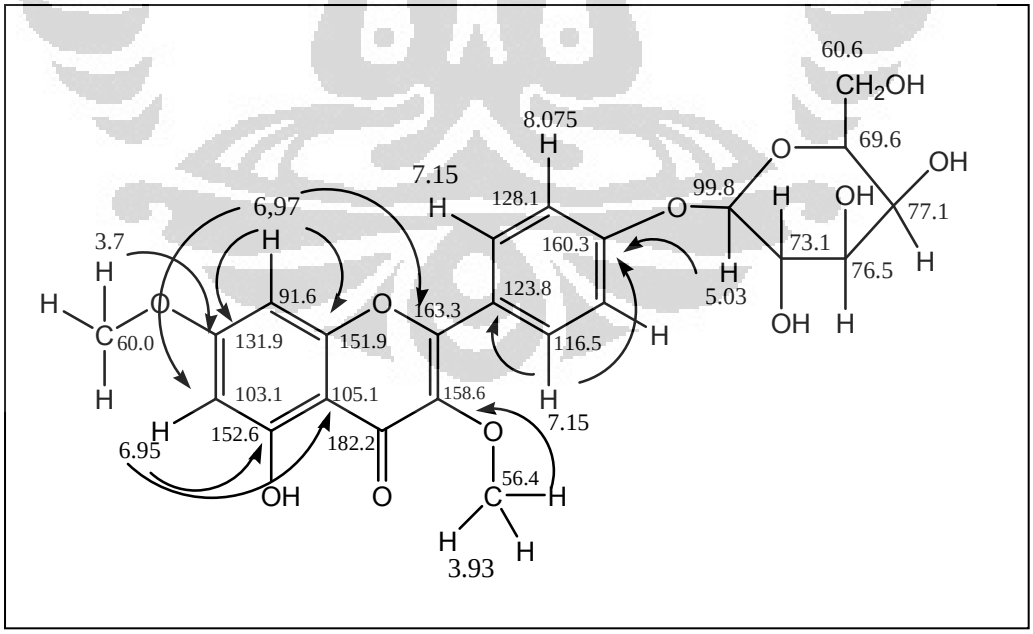
Hasil ini menunjukkan bahwa jumlah ikatan rangkap pada senyawa RTL1 adalah 12, artinya senyawa ini kemungkinanan memliki 12 ikatan rangkap 2, atau 3 cincin aromatik. Sehingga dapat diperkirakan kerangka senyawa RTL1 seperti pada Gambar 4.1.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012



Gambar 4.1 Prediksi kerangka senyawa RTL1

Data NMR-2D HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*) (Lampiran 23) menunjukkan korelasi antara proton dan karbon yang ada didekatnya yaitu antara 2 atau 3 ikatan (hubungan tidak langsung) dan menujukkan letak posisi proton dan karbon.

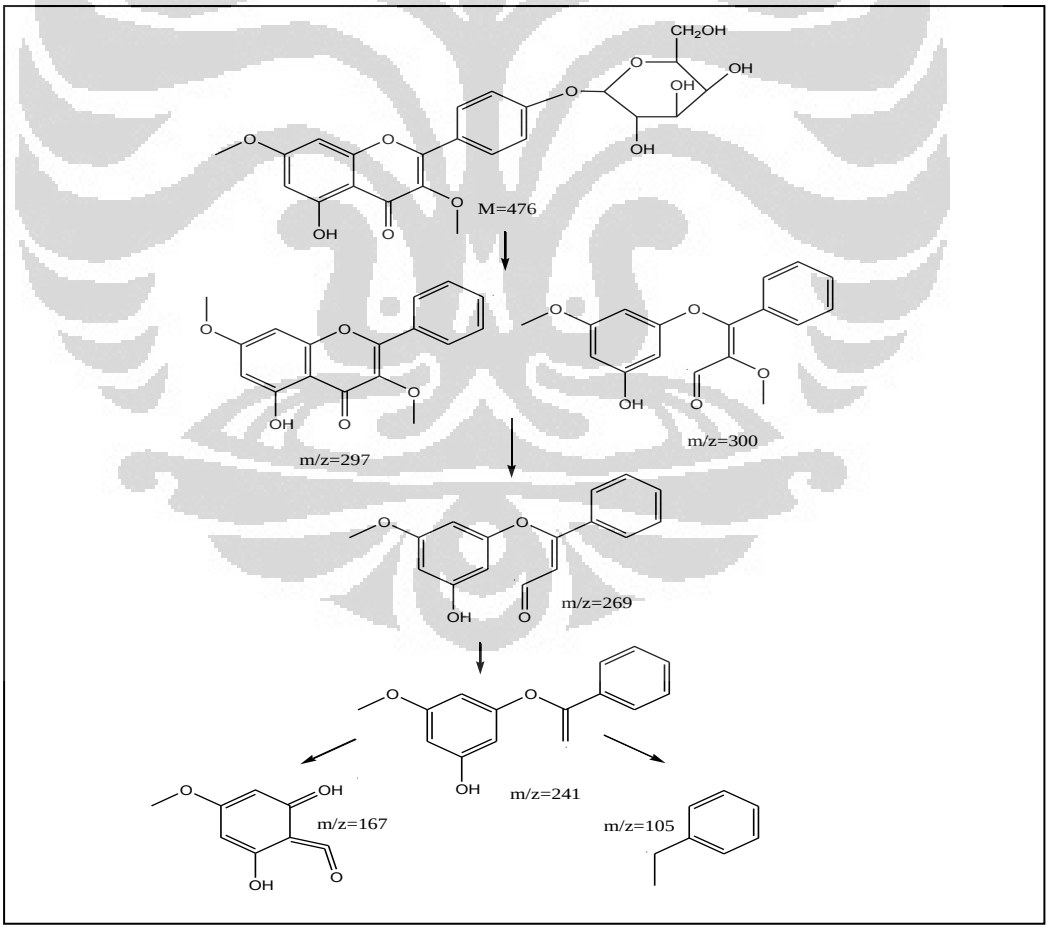


Gambar 4.2 NMR-2D HMBC senyawa RTL1

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Data NMR-2D HMBC menunjukkan hubungan proton δ_H 3,74 terhadap karbon 131,9 ppm, proton δ_H 3,93 terhadap 158,6 dan 182,2 ppm, proton δ_C 6,97 terhadap 163,3; 151,9; 131,9; dan 103,1 ppm, proton δ_H 6,95 berkorelasi dengan karbon 152,6 dan 105,1 ppm, proton δ_H 7,15 berkorelasi dengan karbon 160,3 dan 123,8 ppm, proton δ_H 8,075 terhadap karbon 160,3 ppm, dan proton δ_C 5,03 ppm (proton gula) terhadap karbon 160,3 ppm, menunjukkan posisi gula pada C-4′ (*J*=7,2 Hz) yang berarti gula berada pada posisi beta (β) (Supratman, 2010) (Gambar 4.2).

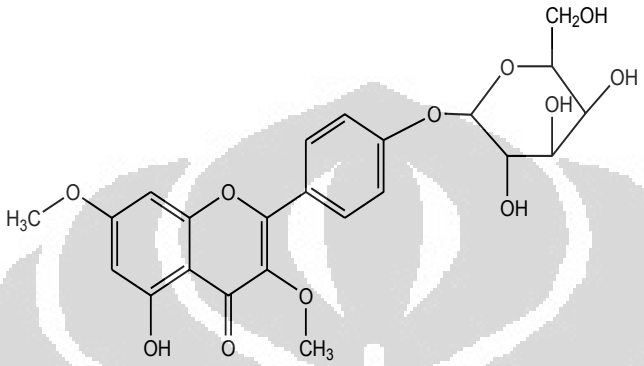
Pola fragmentasi digunakan untuk mengidentifikasi senyawa, juga memungkinkan terdapat pengenalan gugus fungsi dengan melihat fragmentasi spesifik (Silverstein, Webster, dan Kiemble, 2005). Senyawa RTL1 memiliki pola fragmentasi (Lampiran 17) yang dapat digambarkan kemungkinan fragmentasinya seperti pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Prediksi fragmentasi senyawa RTL1

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Dari analisis spektra diketahui senyawa RTL1 merupakan glikosida flavonoid dengan satu gugus gula yaitu glukosa yang terikat pada C4′ posisi beta (β), jadi senyawa RTL1 adalah flavonoid-O-β-glukosa dengan nama lain kamarosida (Kamel et al., 2010) (Gambar 4.4).



5-hidroksi-3,7-dimetoksi-2-(4-((3S,4S,5S,6R)-4,5,6-trihidroksi-2(hidroksimetil)-tetrahidro-2H-piran-3-iloksi)fenil)-4H-kromen-4-on

Gambar 4.4 Struktur senyawa RTL1

4.7.2 Identifikasi Senyawa RTL2

Senyawa RTL2 berbentuk kristal jarum dengan jarak lebur antara 223-225^{o}C. Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis menunjukkan serapan pada panjang gelombang 222 dan 263 nm. Ini menunjukkan adanya ikatan rangkap atau gugus kromofor (Lampiran 27).

Dari hasil pengukuran FTIR pada panjang gelomabang υ=3342,75 cm^{-1} adalah gugus O-H, υ=2359,02 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur C-H, υ=1716,07 cm^{-1} menunjukkkan vibrasi ulur gugus karbonil C=O, υ=1533,46 cm^{-1} menunjukkakan vibrasi ulur C=C, 1184,33 cm^{-1} menunjukkan pita vibrasi ulur C-O, υ=790 dan υ=710 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus aromatik tersubtitusi. Adanya gugus karbonil (C=O) dan gugus C-O diprediksikan senyawa RTL2 mengandung gugus ester (Lampiran 28).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Spektrum ^{1}HNMR (400 MHz, D_2O) dengan pergeseran kimia 5,40 dan 8,46 ppm (Lampiran 31). Proton δ_C 5,40 (*s*, 3H) merupakan metin (C-H) dan 8,46 ppm (*s*, 1H) adalah Ar-OH yang mengalami pergeseran dari 3,35 ppm.

Spektrum ^{13}CNMR (100 MHz, D_2O) dengan nilai pergeseran kimia pada 66,0; 161,5; 162,6 dan 178,4 ppm (Lampiran 32). Karbon pada δ_C 66,02 merupakan karbon sp3, karbon δ_C 161,58 dan 162,61 ppm merupakan karbon sp2 yang mengalami pergeseran (*downfiled*) dan δ_C 178,40 adalah karbonil. Spektra ^{13}CNMR menunjukkan adanya C simetris pada cincin aromatis.

Data NMR-2D DEPT karbon pada δ_C 66,0 ppm menujukkan (O-CH_3 atau O-CH), karbon pada δ_C 61,5 dan 162,6 ppm merupakan C kuarterner yang terikat pada siklik aromatis. Data DEPT dapat dilihat pada Lampiran 33.

Data NMR-2D C-H COSY (Lampiran 35) senyawa RTL2 menunjukkan adanya hubungan langsung antara proton dan karbon. Proton δ_H 5,40 ada hubungan dengan karbon δ_C 66,0 ppm.

Spektrum GC-MS senyawa RTL1 (Lampiran 29) diperkirakan memiliki bobot molekul 258 (BM=258). Berdasarkan analisis spektrum ^{1}HNMR dan ^{13}CNMR senyawa RTL2 diketahui jumlah proton 10 dan karbon 10. Bobot molekul karbon (10x12=120) dan proton (10x1=10) adalah 130, dan diperkirakan adanya atom oksigen 8 (8x16=128), sehingga diperkirakan rumus molekul senyawa RTL1 adalah $C_{10}H_{10}O_8$.

Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa RTL2 dengan rumus molekul $C_{10}H_{10}O_8$ dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (*double bound equivalen*) sebagai berikut :

$$F = X - 0{,}5Y + 0{,}5\,Z + 1 \qquad (4.2)$$

F = Jumlah cincin atau ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen

Y = Jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

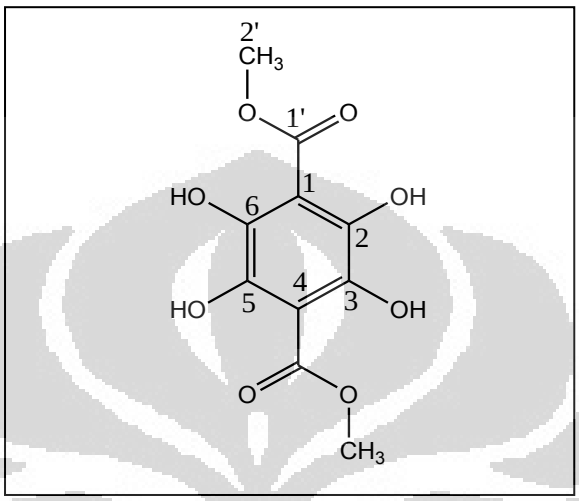
Z = Jumlah atom N, P atau atom trivalen

maka F = 10 - (0,5 x 10) + 1

= 10 – 5 + 1 = 6

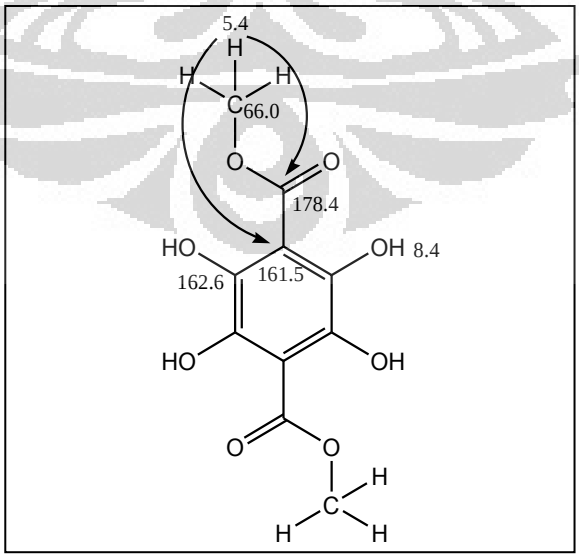
Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Hasil ini menunjukkan bahwa jumlah ikatan rangkap pada senyawa RTL2 adalah 6. Jadi kemungkinan senyawa ini memiliki 6 ikatan rangkap (C=C atau C=O) atau 1 cincin aromatis dan 2 ikatan rangkap. Prediksi kerangka senyawa RTL2 seperti pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Prediksi kerangka senyawa RTL2

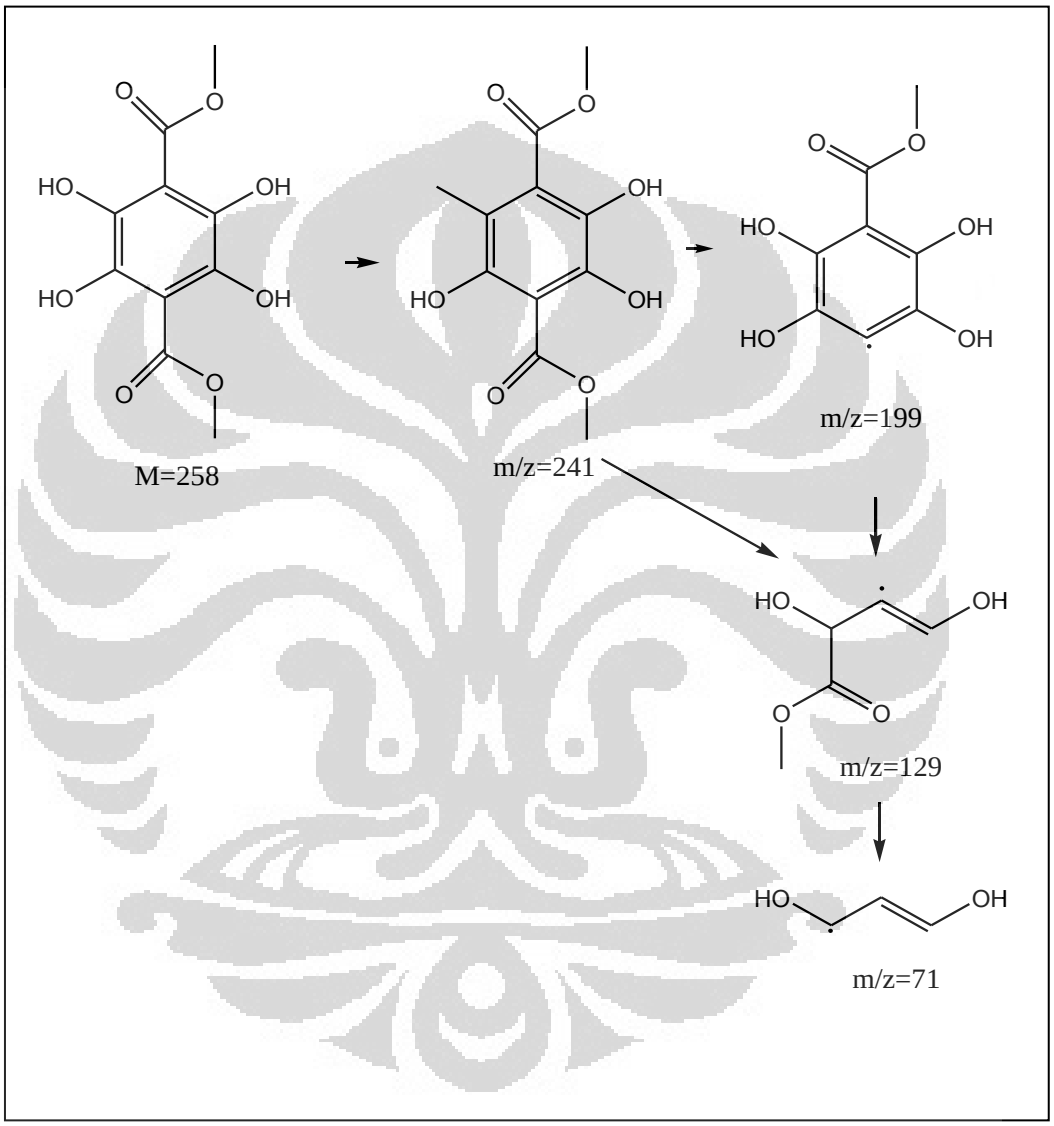
Data NMR-2D HMBC (Lampiran 36) menunjukkan korelasi antara proton dengan karbon yang ada dekatnya yaitu jarak 2 atau 3 ikatan (tidak langsung), proton δ_H 5,40 ppm berkorelasi dengan karbon δ_C 161,5 dan 178,4 ppm (Gambar 4.6).



Gambar 4.6 NMR-2D HMBC senyawa RTL2

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

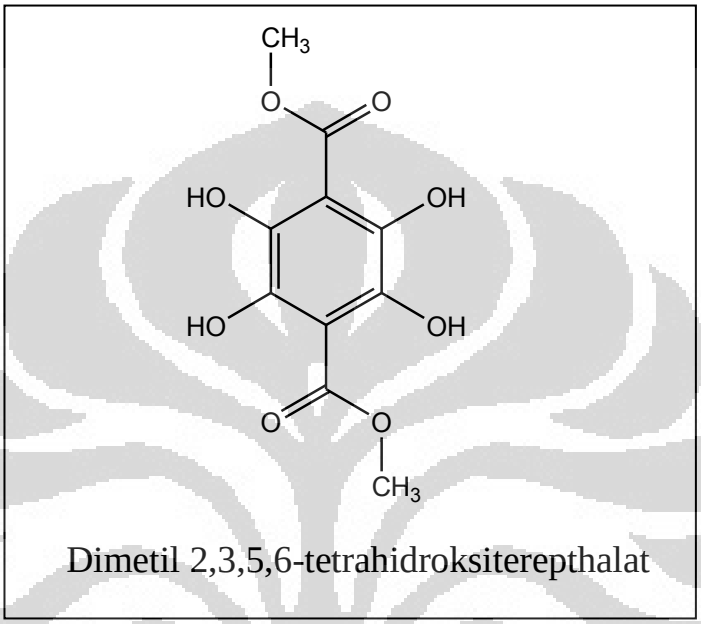
Pola fragmentasi dipergunakan untuk mengidentifikasi senyawa, dan pengenalan gugus fungsi dengan melihat fragmentasi spesifik (Silverstein, Webster, dan Kiemble, 2005). Pola fragmentasi GC-MS (Lampiran 30) sehingga dapat digambarkan prediksi fragmentasi senyawa RTL2 (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Prediksi fragmentasi senyawa RTL2

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Analisis data spektra menunjukkan senyawa RTL2 merupakan senyawa turunan tereftalat. Kulanthaivel dan Pilletier (1988) telah mengisolasi senyawa 2-dihidroksi-dimetiltereftalat dari *Swertia petiolata*. Berdasarkan *database-Chemspider* senyawa RTL2 adalah senyawa baru. Senyawa RTL2 dapat digambarkan sebagai berikut (Gambar 4.8) :



Gambar 4.8 Struktur senyawa RTL2

4.8 Uji Aktivitas Isolat

Oksidasi oleh enzim xantin oksidase dari xantin menjadi asam urat ekivalen dengan peningkatan produksi ROS (Behera, Adawadkar, dan Makhija, 2003). Akibatnya aktivitas enzim xantin oksidase memberikan kontribusi terjadinya stres oksidatif. Sehingga pengurangan aktivitas enzim xantin oksidase bermanfaat untuk mencegah terjadinya stres oksidatif, melalui penghambatan enzim xantin oksidase.

4.8 1 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat dengan Peredaman radikal DPPH

Aktivitas antioksidan dari isolat yang diperoleh kemudian diuji kembali dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Hasil pengujian antioksidan dengan nilai IC_{50} senyawa RTL1 dan RTL2 yaitu 28,79 dan

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

20,77 µg/mL (Tabel 4.11). Senyawa RTL1 merupakan golongan glikosida flavonoid yang memiliki 1 gugus gula dan gugus hidroksi (OH) yang dapat berperan sebagai donor proton terhadap radikal bebas. Gula alkohol (glukosa) dalam jumlah banyak, bertindak sebagai antioksidan untuk melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif (Nishizawa-Yokoi, Yabuta, Shigeoka, 2008).

Tabel 4.11 Hasil pengujian aktivitas antioksidan isolat

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (517 nm)		% Inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
			Blangko	Sampel		
RTL1	10	0,25	0,873	0,847±0,0021	2,90	28,79
	20	0,5		0,846±0,0063	3,05	
	50	1,25		0,842±0,0007	3,55	
	75	1,875		0,830±0,0035	4,98	
	100	2,5		0,813±0,0028	6,87	
Persamaan linear				y = 2,1657 + 1,6614x		
RTL2	10	0,25	0,689	0,683±0,0014	0,87	20,77
	20	0,5		0,665±0,0035	3,48	
	50	1,25		0,658±0,0021	4,49	
	75	1,875		0,650±0,0063	5,66	
	100	2,5		0,641±0,0042	6,97	
Persamaan linear				y = 1,305 + 2,344x		

Bimlesh, Sandhar, Prasher, Tiwari, Manoj dan Pardeep, (2011) melaporkan bahwa, flavonoid merupakan antioksidan yang kuat terhadap radikal bebas. Aktivitasnya berdasarkan kemampuan mendonorkan proton dari gugus fenol pada flavonoid sehingga radikal bebas dapat terdelokalisasi. Berikut hubungan antara substituen gugus hidroksi terhadap radikal bebas :

$$F\text{-}OH + R^* \longrightarrow F\text{-}O^* + RH \qquad (4.3)$$

Secara *in-vitro* flavonoid menghambat peroksidasi lipid sebagai tahap awal *scavenging* anion superoksida dan radikal hidroksi. Pada rantai akhir radikal, donor atom hidrogen bereaksi dengan radikal peroksida, dan membentuk flavonoid yang radikal, yang selanjutnya berekasi dengan radikal bebas sehingga

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

mengakhiri penyebaran rantai radikal. Berdasarkan studi kinetika, dihubungkan aktivitas antioksidan dan struktur flavonoid :

a. Gugus orto-hidroksi pada cincin B (katekol) memberikan stabilitas yang besar, melalui ikatan hidrogen dan bertanggungjawab terhadap dislokasi elektron.
b. Ikatan rangkap C2 dan C3 yang terkonjugasi dengan C4-okso, berfungsi sebagai dislokasi elektron.
c. Adanya gugus hidroksi pada C3 dan C5, dan C3' dan C4' mempercepat inhibisi peroksidasi lipid, dan sangat penting pada *scavenging* terhadap radikal peroksil, alkoksil, superoksida, dan nitrit peroksida. Kehilangan gugus hidroksi pada posisi C3 (flavon) mengurangi aktivitas antioksidan (Bimlesh, Sandhar, Prasher, Tiwari, Manoj dan Pardeep, 2011).

Sedangkan senyawa RTL2 menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 20,77 µg/mL . Senyawa RTL2 merupakan senyawa golongan fenol yang kaya gugus hidroksi (OH) yang mudah melepaskan proton sebagai donor sehingga mampu meredam radikal bebas DPPH. Jumlah gugus hidroksi (OH) berkorelasi dengan aktivitas antioksidan (Chang, Lee, Chen, Huang, Tsai, Huang dan Lin, 2007). Telah banyak penelitian evaluasi aktivitas antioksidan yang melaporkan bahwa senyawa fenolik merupakan peredam radikal bebas yang baik.

Hasil ini dibandingkan terhadap standar kuersetin dengan nilai IC_{50} 2,87 µg/mL memiliki aktivitas 10 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL1 dan 7 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL2, selain itu digunakan standar BHT dengan nilai IC_{50} 3,17 µg/mL yang memiliki aktivitas 9 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL1 dan 6 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL2.

4.8.2 Uji Penghambatan Enzim Xantin Oksidase Isolat

Enzim xantin oksidase merupakan enzim yang mengkatalisis hipoxantin menjadi xantin dan menjadi asam urat. Dalam proses katalisisnya enzim xantin oksidase memproduksi ROS yaitu anion superoksida dan superoksida. Sehingga penghambatan kerja enzim xantin oksidase dapat juga menghambat terbentuknya ROS.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Pengujian penghambatan enzim xantin oksidase juga dilakukan terhadap isolat yang diperoleh yaitu senyawa RTL1 dan RTL2. Dari hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa RTL dan RTL2 dengan nilai IC_{50} 0,67 dan 0,21 µg/mL (Tabel 4.12). Senyawa RTL1 dan RTL2 merupakan senyawa golongan fenolik. Senyawa golongan flavonoid, fenol dan tanin berpotensi menghambat xantin oksidase. Flavonoid memberikan kontribusi mengurangi stres oksidatif melalui penghambatan aktivasi pada regulasi enzim (*key regulating enzyme*), seperti pada enzim xantin oksidase. Senyawa RTL1 merupakan senyawa glikosida flavonoid (1 gugus gula) dengan satu gugus hidroksi pada posisi C5 ini dapat memberikan penghambatan yang baik terhadap xantin oksidase. Dimana jika gugus hidroksi pada posisi C5 dan C7 memberikan kontribusi positif sebagai penghambat enzim xantin oksidase sedangkan pada posisi C2′, C8 dan C3 akan memberikan kontribusi negatif terhadap penghambatan xantin oksidase (Van Hoorn et al., 2002).

Tabel 4.12 Hasil pengujian penghambatan enzim xantin oksidase isolat

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)		Serapan (λ 284 nm)		% Inhibisi	IC_{50} (µg/mL)
			Kontrol Sampel	Sampel		
RTL1	0,1	0,014	0,003	0,382±0,0014	31,22	0,67
	0,5	0,071	0,032	0,371±0,0007	38,48	
	1	0,143	0,051	0,365±0,0042	43,01	
	5	0,714	0,058	0,310±0,0035	54,26	
	10	1,429	0,085	0,284±0,0028	63,88	
Persamaan linear			y = 36,421 + 20,559x			
RTL2	0,1	0,014	0,006	0,319±0,0035	43,19	0,21
	0,5	0,071	0,028	0,304±0,0049	49,91	
	1	0,143	0,032	0,300±0,0021	51,36	
	5	0,714	0,040	0,279±0,0042	56,62	
	10	1,429	0,056	0,213±0,0021	71,51	
Persamaan linear			y = 46,411 + 17,097x			
Blangko : 0,641			Kontrol blangko : 0,090			

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Hasil pengujian penghambatan enzim xantin oksidase dibandingkan terhadap standar allopurinol nilai IC_{50} 0,02 µg/mL memiliki aktivitas 33 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL1 dan 10 kali lebih kuat dibandingkan senyawa RTL2. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas penghambatan enzim xantin oksidase senyawa RTL1 dan senyawa RTL2 dibandingkan terhadap standar dapat disimpulkan aktif sebagai antioksidan melalui penghambatan enzim xantin oksidase. Senyawa RTL1 merupakan senyawa flavonoid dan termasuk dalam kategori flavonoid tipe penghambat enzim xantin oksidase dan *scavenging* superoksida (Cos et al., 1998).

4.9 Penentuan Kinetika Penghambatan Enzim Xantin Oksidase

Pengujian kinetika penghambatan enzim xantin oksidase berdasarkan pada hasil pengujian penghambatan enzim xantin oksidase. Pengujian kinetika dengan inhibitor senyawa RTL1 dan RTL2 menggunakan konsentrasi senyawa dengan persentasi hambatan paling besar yaitu konsentrasi 10 µg/mL dan konsentrasi substrat 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; dan 0,25 mM.

Dari pengolahan data kinetika dengan inhibitor senyawa RTL1 (Tabel.12) dan senyawa RTL2 (Tabel 4.13) terhadap penghambatan enzim xantin oksidase. Berdasarkan plot Lineweaver-Burk menunjukkan titik potong pada sumbu y yang artinya memiliki tipe inhibisi kompetitif (Gambar 4.9 dan Gambar 10). Dari plot Lineweaver-Burk senyawa RTL1 dan RTL2 diperoleh tetapan konstanta Michaelis-Menten (K_m) yaitu senyawa RTL1 9,17 dan RTL2 8,36 sedangkan tanpa inhibitor nilai K_m 7,25 dengan laju reaksi (V_m) yang sama yaitu 0,34. Hasil ini menunjukkan tipe inhibisi kompetitif yaitu adanya inhibitor dapat menyebabkan perubahan nilai K_m menjadi lebih besar dari nilai K_m tanpa inhibitor dengan tidak mengubah nilai V_m (Voet, Voet dan Pratt, 2008).

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Tabel 4.13 Data uji kinetika tanpa inhibitor pada penghambatan enzim xantin oksidase

Konsentrasi (S)	Serapan (λ284)		Sx-KSx (V)	1/S	1/V
	Kontrol Sampel (KSx)	Sampel (Sx)			
0,05 mM	0,013	0,095±0,0028	0,082	20	12,19
0,10 mM	0,028	0,167±0,0028	0,139	10	7,19
0,15 mM	0,026	0,185±0,0035	0,159	6,67	6,29
0,20 mM	0,040	0,235±0,0049	0,195	4	5,13
0,25 mM	0,104	0,287±0,0021	0,183	5	5,41

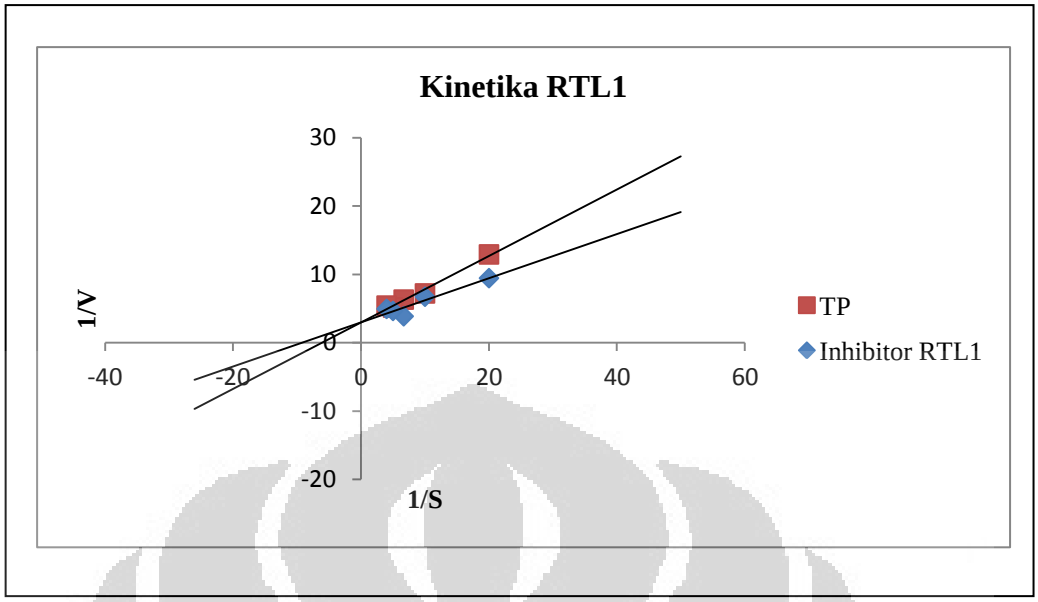
Tabel 4.14 Data uji kinetika senyawa RTL1 (konsentrasi 10 µg/mL) pada penghambatan enzim xantin oksidase

Konsentrasi (S)	Serapan (λ284 nm)		Sx-KSx (V)	1/S	1/V
	Kontrol Sampel (KSx)	Sampel (Sx)			
0,05 mM	0,011	0,117± 0,0021	0,106	20	9,43
0,10 mM	0,047	0,196±3,3969	0,149	10	6,71
0,15 mM	0,072	0,332±0,0035	0,260	6,67	3,85
0,20 mM	0,098	0,314±0,0007	0,216	4	4,63
0,25 mM	0,136	0,339±0,0042	0,203	5	4,93

Tabel 4.15 Data uji kinetika senyawa RTL2 (konsentrasi 10 µg/mL) pada penghambatan enzim xantin oksidase

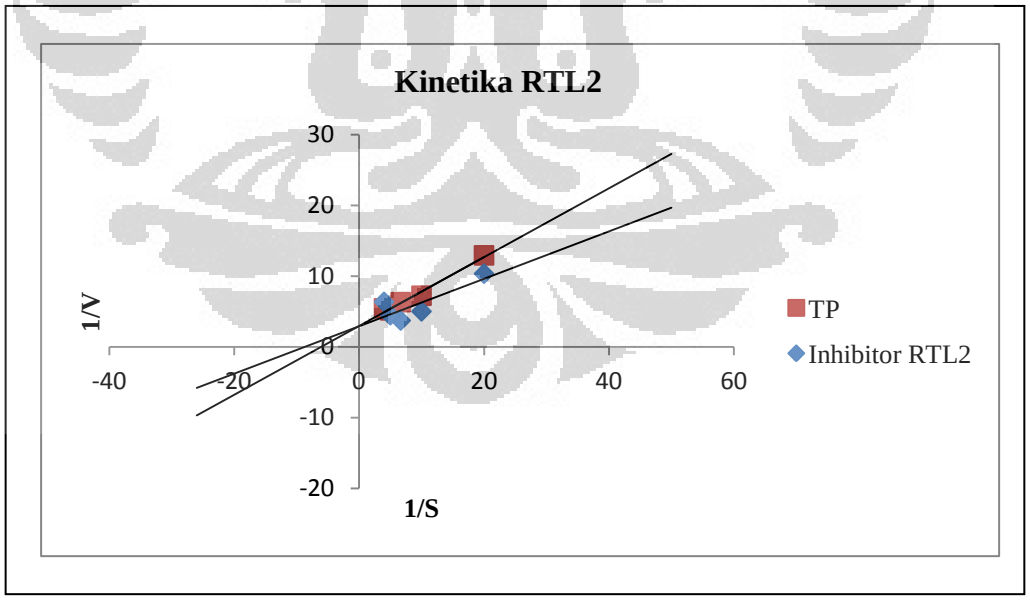
Konsentrasi (S)	Serapan (λ284 nm)		Sx-KSx (V)	1/S	1/V
	Kontrol Sampel (KSx)	Sampel (Sx)			
0,05 mM	0,017	0,114± 0,0021	0,097	20	10,31
0,10 mM	0,007	0,208±0,0035	0,201	10	4,98
0,15 mM	0,011	0,282±0,0007	0,271	6,67	3,69
0,20 mM	0,039	0,264±0,0042	0,225	4	4,44
0,25 mM	0,082	0,240±0,0063	0,158	5	6,33

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012



Keterangan : Grafik Kinetika inhibisi enzim xantin oksidase (Inhibitor RTL1) pada konsentrasi substrat xantin pada 0,05; 0,1; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM.

Gambar 4.9 Plot Lineweaver-Burk RTL1



Keterangan : Grafik Kinetika inhibisi enzim xantin oksidase (Inhibitor RTL2) pada konsentrasi substrat xantin pada 0,05; 0,1; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM

Gambar 4.10 Plot Lineweaver-Burk RTL2

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

Dari analisis data Lineweaver-Burk dan konstanta Michaelis-Menten kedua senyawa RTL1 dan RTL2 menunjukkan mekanisme inhibisi tipe kompetitif. Inhibitor kompetitif yaitu senyawa RTL1 dan RTL2 akan berkompetisi dengan substrat xantin untuk menduduki posisi aktif enzim yang akan mengakibatkan aktivitas enzim menurun atau berhenti, sehingga produksi enzim xantin oksidase berupa asam urat dan ROS tidak terbentuk.

Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil isolasi senyawa ekstrak *n*-butanol daun pletekan (*R. tuberosa* L.) diperoleh dua senyawa yaitu RTL1 dan RTL2. Senyawa RTL1 adalah senyawa kamarosida. Senyawa RTL2 adalah senyawa dimetil 2,3,5,6-tetrahidroksitereftalat.

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH senyawa RTL1 dengan nilai IC_{50} 28,79 µg/mL dan senyawa RTL2 dengan nilai IC_{50} 20,77 µg/mL, sedangkan metode penghambatan enzim xantin oksidase senyawa RTL1 dengan nilai IC_{50} 0,67 µg/mL dan senyawa RTL2 IC_{50} 0,21 µg/mL.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan senyawa RTL1 dan RTL2 memiliki mekanisme aktivitas peredaman radikal DPPH lebih baik dibandingkan melalui metode penghambatan enzim xantin oksidase.

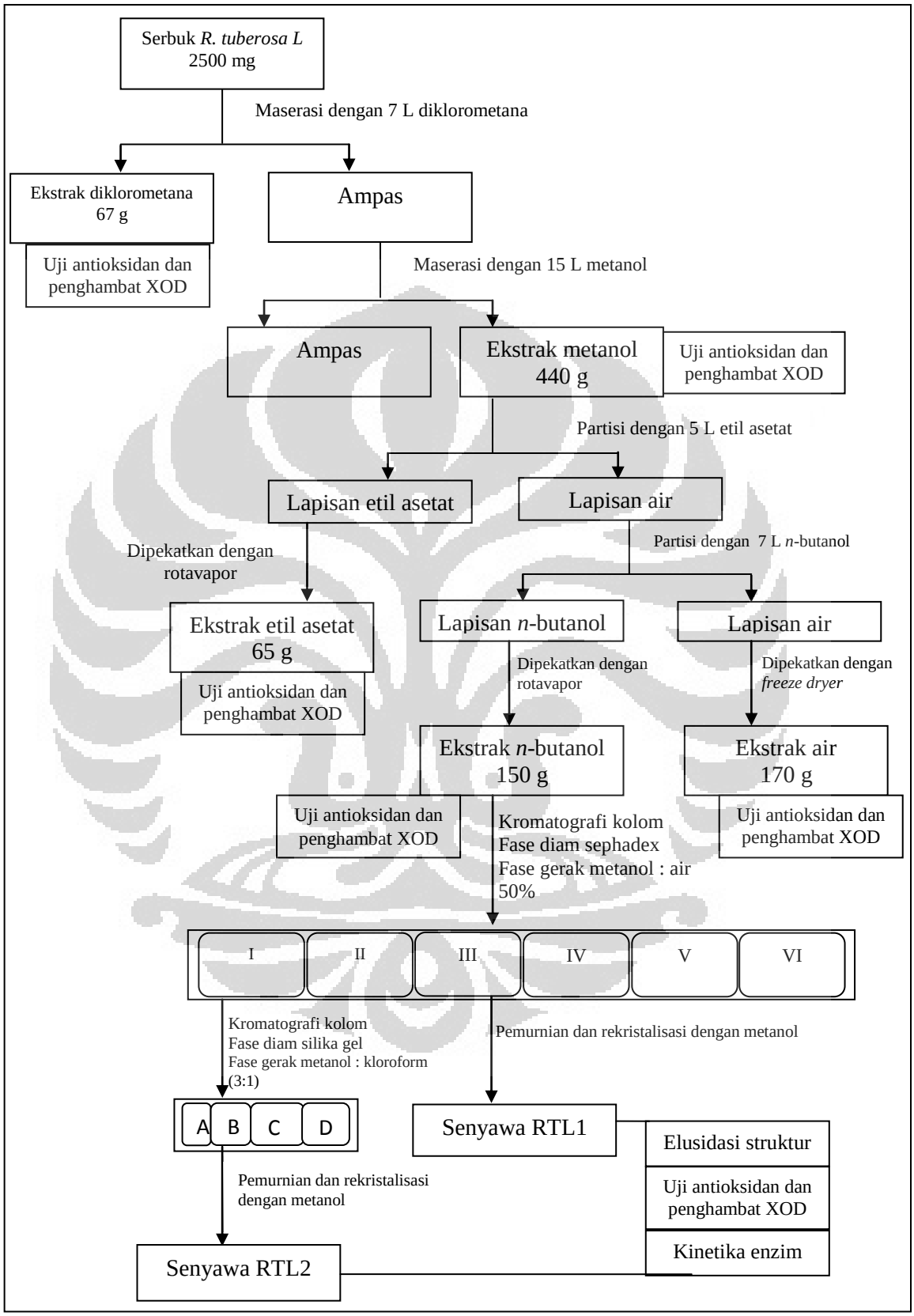
5.2 Saran

Penelitian ini masih perlu dilanjutkan karena beberapa ekstrak dan fraksi yang potensial masih berpeluang untuk ditemukannya senyawa-senyawa lain. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan berbagai macam uji bioaktivitas terhadap tumbuhan ini.

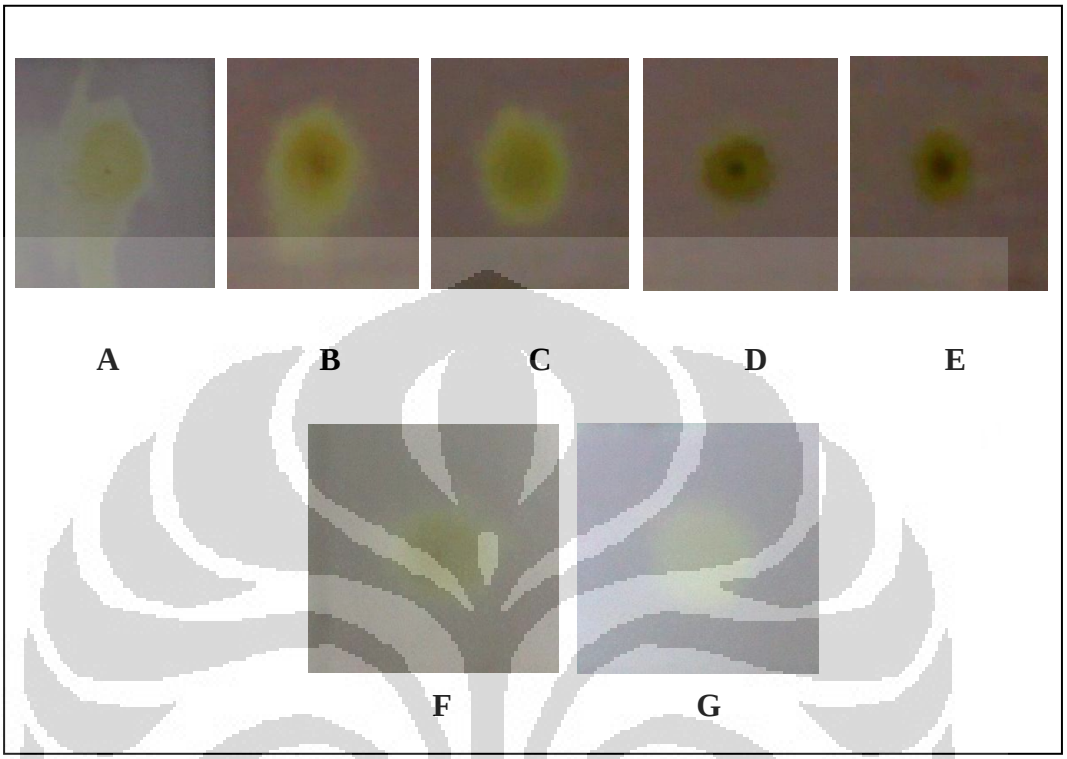
Isolasi dan..., Aktsar Roskiana Ahmad, FMIPA UI, 2012

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja



Lampiran 2. Identifikasi antioksidan secara kualitatif



Keterangan :

Lempeng : pelat silika gel

Reagen penyemprot : DPPH

A = ekstrak *n*-butanol

B = ekstrak etil asetat

C = ekstrak metanol

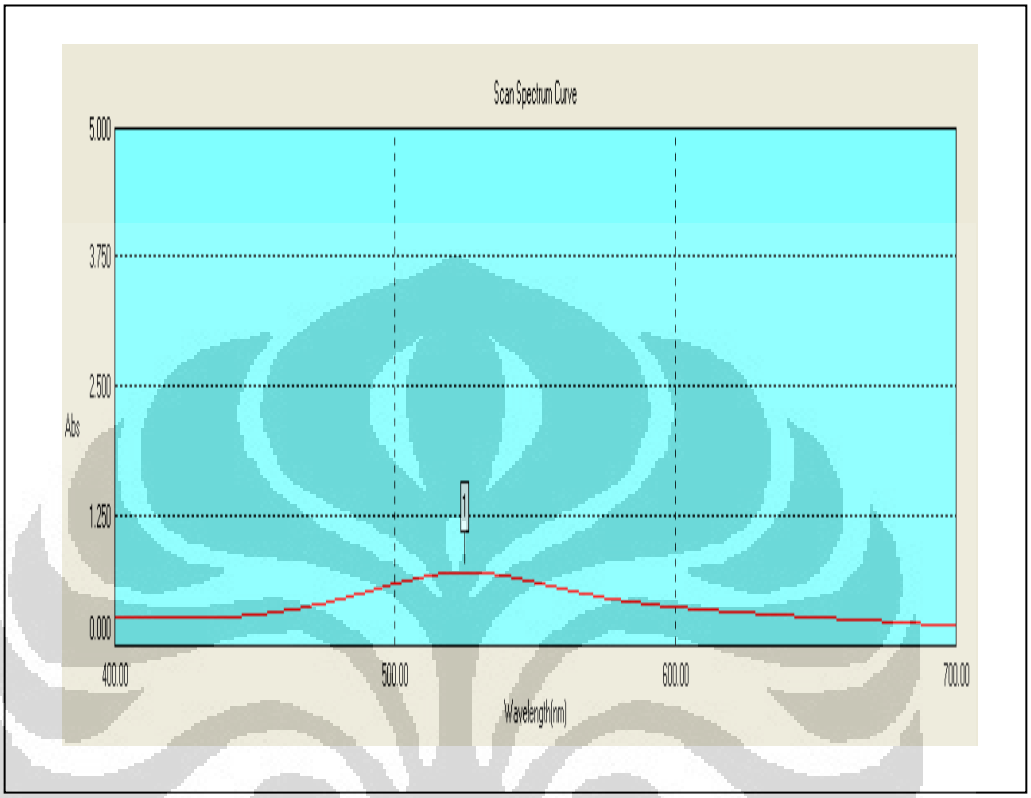
D = ekstrak diklorometana

E = ekstrak air

F = senyawa RTL1

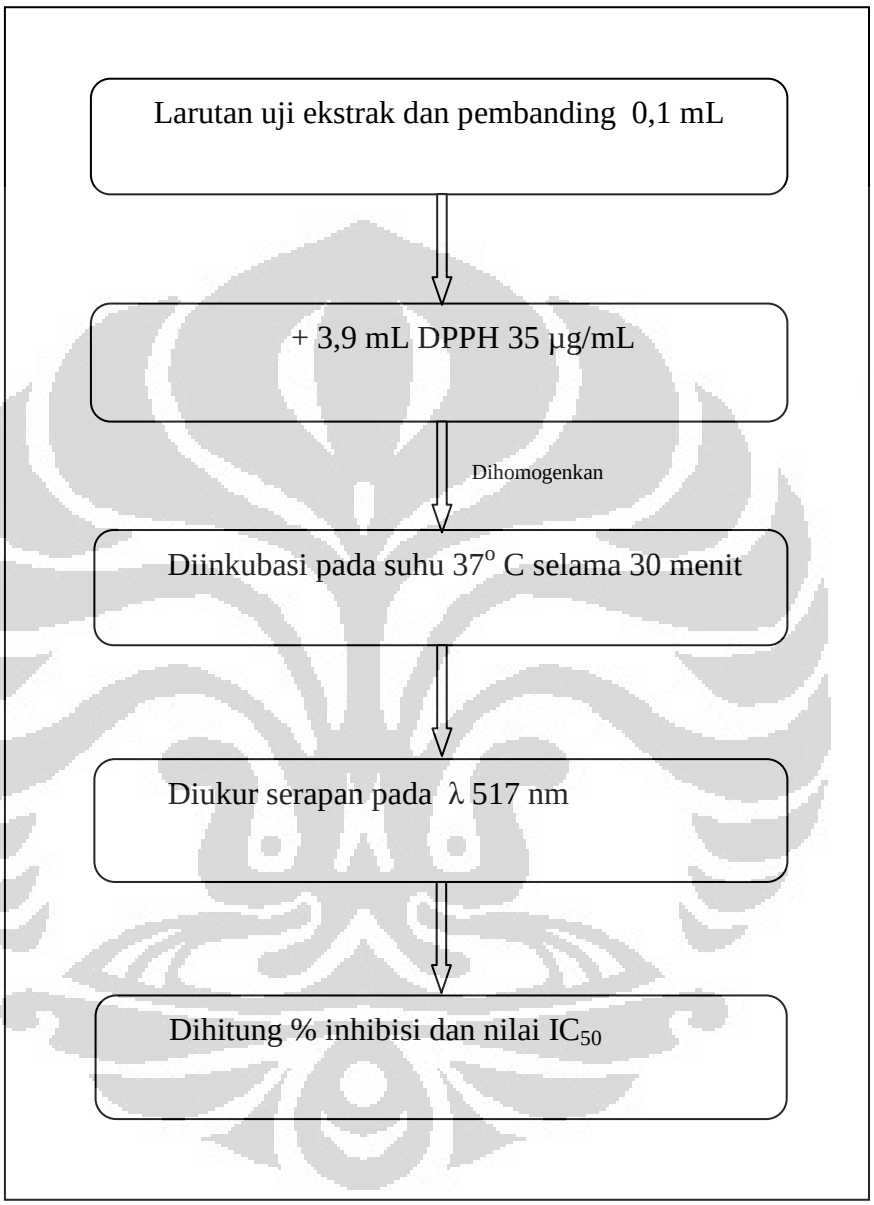
G = senyawa RTL2

Lampiran 3. Spektrum penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

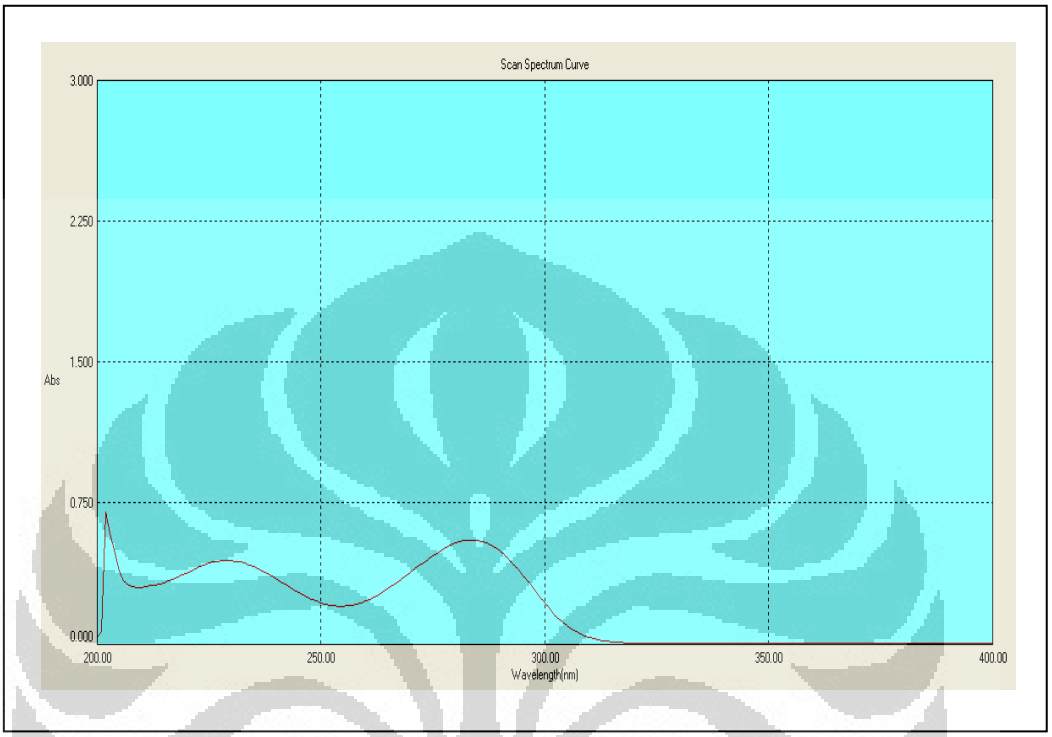


No.	Pita	Panjang gelombang (nm)	Serapan
1	Pita 1	517	0.58

Lampiran 4. Skema kerja pengujian antioksidan dengan metode peredaman radikal DPPH



Lampiran 5. Spektrum penentuan panjang gelombang maksimum pada pengujian penghambatan enzim xantin oksidase



No.	Pita	Panjang gelombang (nm)	Serapan
1	Pita 1	284	0,556
2	Pita 2	235	0,485

Lampiran 6. Skema kerja pengujian penghambatan enzim xantin oksidase

Lampiran 7. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin oksidase 0,1 unit/ml.

Pada label kemasan dituliskan :

0,4-1 unit/mg protein

45,45 mg *solid* 0,11 unit/mg *solid*

0,8 unit/ mg protein

a. Perhitungan kesetaraan miligram protein, miligram *solid* dan umit xantin oksidase.

45,45 mg solid x 0,11 unit/mg *solid* = 4,9995 unit

$\frac{4{,}9995\ unit}{0{,}8\frac{unit}{mg}\ protein}$ = 6,249375 mg ∞ 6,25 mg protein

$\frac{45{,}45\ mg\ solid}{6{,}25\ mg\ protein} = \frac{7{,}27\ mg\ solid}{1\ mg\ protein}$ = 7,27 mg *solid*/ 1 mg protein

1 mg protein ∞ 7,27 mg *solid* ∞ 0,8 unit

b. Perhitungan jumlah miligram yang ditimbang :

Pembuatan larutan enzim xantin oksidase 0,1 unit/ mL :

Dibuat dalam larutan 1 mL = $7{,}27\ mg\ x\ \frac{0{,}1\ unit}{0{,}8\ unit} = 0{,}90875\ mg$

Dilarutkan dalam 10 mL = 10 mL x $0{,}90875\ mg$ = 9,0875 mg

Ditimbang 9,0875 mg enzim xantin oksidase kemudian dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat

Lampiran 8. Perhitungan dan pembuatan larutan xantin

Perhitungan larutan substrat xantin

Xantin , BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

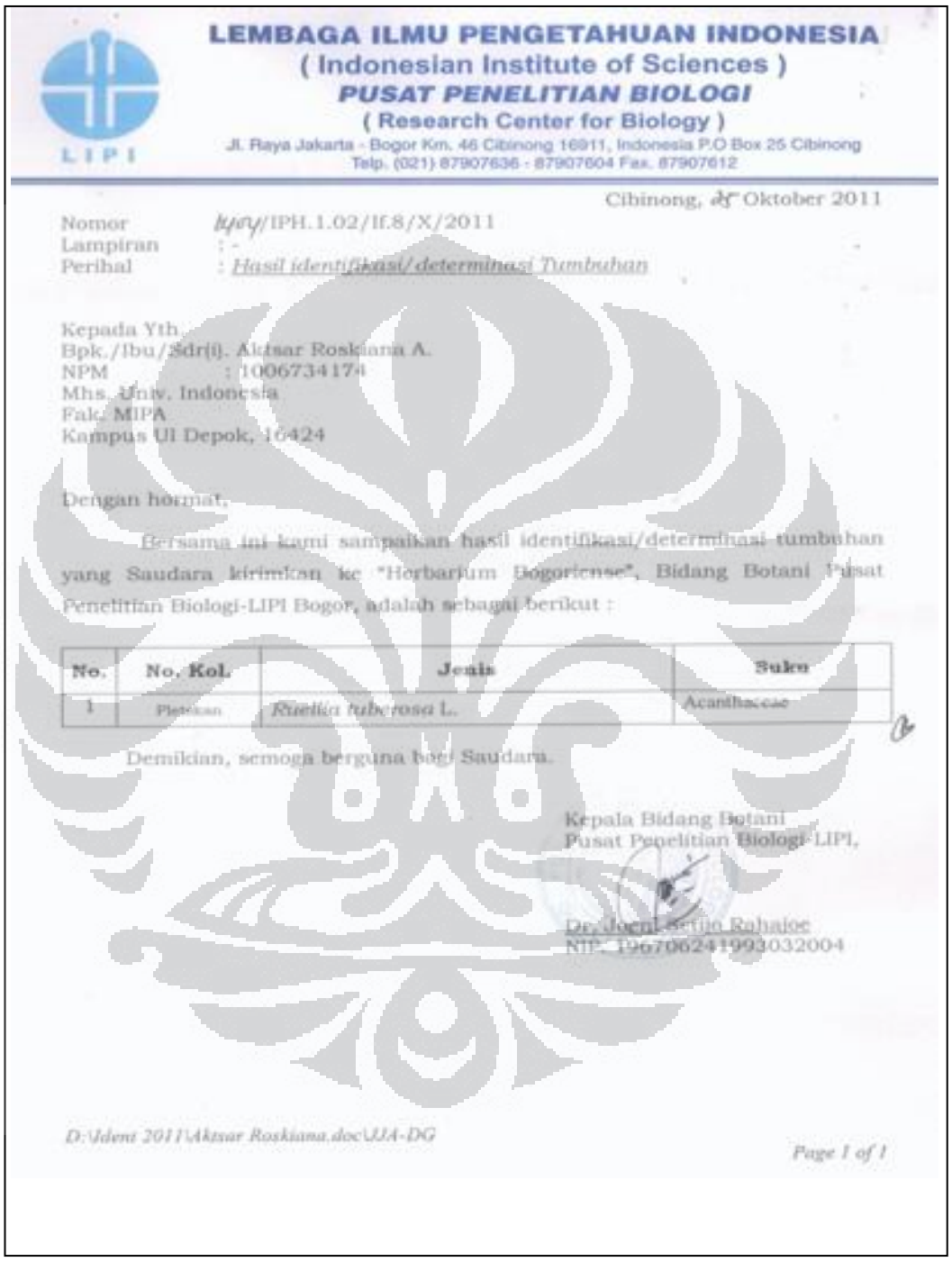
Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg

mmol xantin = $\frac{15{,}21\ mg}{152{,}1} = 0{,}1$ mmol

dilarutkan ke dalam 100 ml air suling

mM larutan substrat xantin = $\frac{0{,}1 mmol}{0{,}1\ liter} = 1\ mM$

Lampiran 9. Hasil determinasi tanaman



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)
Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 25 Oktober 2011

Nomor : [illegible]/IPH.1.02/If.8/X/2011
Lampiran : -
Perihal : *Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan*

Kepada Yth
Bpk./Ibu/Sdr(i). Aktsar Roskiana A.
NPM : 1006734176
Mhs. Univ. Indonesia
Fak. MIPA
Kampus UI Depok, 16424

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Pleksan	*Ruellia tuberosa* L.	Acanthaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Dr. Joeni Setijo Rahaloe
NIP. 196706241993032004

D:\Ident 2011\Aktsar Roskiana.doc\JJA-DG

Page 1 of 1

Lampiran 10. Sertifikat analisis xantin oksidase

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
XANTHINE OXIDASE FROM BOVINE MILK

Product Number:	**X4376**
Lot Number:	**110M7023**
Brand:	SIGMA
CAS Number:	9002-17-9
MDL Number:	MFCD00082145
Storage Temperature:	Store at 2 - 8 °C
Quality Release Date:	21 DEC 2010
Recommended Retest Date:	DEC 2012

Test	Specification	Result
Protein by Biuret	10.0 - 25.0 %	14.1 %
units/mg protein	0.4 - 1.0	0.8
One unit will convert 1.0 micromole of xanthine to uric acid per minute at pH 7.5 at 25 deg C		
Activity	≤ 0.2 %	0.2 %
Uricase		
Recommended Retest Period	----------	----------
2 years		

Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Lampiran 11. Sertifikat analisis xantin

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:
Xanthine - BioUltra, ≥99%

Product Number:	**X4002**
Lot Number:	**077K53071V**
Brand:	SIGMA
CAS Number:	69-89-6
MDL Number:	MFCD00078453
Formula:	$C_5H_4N_4O_2$
Formula Weight:	152.11 g/mol
Quality Release Date:	25 NOV 2008
Date Retested:	01 JUN 2011
Recommended Retest Date:	JUN 2015

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Light Yellow	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Light Yellow	Colorless
Solubility (Turbidity) 0.1 M solution in 1 M NaOH	Clear	Clear
Residue on Ignition < or = 0.1%	Pass	Pass
Aluminum (Al) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Phosphorus (P) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Lead (Pb) < or = 0.001%	Pass	Pass
Calcium (Ca) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Magnesium (Mg) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Sodium (Na) < or = 0.005%	Pass	Pass
Iron (Fe) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Copper (Cu) < or = 0.0005%	Pass	Pass

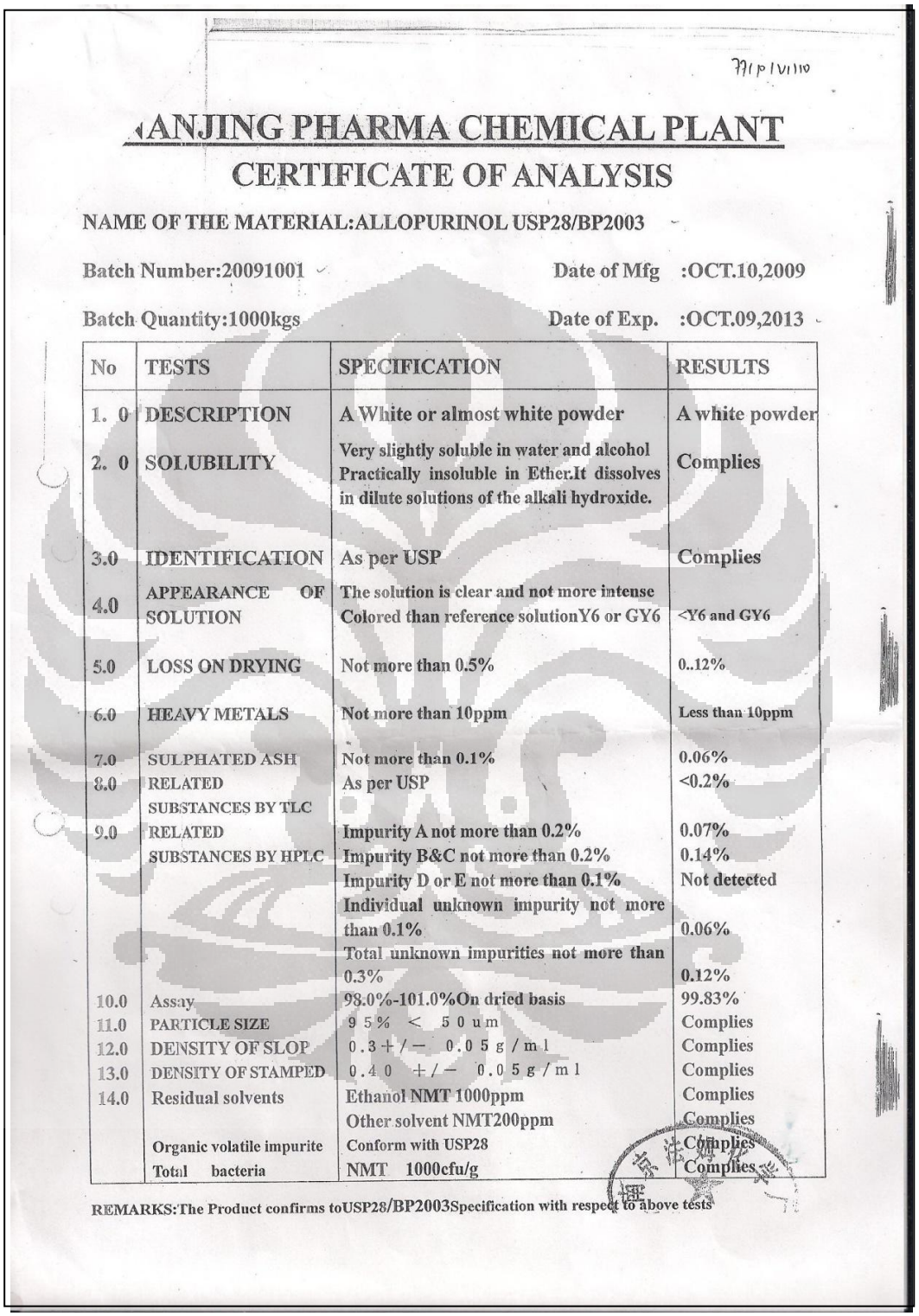
Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Product Number:	**X4376**
Lot Number:	**110M7023**
Brand:	SIGMA
CAS Number:	9002-17-9
MDL Number:	MFCD00082145
Storage Temperature:	Store at 2 - 8 ℃
Quality Release Date:	21 DEC 2010
Recommended Retest Date:	DEC 2012

Test	Specification	Result
Protein by Biuret	10.0 - 25.0 %	14.1 %
units/mg protein	0.4 - 1.0	0.8
One unit will convert 1.0 micromole of xanthine to uric acid per minute at pH 7.5 at 25 deg C		
Activity	≤ 0.2 %	0.2 %
Uricase		
Recommended Retest Period	----------	----------
2 years		

Rodney Burbach, Manager
Analytical Services
St. Louis, Missouri US

Lampiran 12. Sertifikat analisis allopurinol



ANJING PHARMA CHEMICAL PLANT

CERTIFICATE OF ANALYSIS

NAME OF THE MATERIAL:ALLOPURINOL USP28/BP2003

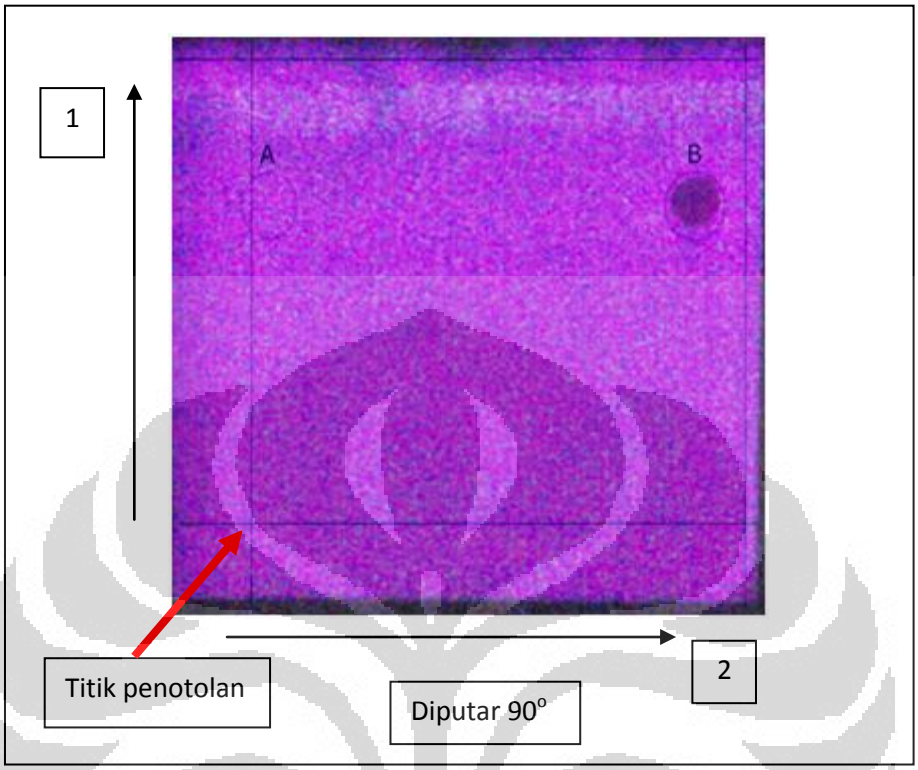
Batch Number:20091001 **Date of Mfg :OCT.10,2009**

Batch Quantity:1000kgs **Date of Exp. :OCT.09,2013**

No	TESTS	SPECIFICATION	RESULTS
1. 0	DESCRIPTION	A White or almost white powder	A white powder
2. 0	SOLUBILITY	Very slightly soluble in water and alcohol Practically insoluble in Ether.It dissolves in dilute solutions of the alkali hydroxide.	Complies
3.0	IDENTIFICATION	As per USP	Complies
4.0	APPEARANCE OF SOLUTION	The solution is clear and not more intense Colored than reference solutionY6 or GY6	<Y6 and GY6
5.0	LOSS ON DRYING	Not more than 0.5%	0..12%
6.0	HEAVY METALS	Not more than 10ppm	Less than 10ppm
7.0	SULPHATED ASH	Not more than 0.1%	0.06%
8.0	RELATED SUBSTANCES BY TLC	As per USP	<0.2%
9.0	RELATED SUBSTANCES BY HPLC	Impurity A not more than 0.2%	0.07%
		Impurity B&C not more than 0.2%	0.14%
		Impurity D or E not more than 0.1%	Not detected
		Individual unknown impurity not more than 0.1%	0.06%
		Total unknown impurities not more than 0.3%	0.12%
10.0	Assay	98.0%-101.0%On dried basis	99.83%
11.0	PARTICLE SIZE	95% < 50um	Complies
12.0	DENSITY OF SLOP	0.3+/- 0.05g/ml	Complies
13.0	DENSITY OF STAMPED	0.40 +/- 0.05g/ml	Complies
14.0	Residual solvents	Ethanol NMT 1000ppm	Complies
		Other solvent NMT200ppm	Complies
	Organic volatile impurite	Conform with USP28	Complies
	Total bacteria	NMT 1000cfu/g	Complies

REMARKS:The Product confirms toUSP28/BP2003Specification with respect to above tests

Lampiran 13. KLT 2-arah senyawa RTL1



Keterangan :

Sampel : senyawa RTL1

Fase diam : silika gel GF_{254} 10x10

Penampak bercak : UV 366 nm

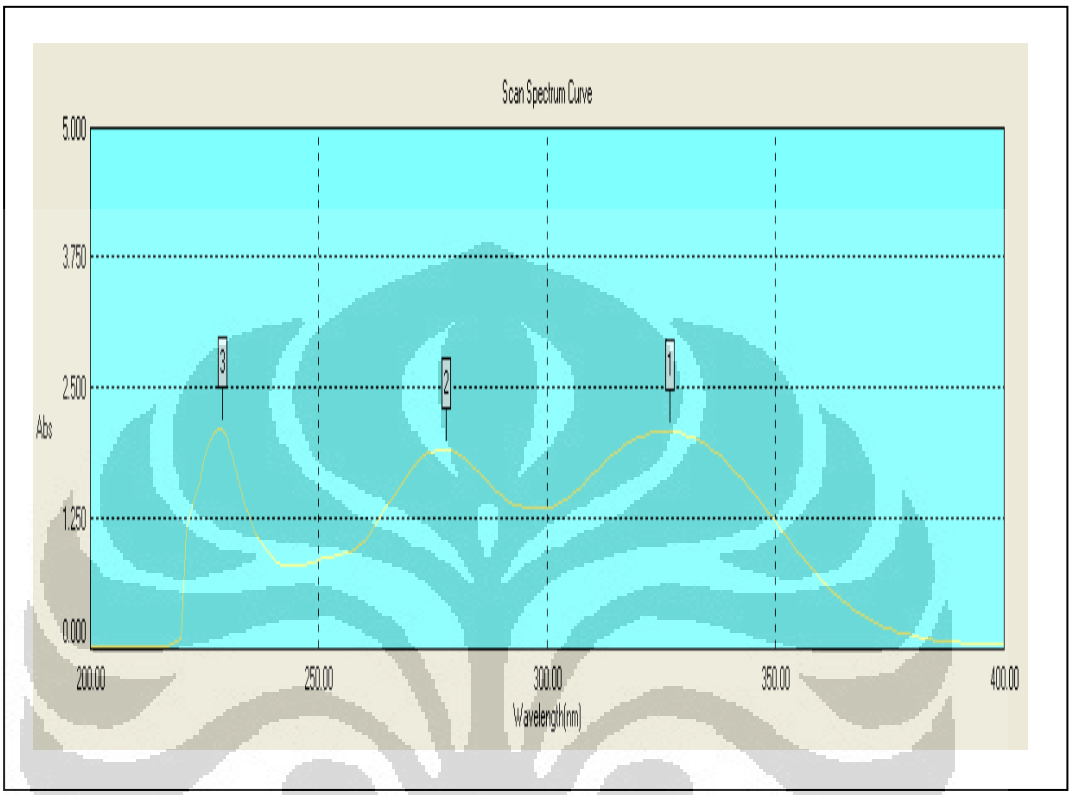
Fase gerak : 1 = BAW (4:1:5)

2 = asam asetat 15%

Nilai Rf : A = 0,75

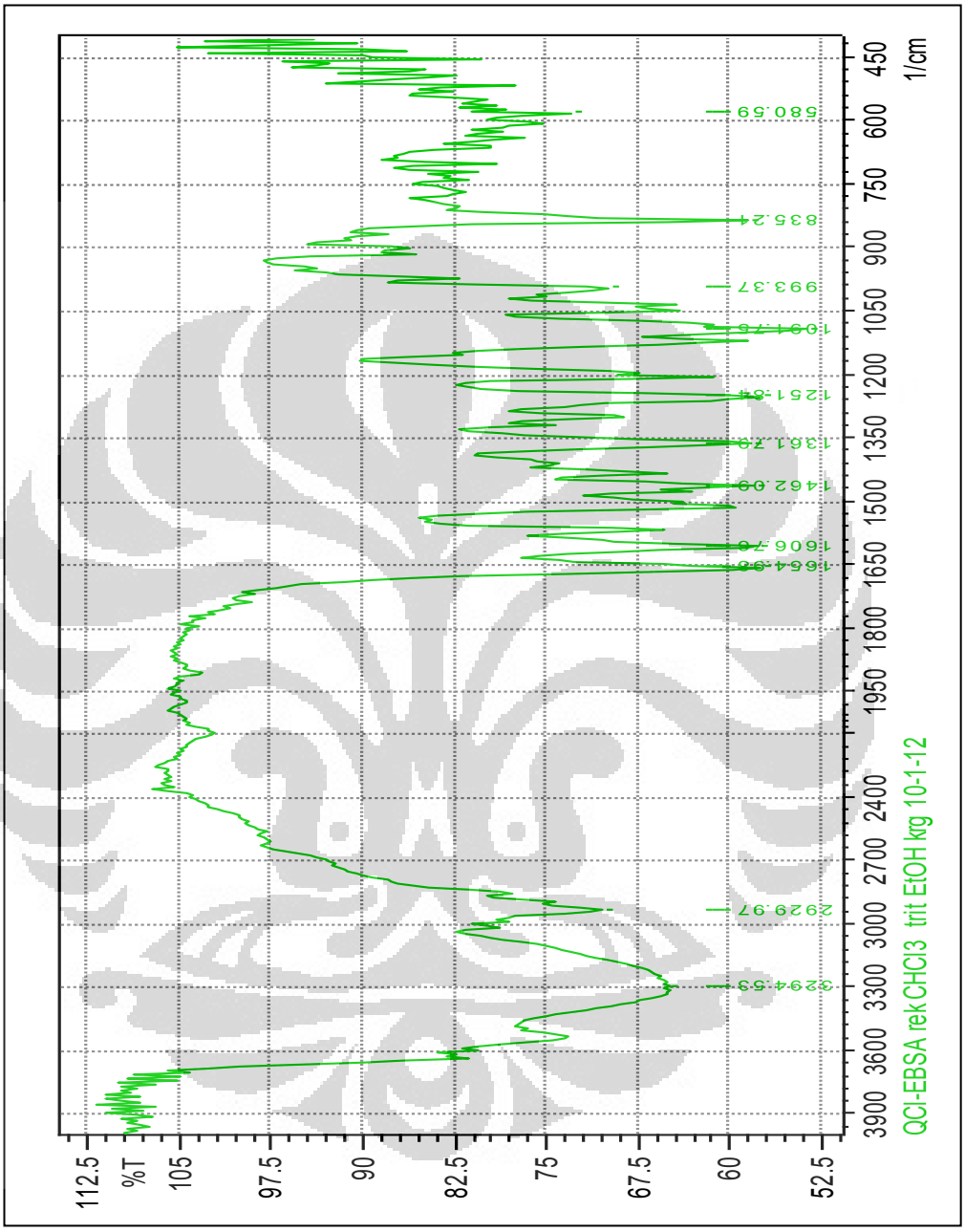
B = 0,875

Lampiran 14. Profil spektrofotormetri UV-Vis senyawa RTL1

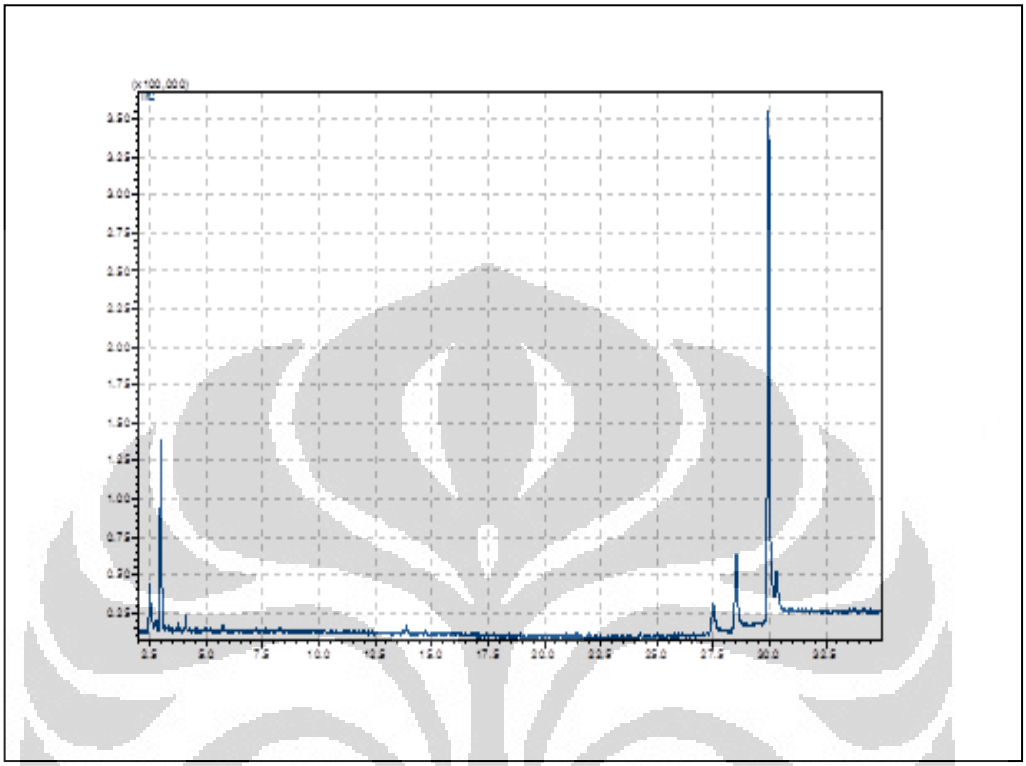


No.	Pita	Panjang Gelombang (nm)	Serapan
1	Pita 1	327	2.084
2	Pita 2	278	1.915
3	Pita 2	229	2.12

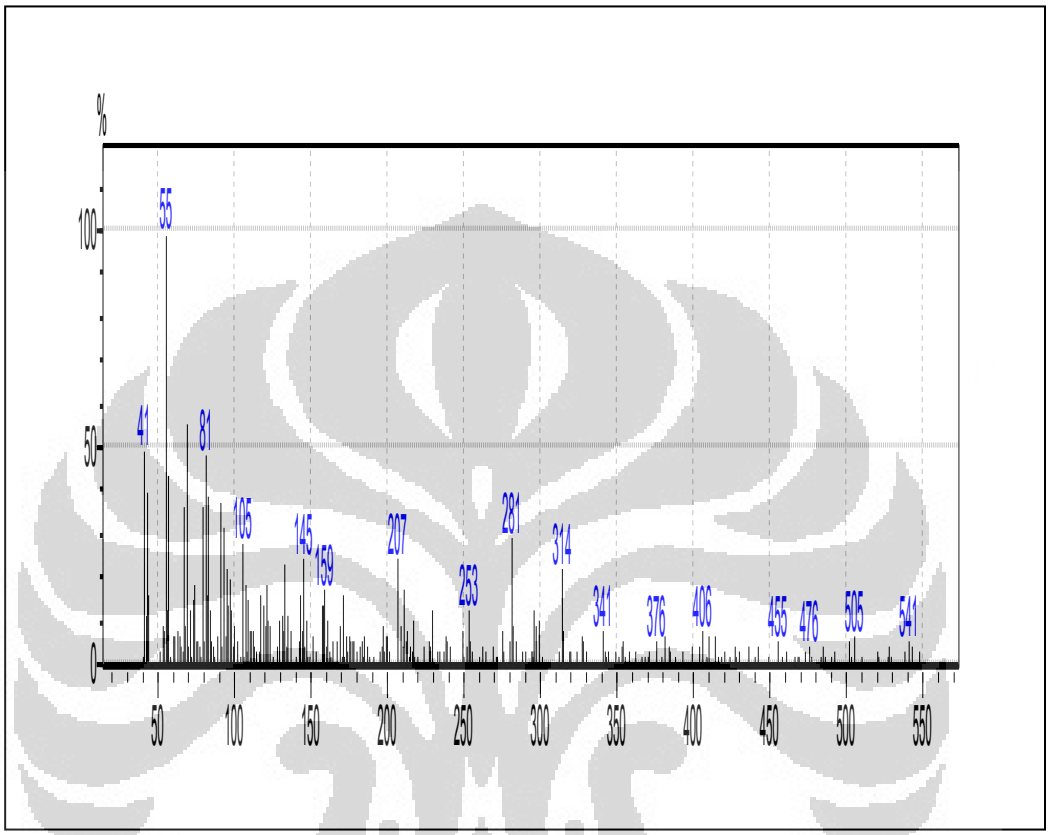
Lampiran 15. Spektrum IR senyawa RTL1



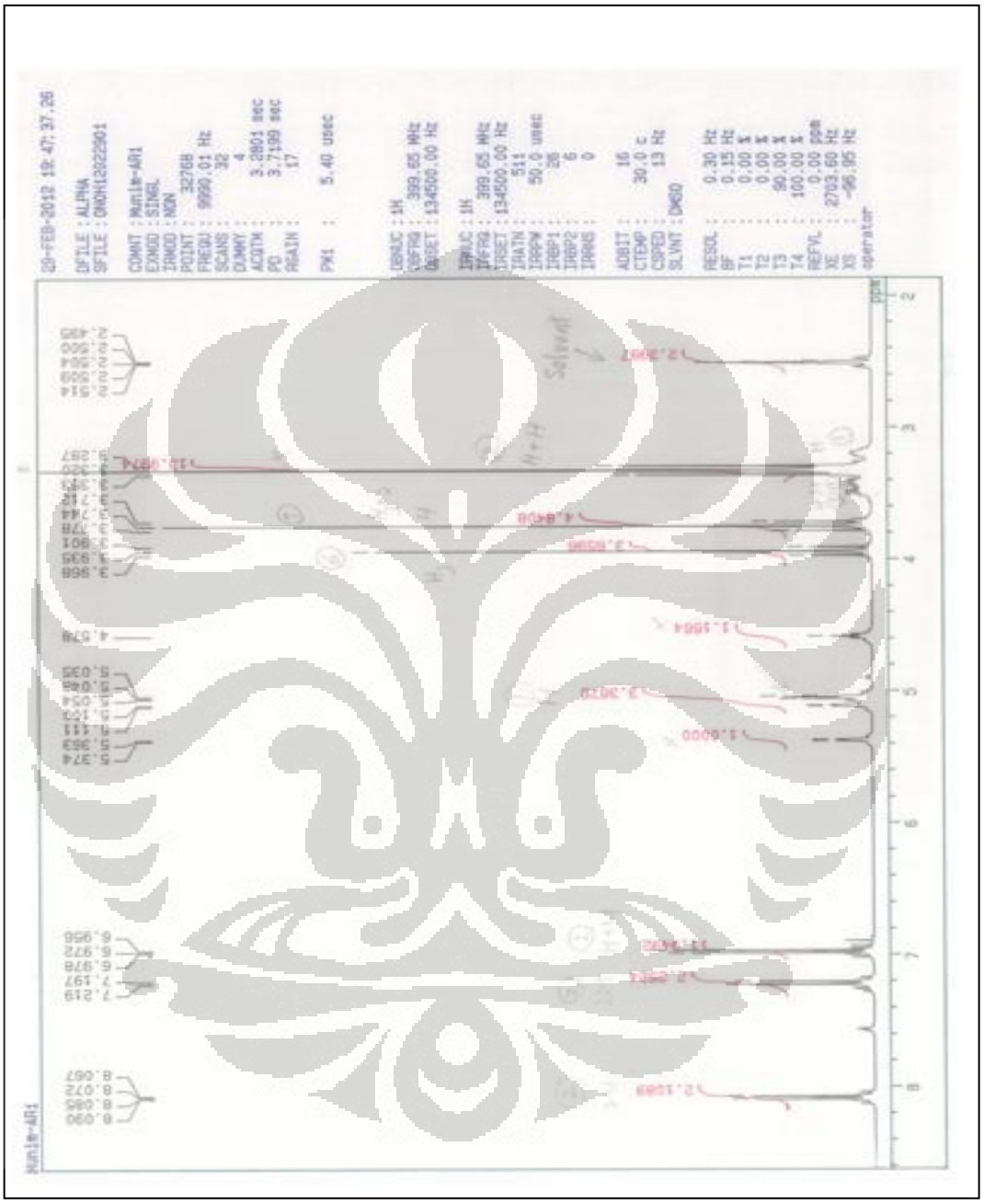
Lampiran 16. Spektrum GC-MS senyawa RTL1



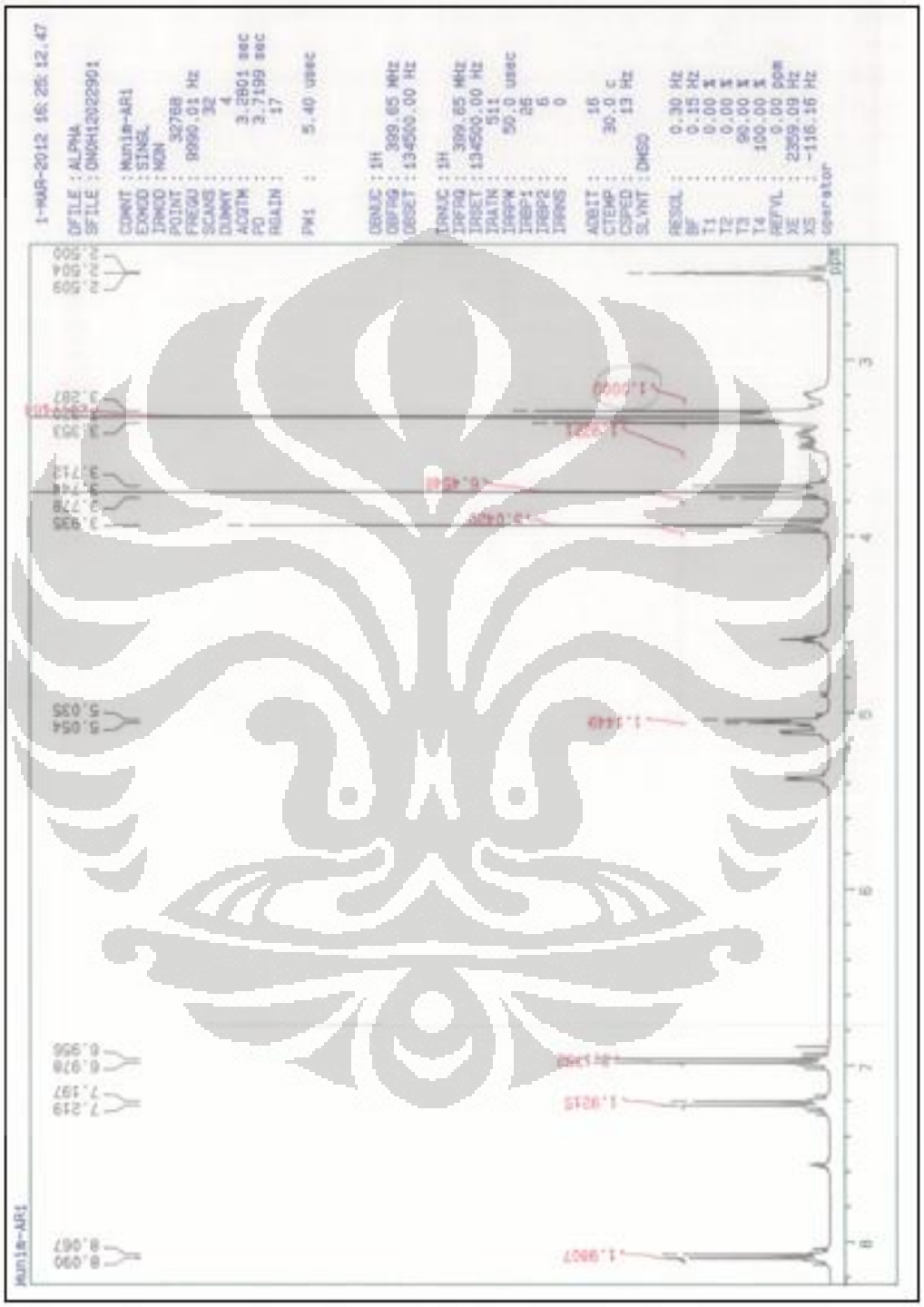
Lampiran 17. Pola fragmentasi senyawa RTL1



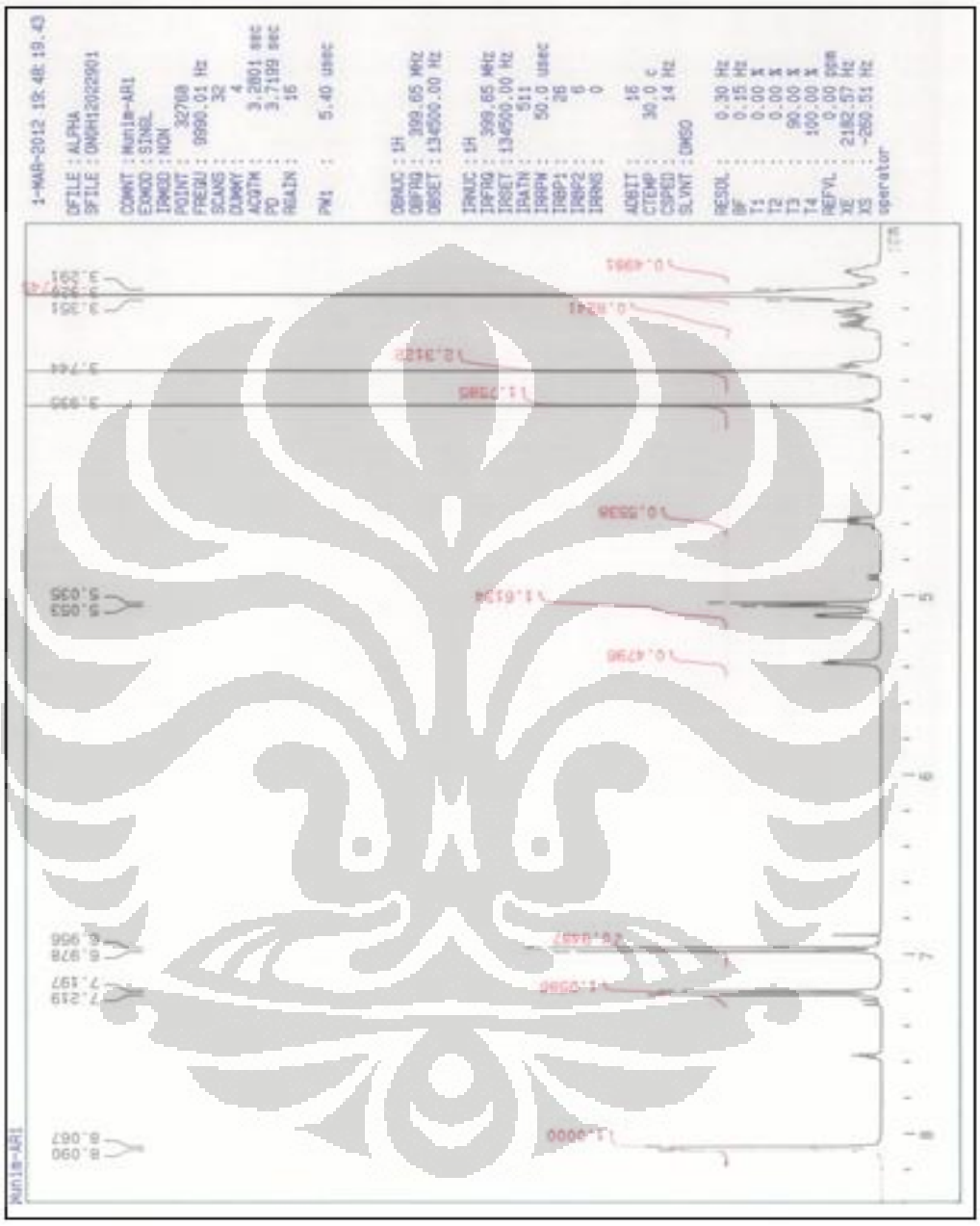
Lampiran 18. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1



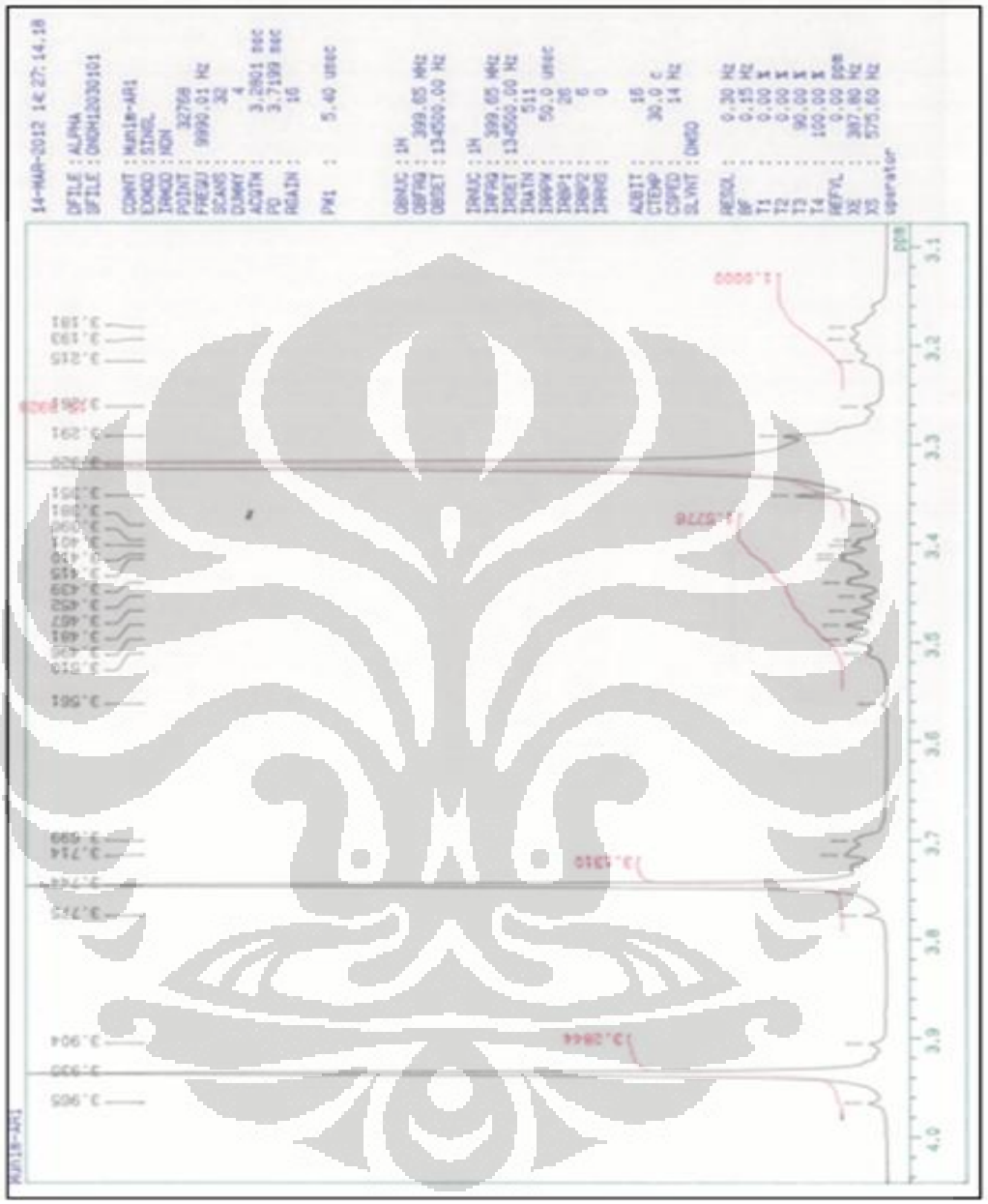
Lampiran 18a. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1 (perbesaran)



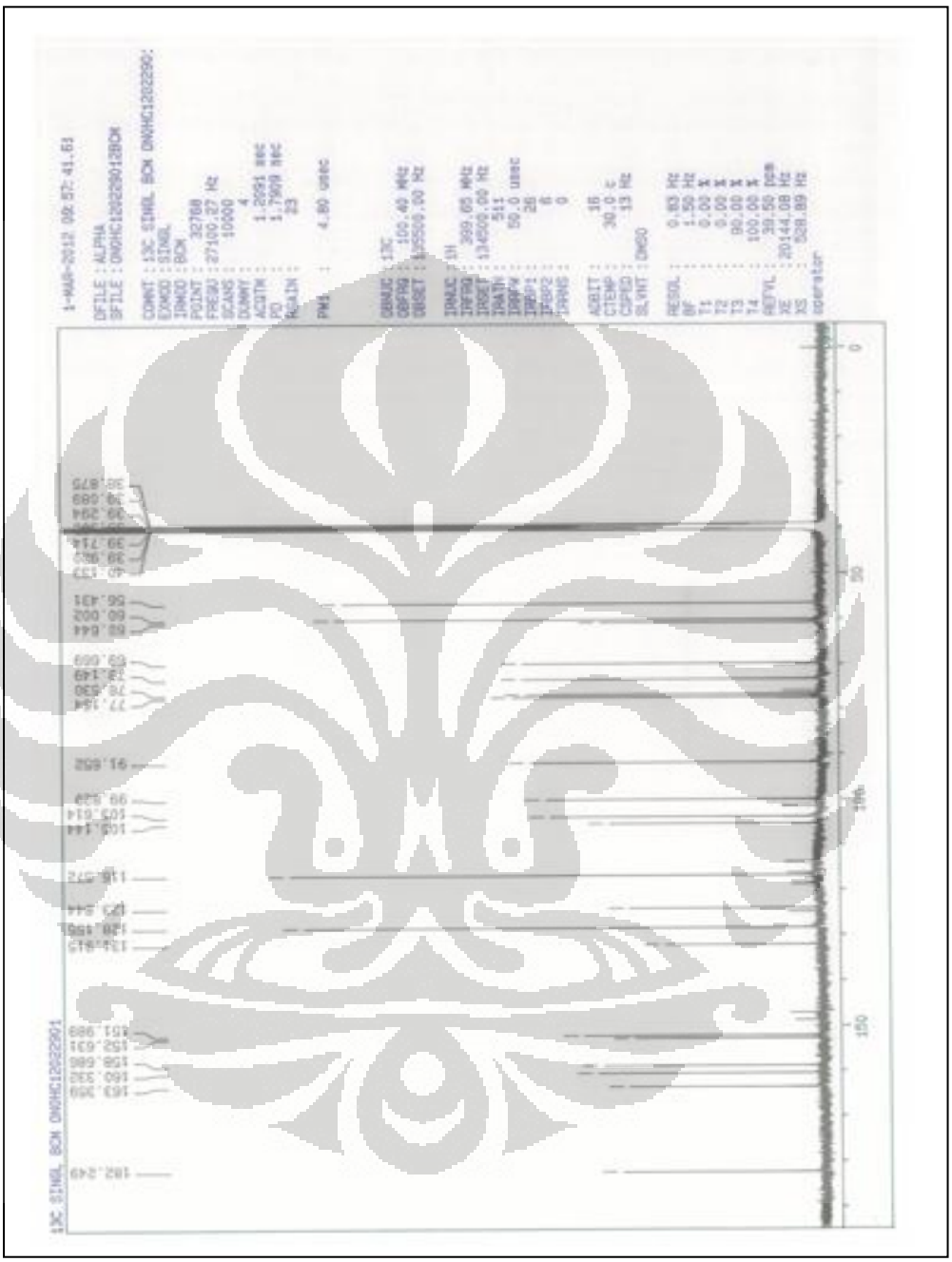
Lampiran 18b. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1 (perbesaran)



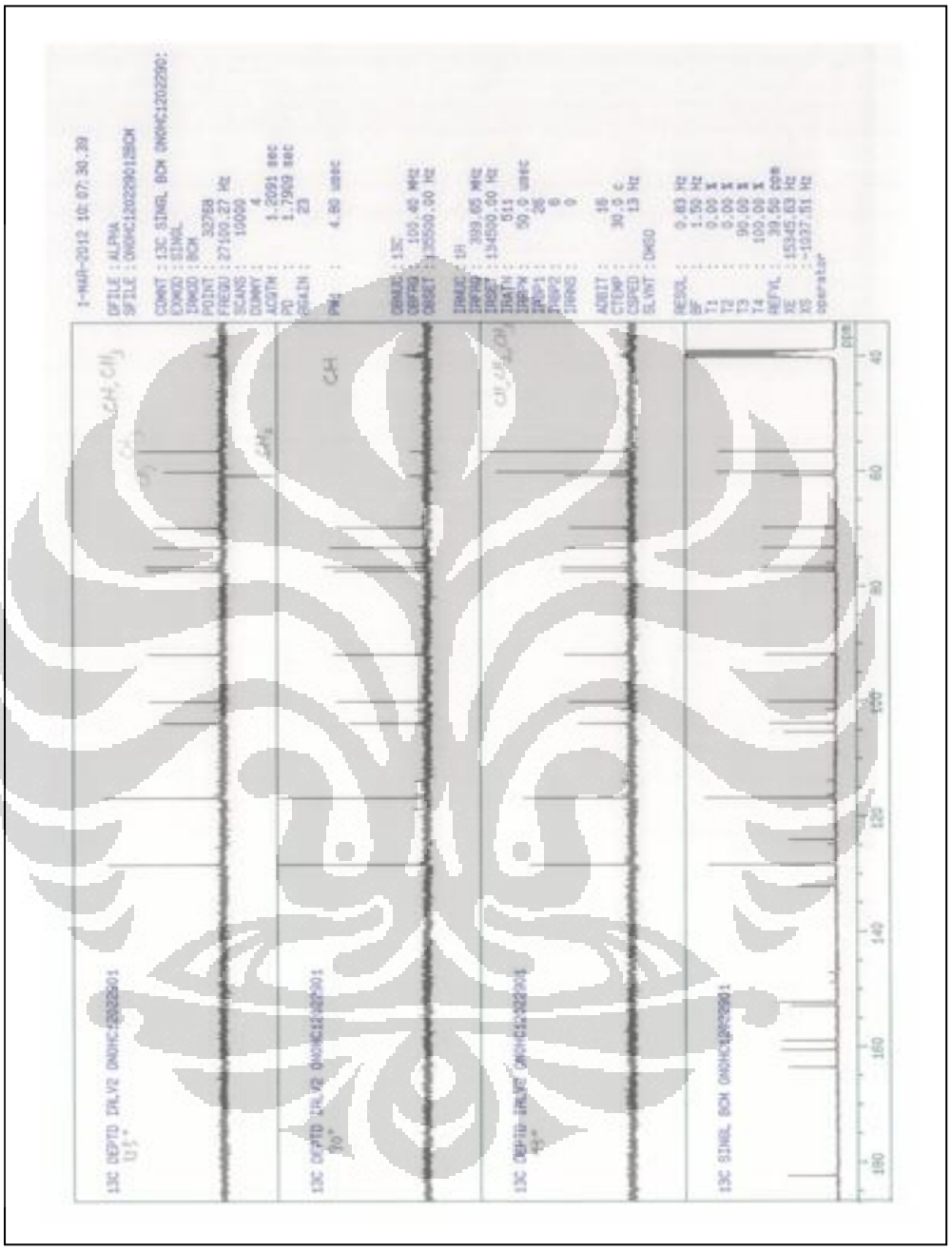
Lampiran 18c. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1 (perbesaran)



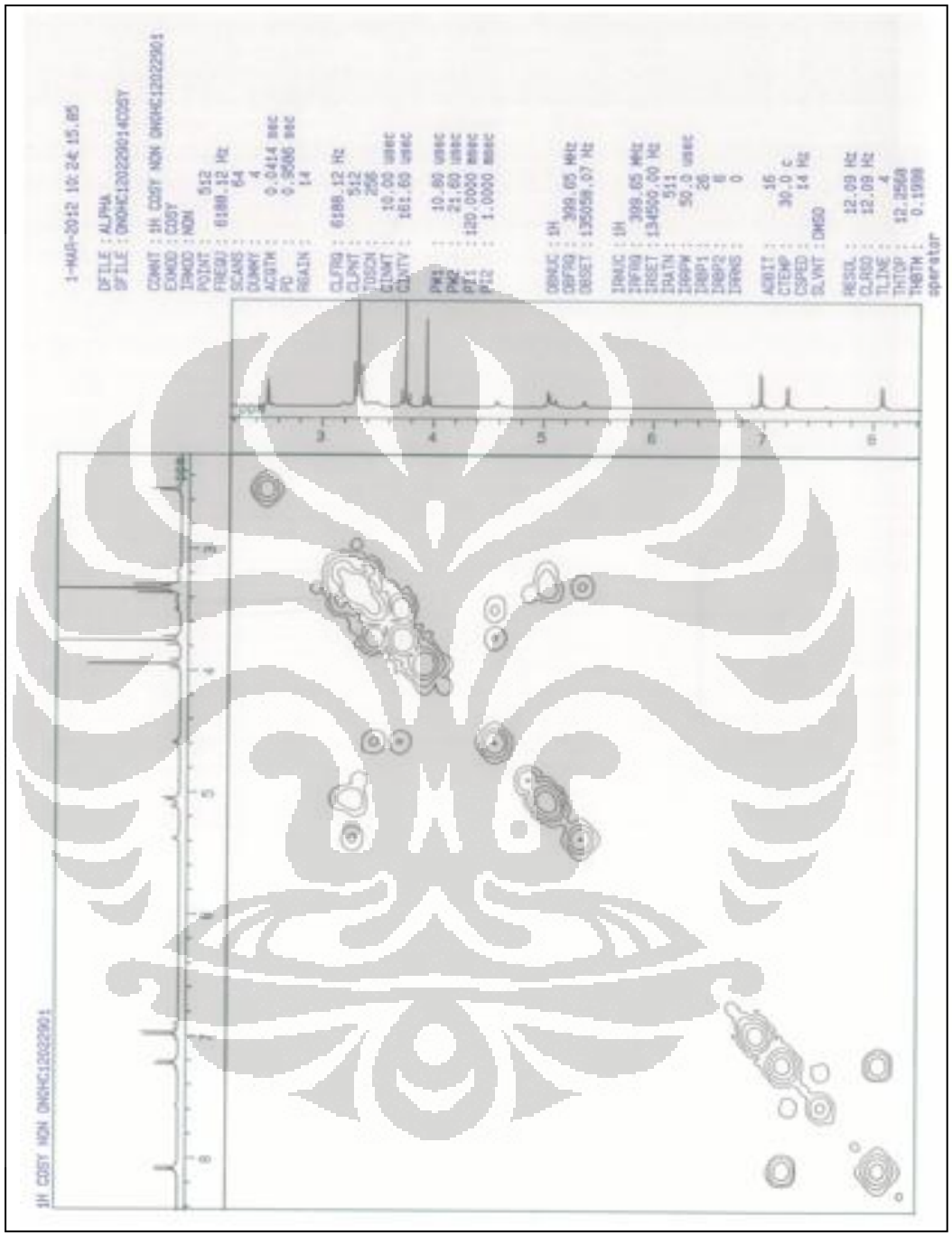
Lampiran 19. Spektrum ^{13}CNMR senyawa RTL1



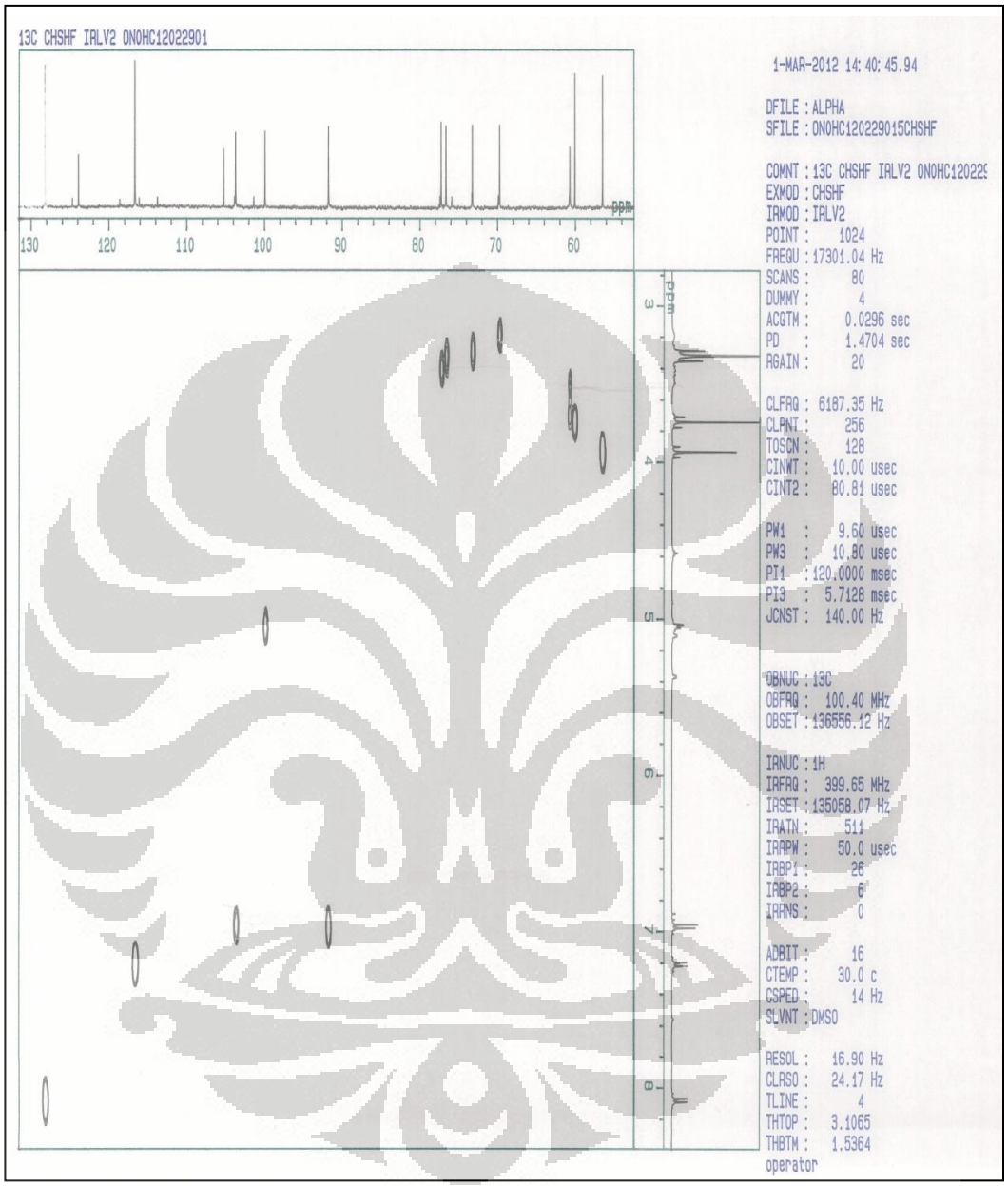
Lampiran 20. Spektrum NMR-2D DEPT senyawa RTL1



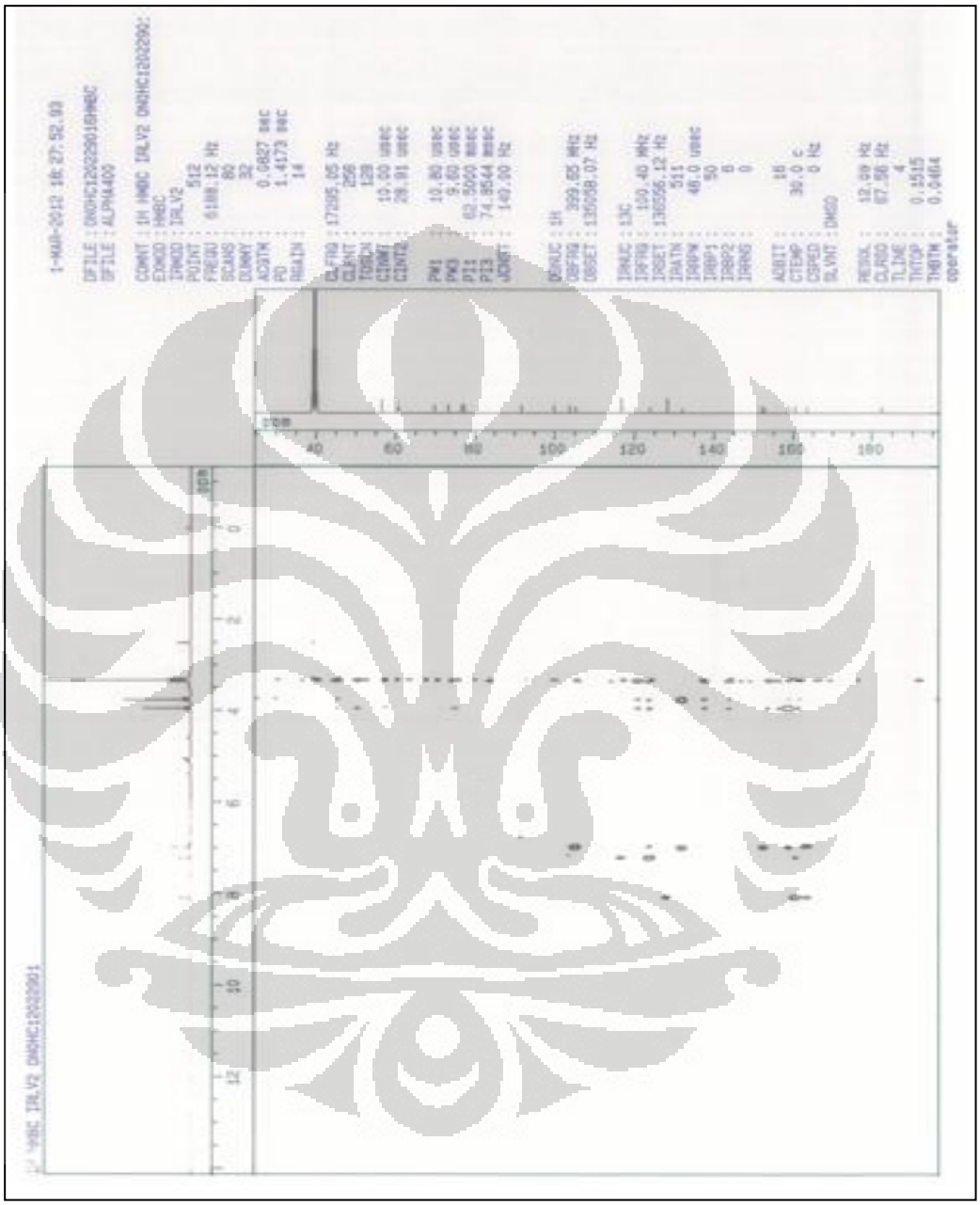
Lampiran 21. Spektrum NMR-2D H-H COSY senyawa RTL1



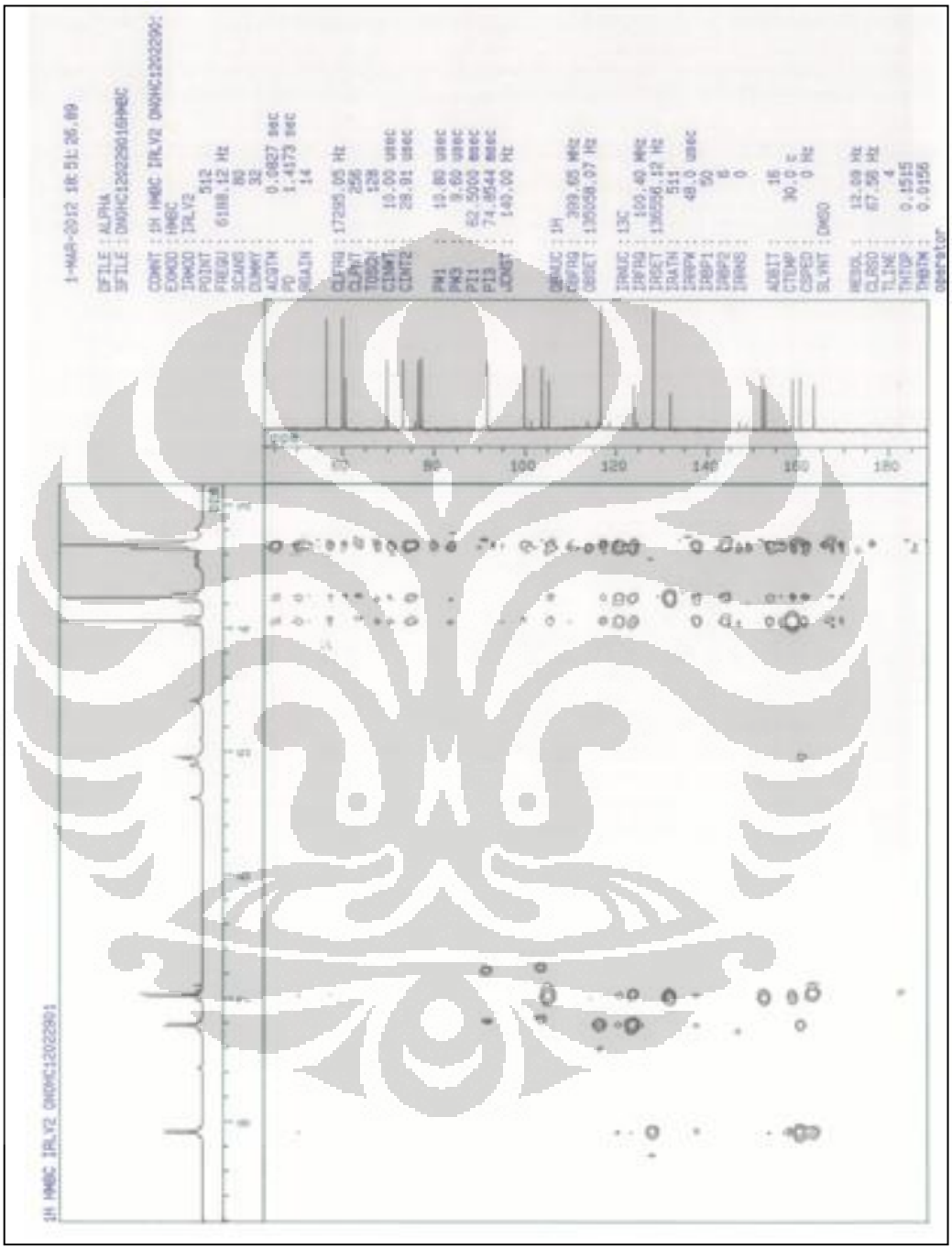
Lampiran 22. Spektrum NMR-2D C-H COSY senyawa RTL1



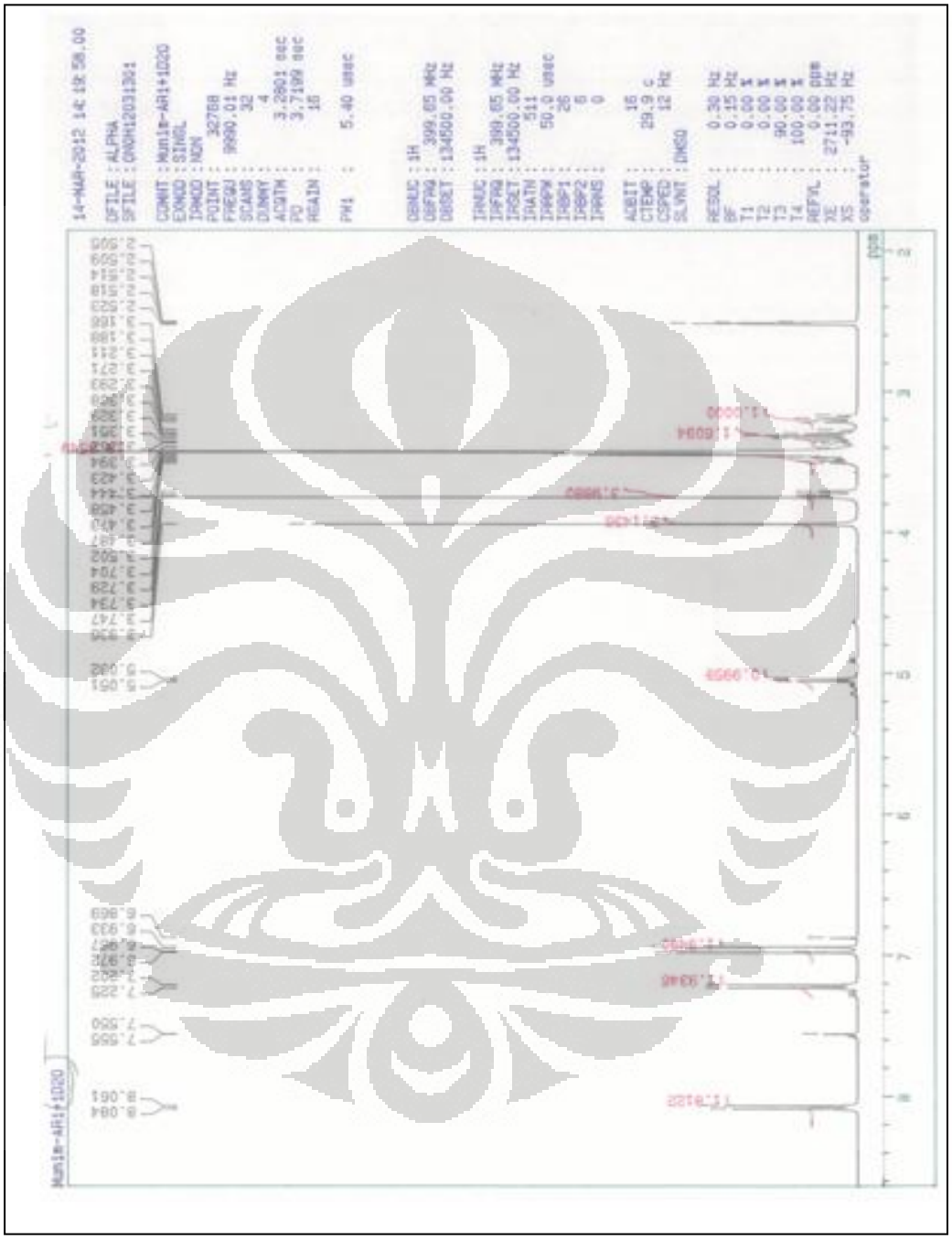
Lampiran 23. Spektrum NMR-2D HMBC senyawa RTL1



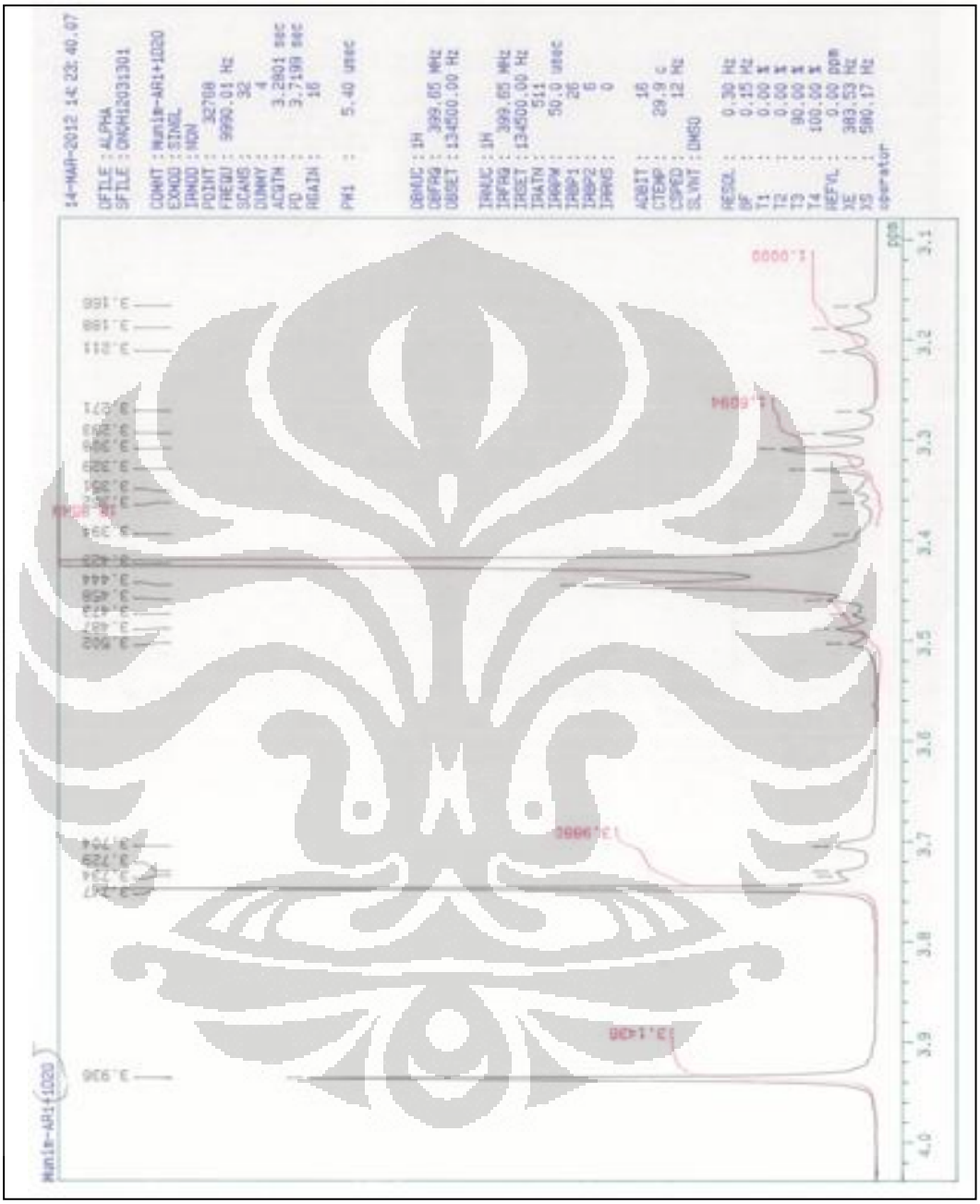
Lampiran 23a. Spektrum NMR-2D HMBC senyawa RTL1 (perbesaran)



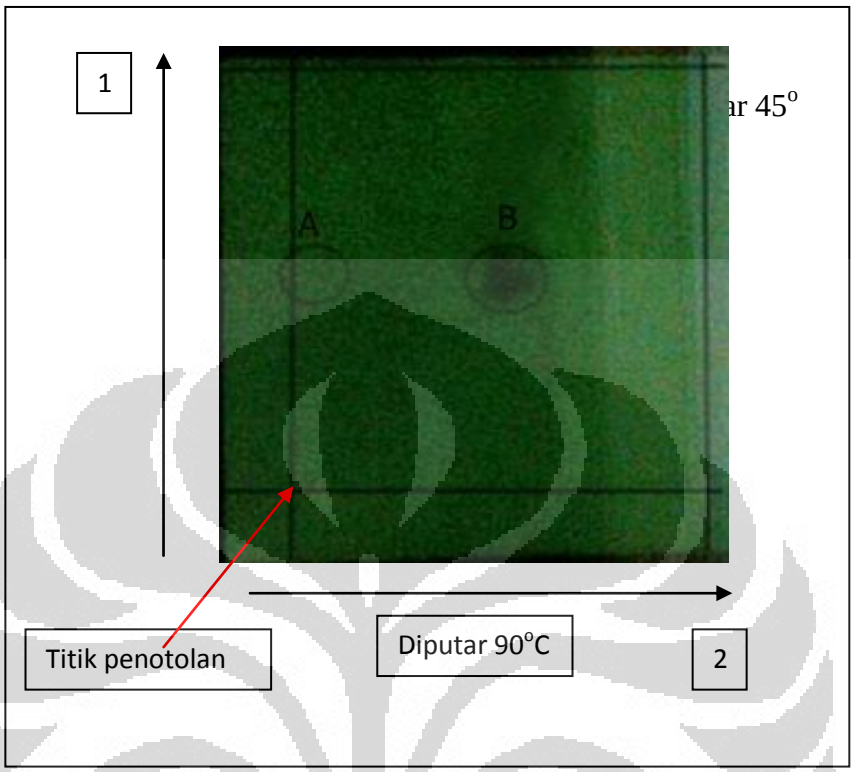
Lampran 24. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1 (+ H_2O)



Lampiran 25. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL1 (+ H_2O)



Lampiran 26. KLT 2-arah senyawa RTL2



Keterangan :

Sampel : senyawa RTL2

Fase diam: silika gel GF_{254} 10x10 cm

Penampak bercak : UV 254

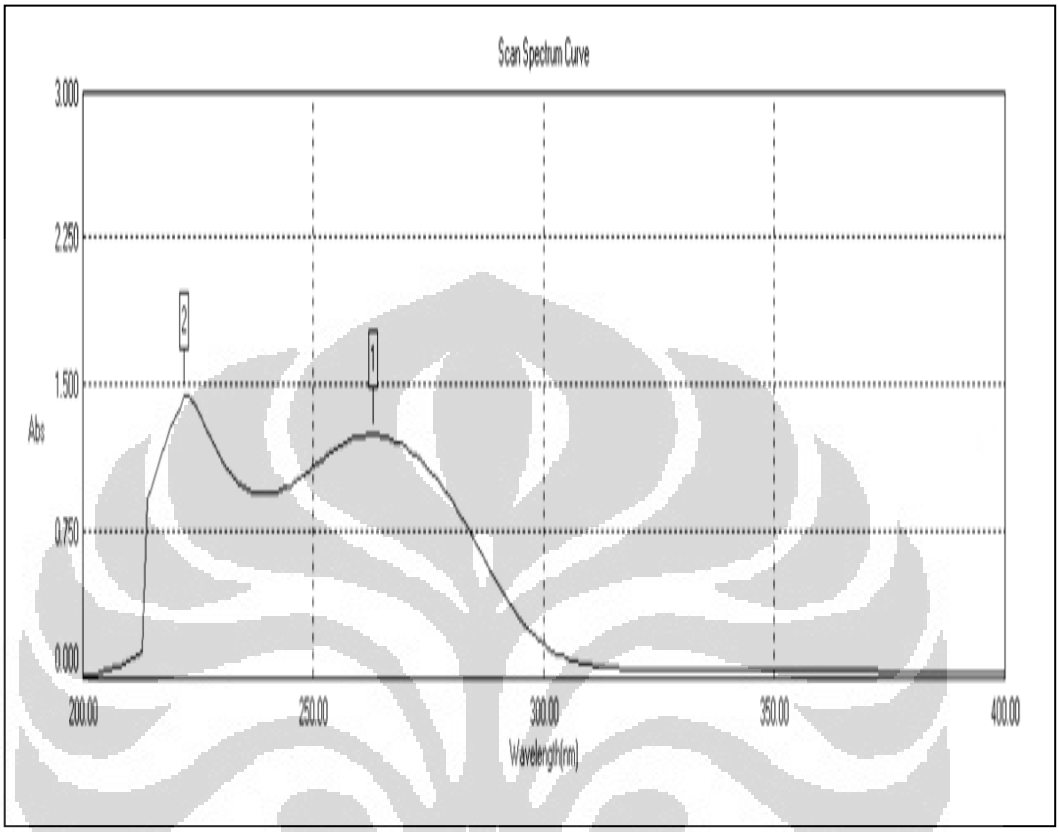
Fase gerak 1 = metanol : etil asetat (3:1)

2 = metanol : kloroform (2:1)

Nilai Rf : A = 0,725

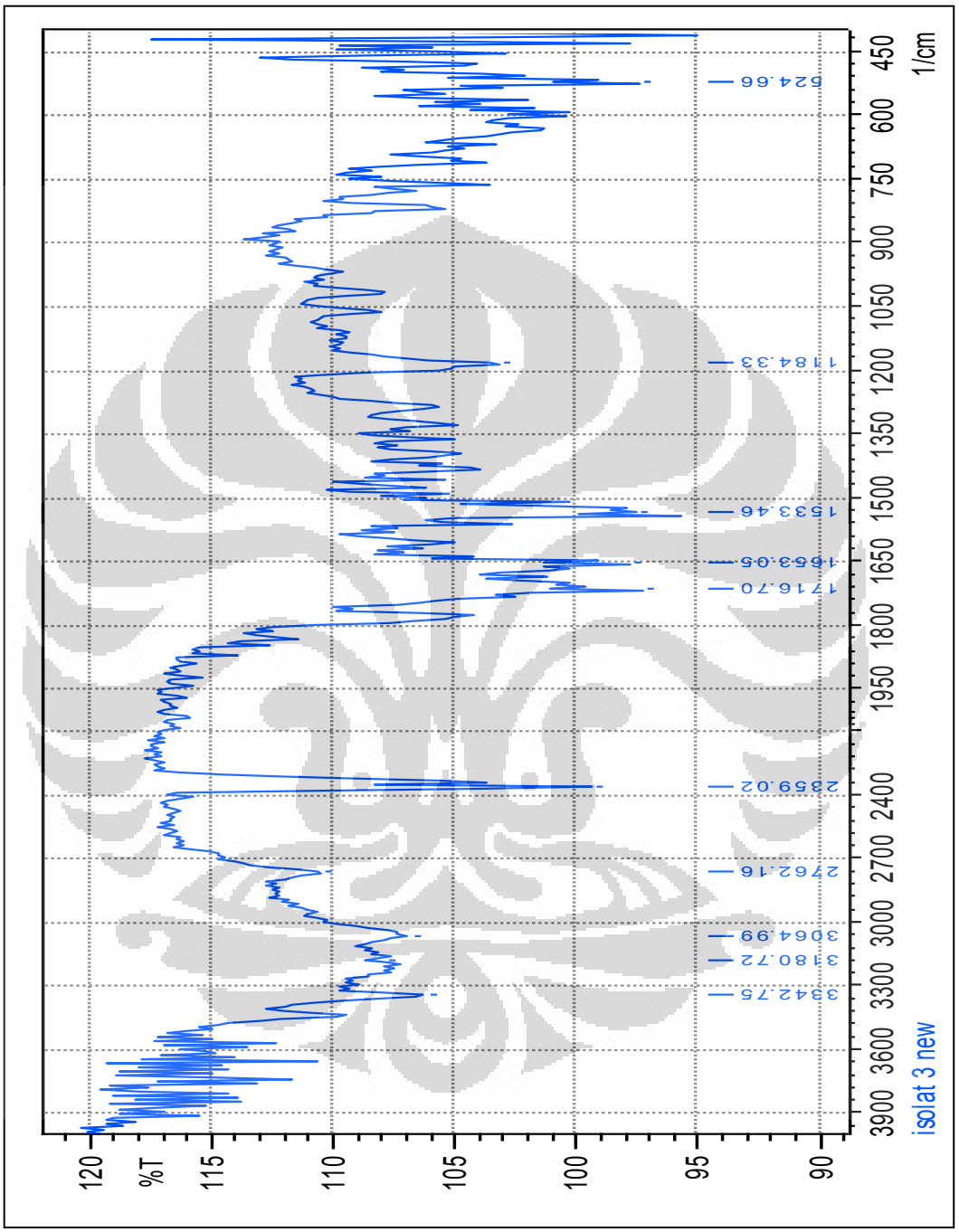
B = 0,650

Lampiran 27. Spektrum UV-Vis senyawa RTL2

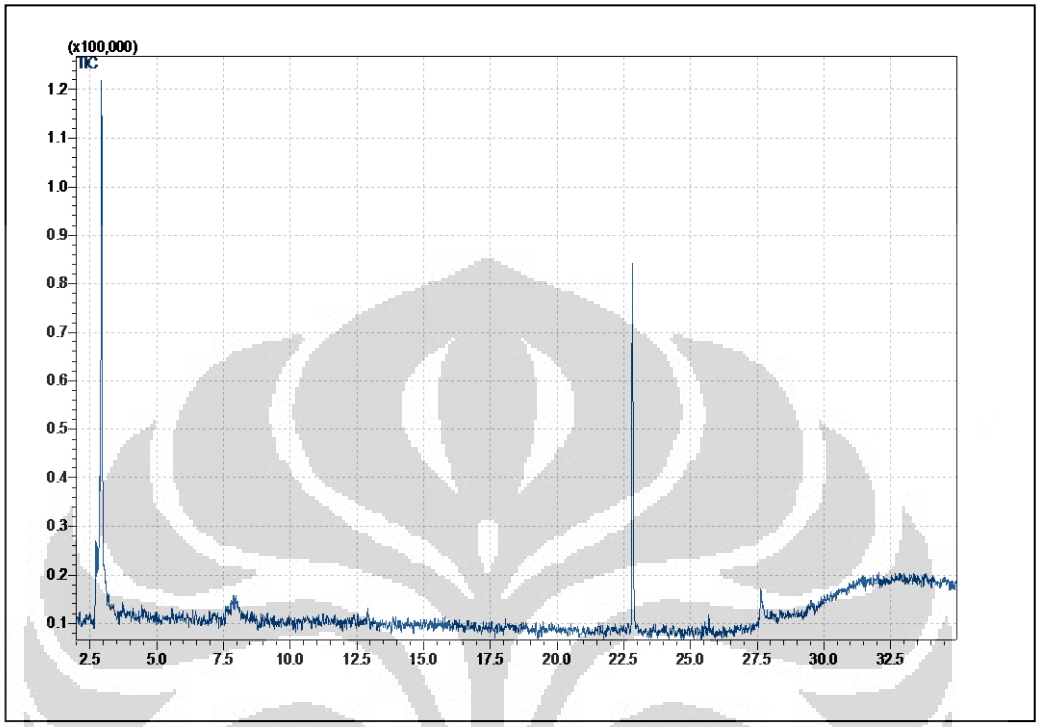


No.	Pita	Panjang gelombang (nm)	Serapan
1	Pita 1	263	1,244
2	Pita 2	222	1,443

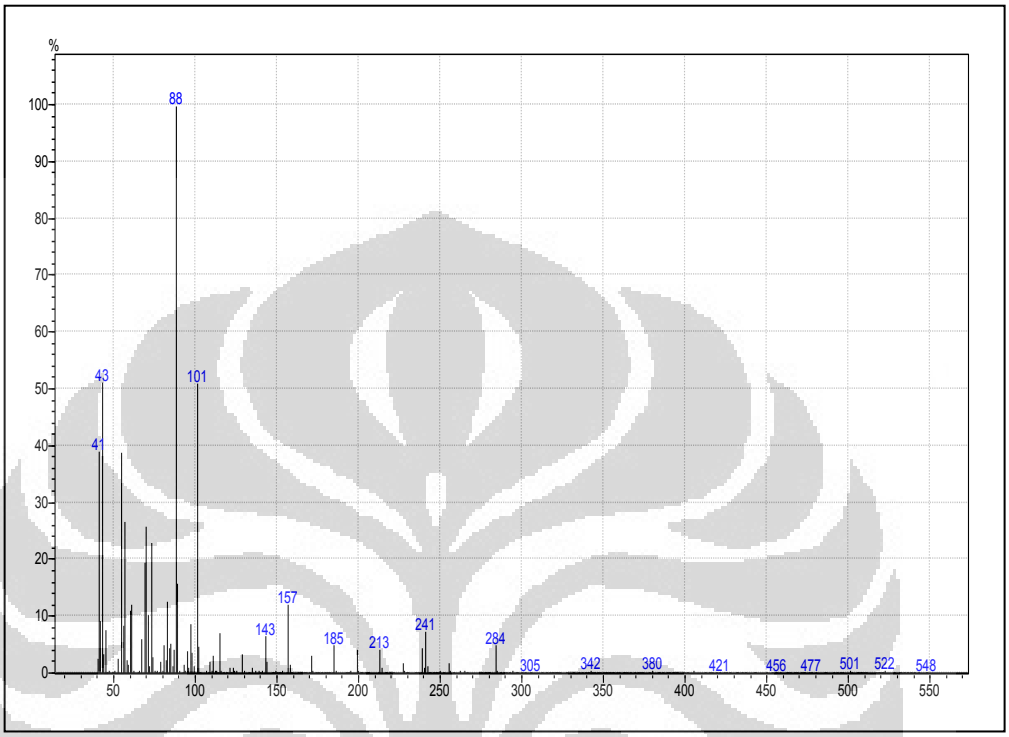
Lampiran 28. Spektrum FTIR senyawa RTL2



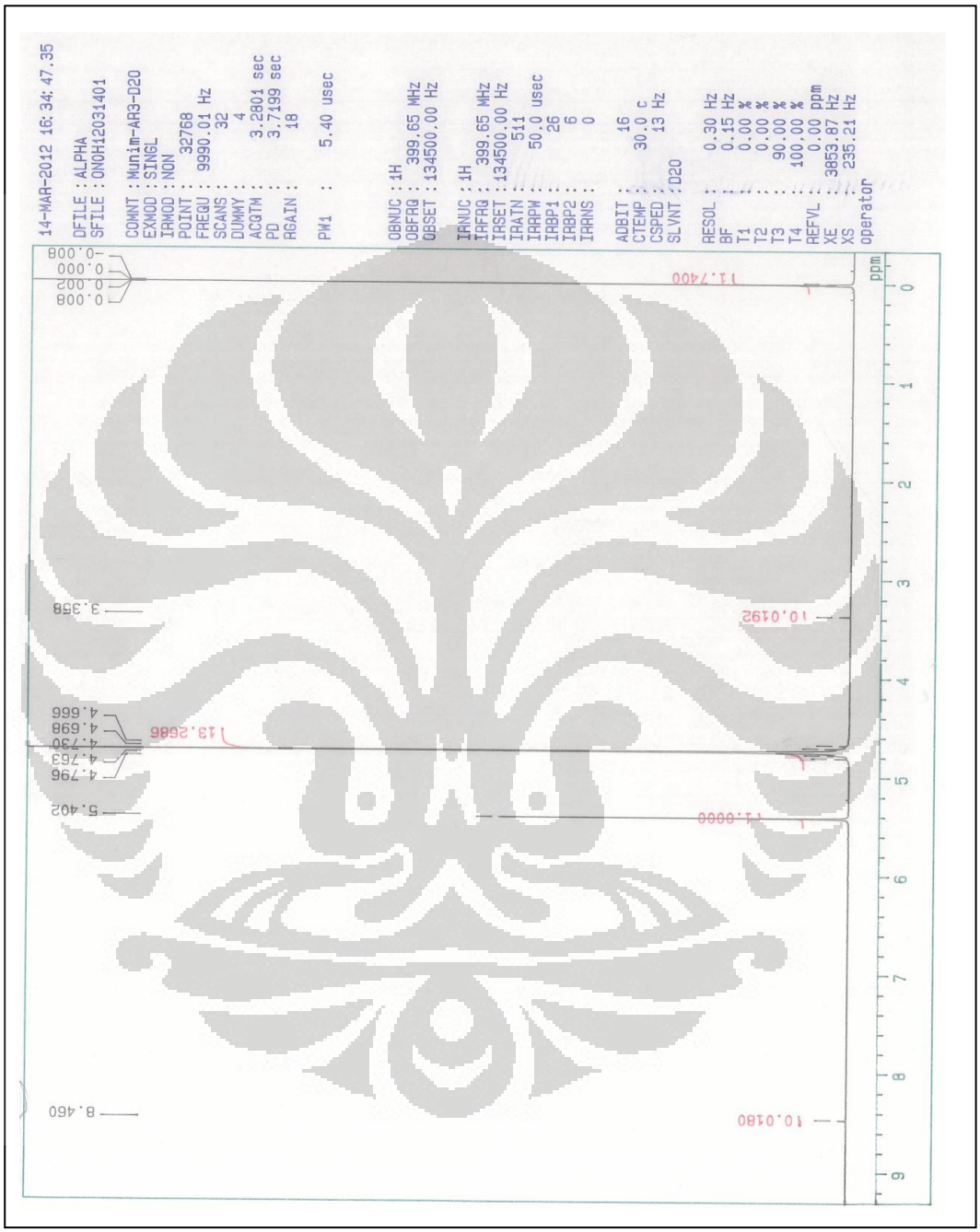
Lampiran 29. Spektrum GC-MS senyawa RTL2



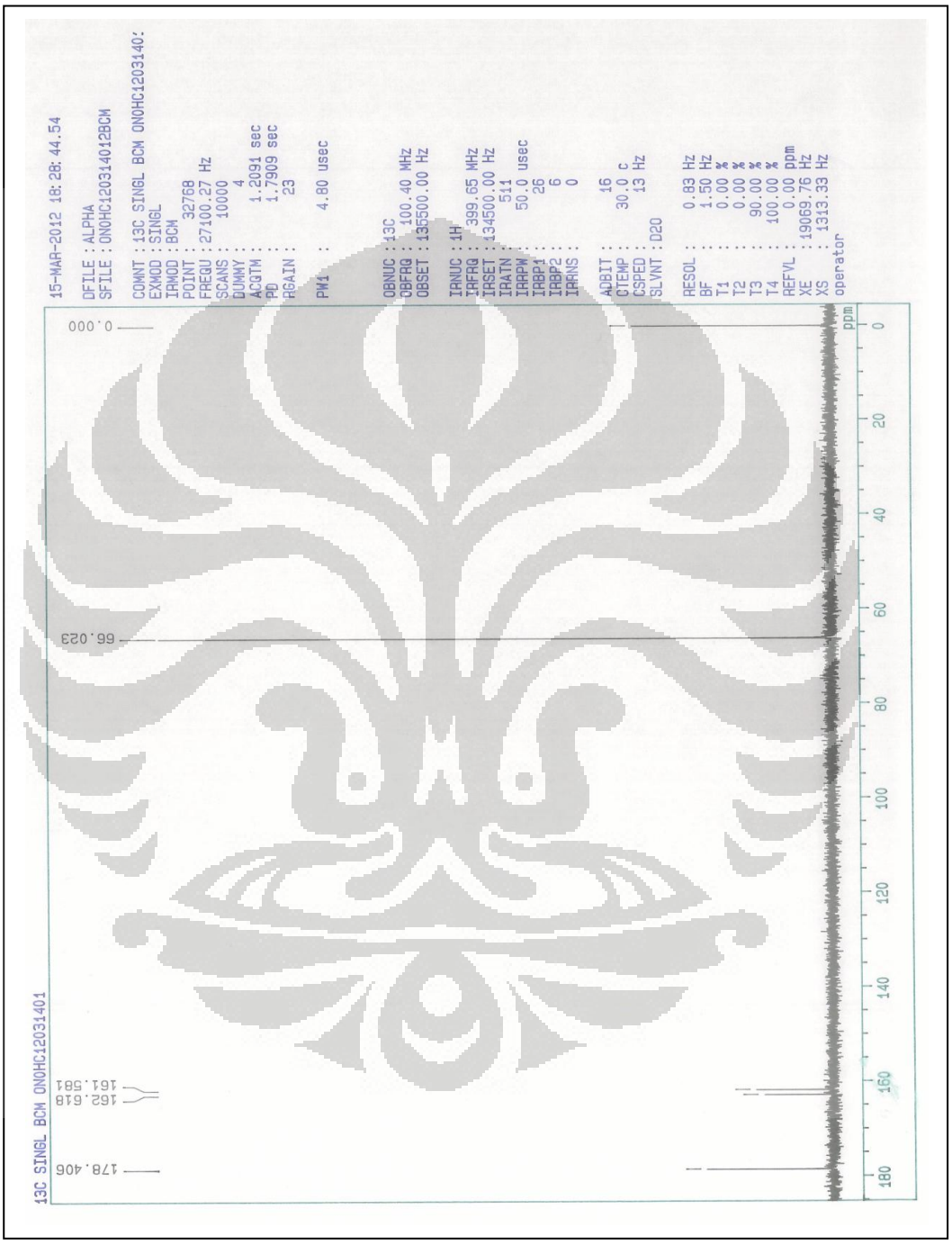
Lampiran 30. Pola fragmentasi senyawa RTL2



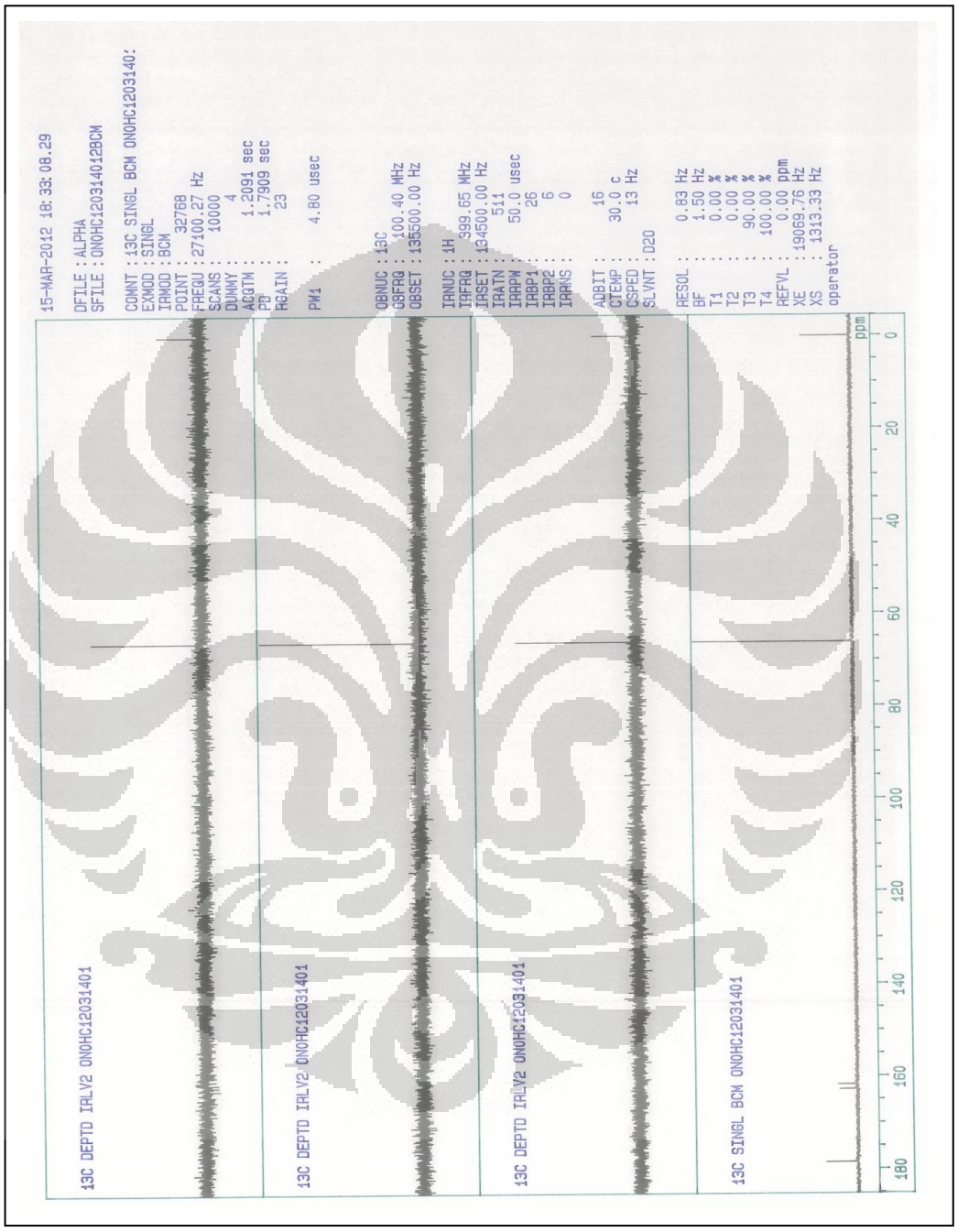
Lampiran 31. Spektrum ^{1}HNMR senyawa RTL2



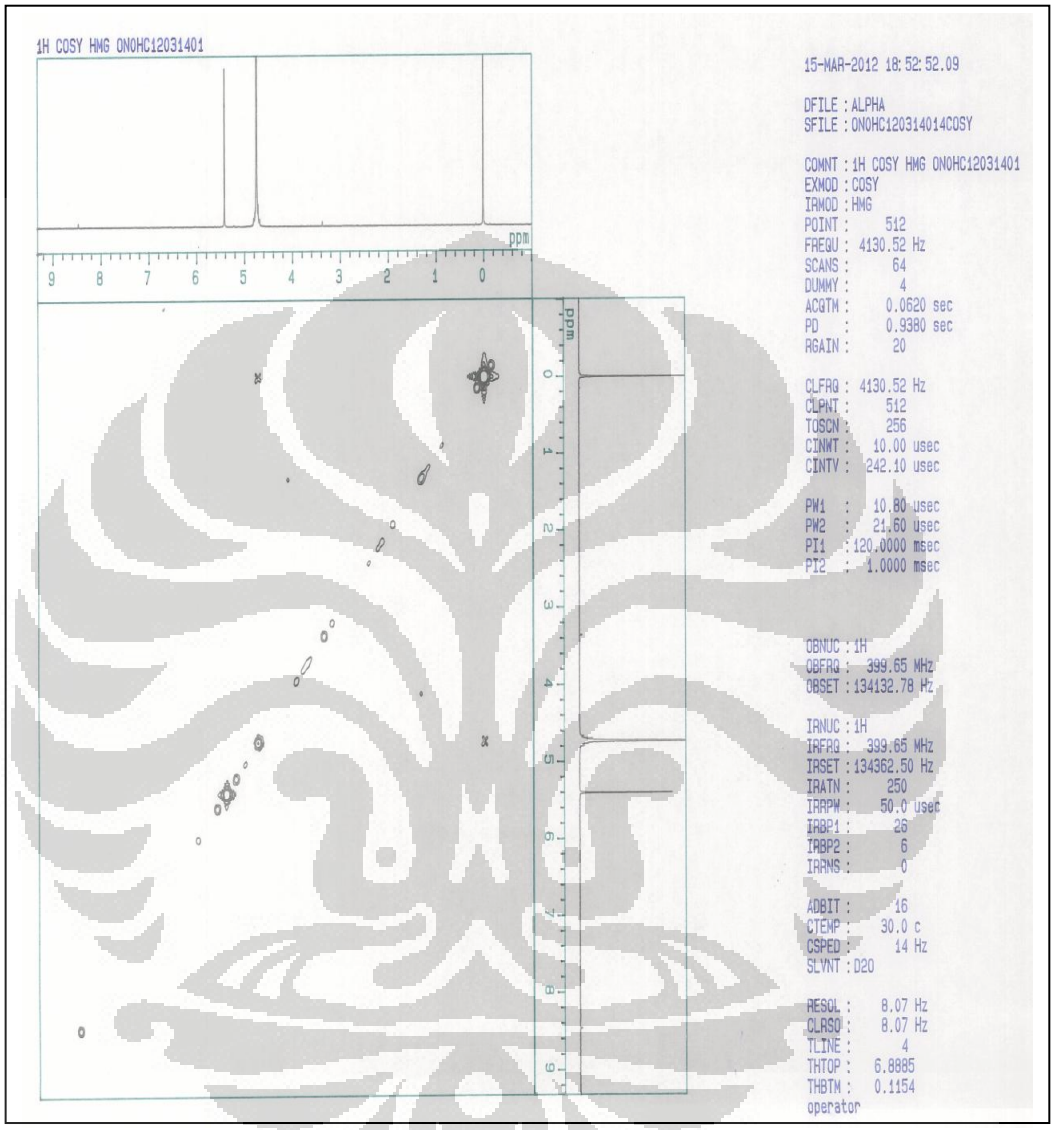
Lampiran 32. Spektrum ^{13}CNMR senyawa RTL2



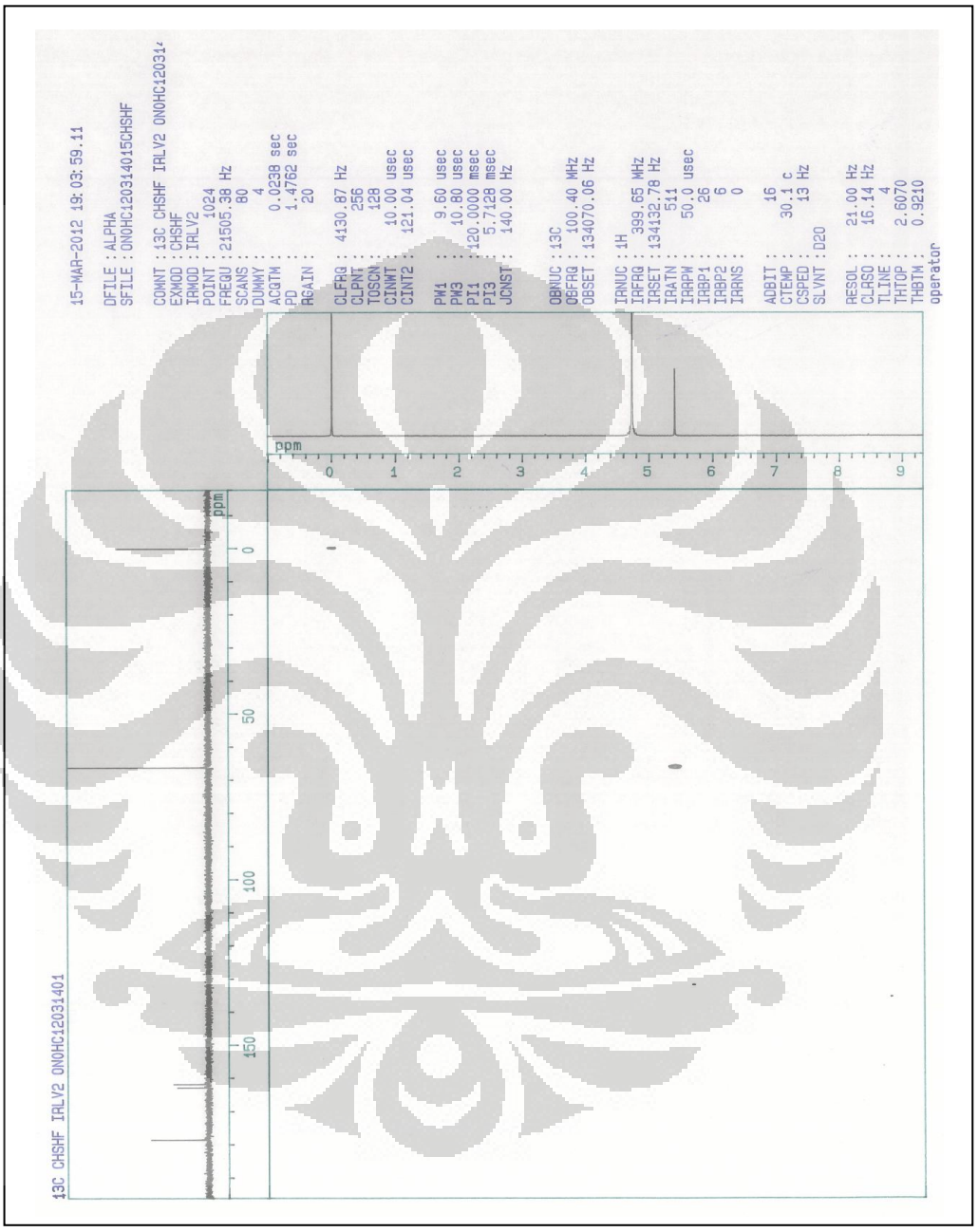
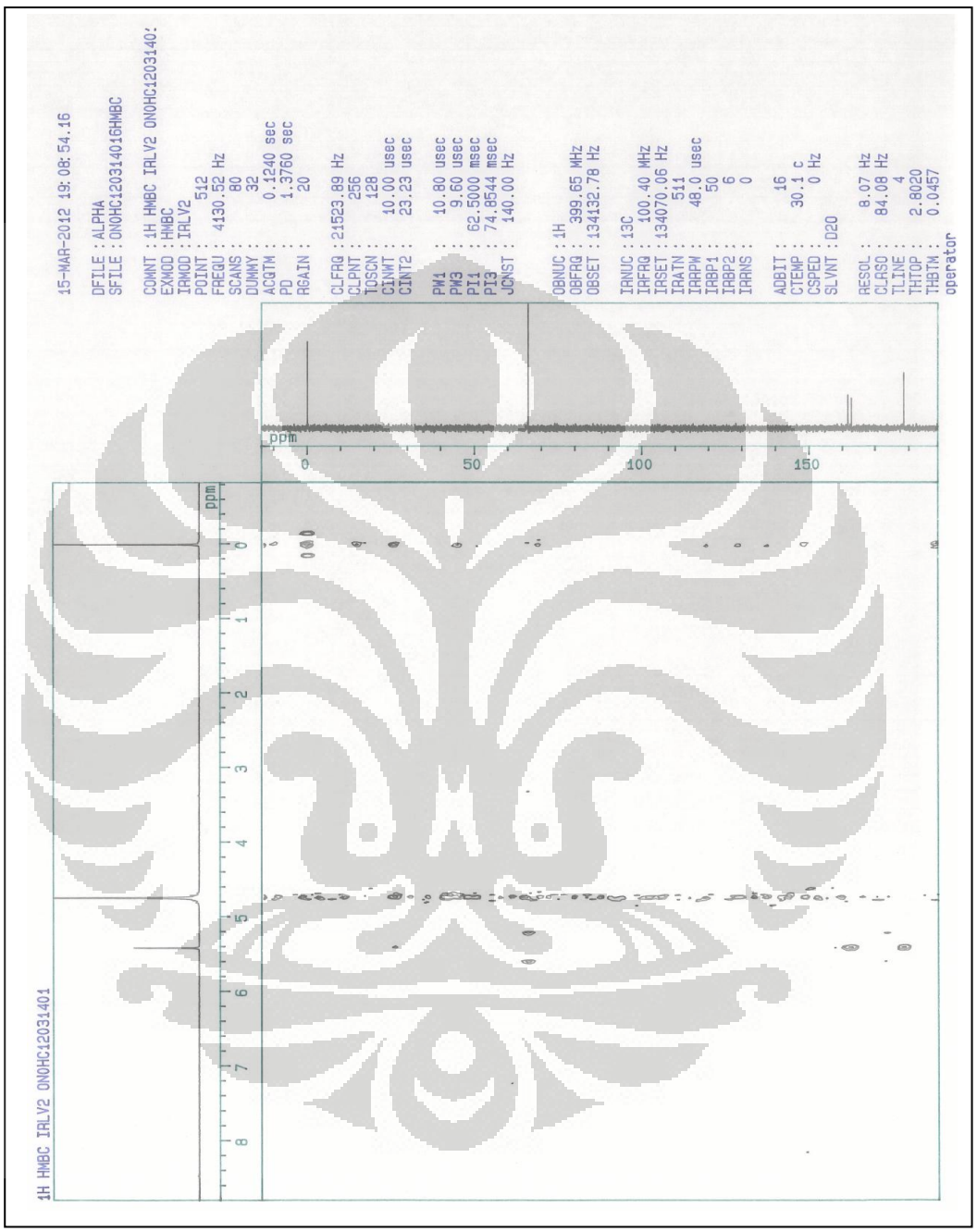
Lampiran 33. Spektrum NMR-2D DEPT senyawa RTL2



Lampiran 34. Spektrum NMR-2D H-H COSY senyawa RTL2



Lampiran 35. Spektrum NMR-2D C-H COSY senyawa RTL2



Lampiran 36. Spektrum NMR-2D HMBC senyawa RTL2