



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA  
ANTIOKSIDAN DAN PENGHAMBAT XANTIN  
OKSIDASE DARI BUAH ANDALIMAN  
(*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)**

**TESIS**

**RUTH ELENORA KRISTANTY  
1006787136**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM S2 ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA  
ANTIOKSIDAN DAN PENGHAMBAT XANTIN  
OKSIDASE DARI BUAH ANDALIMAN  
(*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains**

**RUTH ELENORA KRISTANTY  
1006787136**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI S2 ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
JULI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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



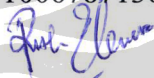
Depok,

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ruth Elenora Kristanty', is written over the watermark logo.

Ruth Elenora Kristanty

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Ruth Elenora Kristanty  
NPM : 1006787136  
Tanda Tangan :   
Tanggal : 10 Juli 2012










## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Ruth Elenora Kristanty  
NPM : 1006787136  
Program Studi : S2 Ilmu Kefarmasian  
Judul Tesis : Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Antioksidan dan  
Penghambat Xantin Oksidase dari Buah Andaliman  
(*Zanthoxylum acanthopodium* DC)

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Farmasi pada Program Studi S2 Ilmu Kefarmasian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Katrin, MS., Apt. (  )  
Pembimbing II : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. (  )  
Penguji I : Prof. Dr. Endang Hanani, MS., Apt. (  )  
Penguji II : Dr. Rani Sauriasari, M.Sc., Apt. (  )  
Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc., Apt. (  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, karena atas berkat dan kasih karuniaNya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam 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, perkenankanlah saya dengan tulus hati mengucapkan terima kasih yang tak terhingga serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

- (1) Dr. Katrin, MS., Apt dan Dr. Abdul Mun'im M.Si., Apt., selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini;
- (2) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku kepala Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia;
- (3) Prof. Dr. Effionora, MS., Apt., selaku ketua program studi S2 Ilmu Kefarmasian di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia yang telah memberikan dorongan untuk menyelesaikan program S2 Ilmu Kefarmasian;
- (4) Dr. Osama Negishi dari Universitas Tsukuba Jepang yang telah banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan untuk penyusunan tesis ini;
- (5) AKBP Kuswardani, SSi., Apt, selaku Kepala Laboratorium Badan Narkotika Nasional yang telah banyak memfasilitasi saya dalam usaha memperoleh data yang diperlukan untuk penelitian tesis ini;
- (6) Tim penguji saya, Prof. Dr. Endang Hanani, MS., Apt dan Dr. Rani Sauriasari, M.Sc., Apt., yang telah banyak memberikan penilaian maupun saran-saran untuk perbaikan dan penyempurnaan tesis ini;

- (7) Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Jakarta II yang telah memberikan bantuan dana pendidikan kepada saya untuk dapat mengikuti program tugas belajar S2 Ilmu Kefarmasian di Universitas Indonesia;
- (8) Joko Sulistiyo, ST.,MSi., selaku Ketua Jurusan Analisa Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta II yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menjadi peserta tugas belajar program pasca sarjana dan memfasilitasi saya demi kelancaran penelitian tesis ini;
- (9) Dra. Suzana Indah Astuti, MSi, Apt., selaku Sekretaris Jurusan Analisa Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta II yang telah memberikan semangat dan mendukung saya untuk menjadi peserta tugas belajar program pasca sarjana;
- (10) Zakiyah Ulfah, atas fasilitas dan bantuan yang telah diberikan selama melaksanakan penelitian di laboratorium Fitokimia Departemen Farmasi Universitas Indonesia;
- (11) Tanti, ST., yang telah meluangkan waktu untuk membantu saya di Laboratorium Badan Narkotika Nasional dalam usaha memperoleh data yang diperlukan;
- (12) Erry Marwandha, ST., Silvester Maximus Tulandi, S.Farm., Dwi Sarwiko, S.Kom., selaku staf pengajar dan teman sejawat di Jurusan Analisa Farmasi dan Makanan Politeknik Kesehatan Kemenkes Jakarta II yang telah meluangkan waktu untuk membantu saya;
- (13) orang tua saya, S. Sagala dan M. Situmorang, serta suami tercinta, Jefry Octorianto Bakkara ST., yang telah memberikan bantuan dukungan material dan moral; dan
- (14) Aktsar Roskiana Ahmad, S.Farm., Apt, dan sahabat-sahabat lainnya yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Kasih berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok,                      Juli 2012  
Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Ruth Elenora Kristanty  
NPM : 1006787136  
Program Studi : S2 Ilmu Kefarmasian  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
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 Senyawa Antioksidan dan Penghambat Xantin Oksidase dari Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC)  
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan 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 : 10 Juli 2012

Yang menyatakan



( Ruth Elenora Kristanty )

## ABSTRAK

Nama : Ruth Elenora Kristanty  
Program Studi : S2 Ilmu Kefarmasian  
Judul : Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Antioksidan dan Penghambat Xantin Oksidase dari Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)

Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) adalah rempah-rempah liar yang tumbuh di daerah Sumatera Utara. Tanaman ini umumnya digunakan sebagai bumbu masakan tradisional masyarakat Batak dan belum dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Tesis ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan elusidasi struktur senyawa dari buah andaliman yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat xantin oksidase. Dari hasil isolasi, diperoleh senyawa golongan terpenoid polar ZAB-1 dan ZAB-2 dari ekstrak *n*-butanol. Berdasarkan hasil penelusuran spektroskopi, senyawa ZAB-1 adalah 17-((23E,26E)-23-etiliden-29-hidroksi - 29 - (2-hidroksipropoksi)-25-metildek-26-en-20-il) - 13,15 - dimetil - gona-1,3,5(10)-trien-3-ol dan senyawa ZAB-2 adalah kolest-5-en-3 $\beta$ -il  $\beta$ -D-glukopiranosida. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara *in vitro* menggunakan DPPH dan enzim xantin oksidase. ZAB-1 dan ZAB-2 memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 68,35  $\mu$ g/mL dan 60,52  $\mu$ g/mL serta memiliki aktivitas penghambat xantin oksidase dengan nilai IC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 0,34  $\mu$ g/mL dan 0,06  $\mu$ g/mL.

Kata Kunci : Antioksidan, radikal bebas, xantin oksidase, *Zanthoxylum acanthopodium* DC.  
xiv+122 halaman : 32 gambar; 18 tabel; 25 lampiran  
Daftar Pustaka : 95 (1958-2012)

## ABSTRACT

Name : Ruth Elenora Kristanty  
Study Program : Magister of Pharmacy  
Title : Isolation and Structure Elucidation of Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitor from Andaliman Fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)

Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) is a wild spice well known in North Sumatera, Indonesia. This plant is commonly used in Batak traditional cuisine and has not been used as a medicinal plant. This research was conducted to isolate and perform structure elucidation of compounds from the fruits which have antioxidant and xanthine oxidase inhibitor activity. From the results of isolation, the compounds obtained from *n*-butanol extract were ZAB-1 and ZAB-2 as polar terpenoids. Based on spectroscopic results, ZAB-1 is 17-((23E,26E)-23-ethylidene - 29 - hydroxy - 29 -(2-hydroxypropoxy)- 25 - methyldec - 26 - en -20-yl)-13,15-dimethyl-gona-1,3,5(10)-trien-3-ol and ZAB-2 is cholest-5-en-3 $\beta$ -yl  $\beta$ -D-glucopyranoside. The structure of these compounds were elucidated employing spectroscopic methods, mainly by NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and mass spectral analysis. Free radical scavenging potential of constituents had been investigated by *in vitro* evaluation against DPPH and xanthine oxidase. The results showed that ZAB-1 and ZAB-2 are active as antioxidant with IC<sub>50</sub> 68,35  $\mu$ g/mL and 60,52  $\mu$ g/mL and also active as xanthine oxidase inhibitor with IC<sub>50</sub> 0,34  $\mu$ g/mL and 0,06  $\mu$ g/mL.

Key Words : Antioxidant, free radical, xanthine oxidase, *Zanthoxylum acanthopodium* DC.

xiv+122 pages : 32 pictures; 18 tables; 25 appendices

Bibliography : 95 (1958-2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	vii
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACT .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Hipotesa .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	3
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Genus <i>Zanthoxylum</i> .....	5
2.1.1 Penyebaran di Alam .....	5
2.1.2 Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologi .....	6
2.2 Andaliman ( <i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC) .....	6
2.2.1 Deskripsi Tanaman .....	6
2.2.2 Kandungan Kimia .....	9
2.2.3 Aktivitas Biologi .....	10
2.3 Aktivitas Antioksidan .....	11
2.3.1 Spesies Oksigen Reaktif .....	11
2.3.2 Antioksidan .....	12
2.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan .....	15
2.3.4 Metode Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH... ..	16
2.3.5 Uji Penghambatan Xantin Oksidase .....	18
2.4 Metode Ekstraksi .....	23
2.5 Metode Pemisahan .....	25
2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis .....	25
2.5.2 Kromatografi Kolom .....	26
2.5.3 Kromatografi Gas .....	26
2.6 Metode Identifikasi secara Spektrofotometri .....	27
2.6.1 Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak .....	27
2.6.2 Spektrofotometri Infra Merah .....	27
2.6.3 Spektrofotometri Massa .....	28
2.6.4 Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti .....	28

<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>29</b>
3.1 Tempat dan Waktu .....	29
3.2 Bahan dan Alat .....	29
3.2.1 Bahan .....	29
3.2.2 Alat .....	29
3.3 Tahap Kerja .....	30
3.3.1 Penyiapan Simplisia .....	30
3.3.2 Ekstraksi .....	30
3.3.3 Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan dalam Ekstrak secara Kualitatif .....	31
3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak .....	31
3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat .....	33
3.3.6 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase oleh Ekstrak .....	33
3.3.7 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase oleh Isolat .....	38
3.3.8 Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase .....	38
3.3.9 Penapisan Fitokimia .....	39
3.3.10 Isolasi dan Pemurnian Senyawa Aktif .....	42
3.3.11 Penentuan Struktur Molekul Isolat .....	44
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>46</b>
4.1 Penyiapan Bahan .....	46
4.2 Ekstraksi .....	46
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan .....	47
4.3.1 Uji Aktivitas secara Kualitatif .....	47
4.3.2 Uji Aktivitas secara Kuantitatif .....	47
4.4 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase .....	50
4.5 Penapisan Fitokimia .....	55
4.6 Isolasi dan Pemurnian Senyawa .....	55
4.7 Penentuan Struktur Isolat .....	57
4.7.1 Senyawa ZAB-1 .....	57
4.7.2 Senyawa ZAB-2 .....	61
4.8 Uji Aktivitas Isolat .....	68
4.8.1 Aktivitas Antioksidan Isolat .....	68
4.8.2 Aktivitas dan Kinetika Penghambat Xantin Oksidase oleh Isolat .....	69
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>75</b>
5.1 Kesimpulan .....	75
5.2 Saran .....	75
<b>DAFTAR ACUAN .....</b>	<b>76</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pohon Andaliman .....	7
Gambar 2.2	Buah Andaliman .....	8
Gambar 2.3	Struktur Molekul Senyawa Trigeminal Aktif .....	9
Gambar 2.4	Struktur Molekul Senyawa Flavon Diisolasi dari Buah Andaliman di India .....	10 11
Gambar 2.5	Reaksi Radikal DPPH dengan Antioksidan.....	17
Gambar 2.6	Grafik Persamaan Michaelis-Menten .....	19
Gambar 2.7	Grafik Lineweaver-Burk.....	20
Gambar 2.8	Skema Reaksi Xantin Oksidase menjadi Asam Urat .....	21
Gambar 2.9	Skema Reaksi Alopurinol menjadi Oksipurinol .....	22
Gambar 4.1	Aktivitas Enzim pada Berbagai Konsentrasi Substrat .....	52
Gambar 4.2	Analisis HMBC Senyawa ZAB-1.....	59
Gambar 4.3	Analisis Fragmentasi Senyawa ZAB-1 .....	60
Gambar 4.4	Struktur Molekul Senyawa ZAB-1 .....	61
Gambar 4.5	Analisis HMBC ZAB-2 .....	64
Gambar 4.6	Fragmentasi Senyawa ZAB-2 .....	65
Gambar 4.7	Struktur Senyawa ZAB-2 .....	66
Gambar 4.8	Grafik Michaelis-Menten Senyawa ZAB-1, ZAB-2, dan tanpa Inhibitor .....	72 72
Gambar 4.9	Plot Lineweaver-Burk Senyawa ZAB-1 10 $\mu$ g/mL dengan Konsentrasi Xantin 0,05; 0,1; 0,15; dan 0,25 mM .....	73 73
Gambar 4.10	Plot Lineweaver-Burk Senyawa ZAB-2 10 $\mu$ g/mL dengan Konsentrasi Xantin 0,05; 0,1; 0,15; dan 0,25 mM .....	78 78
Gambar 4.11	Simplisia Buah Andaliman .....	84
Gambar 4.12	Hasil Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan dalam Ekstrak secara setelah disemprot dengan Larutan DPPH .....	85 85
Gambar 4.13	Spektrum Serapan Larutan DPPH 30 $\mu$ g/mL dalam Metanol ...	86
Gambar 4.14	Spektrum Serapan Blangko pada Uji Penghambatan Xantin Oksidase .....	87 87
Gambar 4.15	Hasil Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan Isolat secara KLT setelah disemprot dengan Larutan DPPH .....	88 88
Gambar 4.16	Profil KLT ZAB-1 dengan Fase Gerak Diklorometan- Metanol 7:3 dan Rf 0,75 .....	89 89
Gambar 4.17	Profil KLT ZAB-2 dengan Fase Gerak Diklorometan- Metanol 1:1 dan Rf 0,68 .....	90 90
Gambar 4.18	Profil Serapan UV-Vis ZAB-1 .....	91
Gambar 4.19	Profil Serapan UV-Vis ZAB-2 .....	92
Gambar 4.20	Hasil Pengukuran Spektrofotometri Infra Merah ZAB-1 .....	93
Gambar 4.21	Hasil Pengukuran Spektrofotometri Infra Merah ZAB-2 .....	94
Gambar 4.22	Hasil Pengukuran GC-MC ZAB-1 .....	95
Gambar 4.23	Hasil Pengukuran GC-MS ZAB-2 .....	96

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Larutan Percobaan dan Volume yang Dibutuhkan untuk Uji Penghambatan Xantin Oksidase .....	37
Tabel 4.1	Data Rendemen Ekstrak Buah Andaliman .....	47
Tabel 4.2	Hasil Uji Antioksidan Ekstrak Buah Andaliman .....	49
Tabel 4.3	Hasil Uji Antioksidan BHT dan Kuersetin .....	50
Tabel 4.4	Hasil Penentuan Suhu Optimum Xantin Oksidase .....	51
Tabel 4.5	Hasil Penentuan pH Optimum Xantin Oksidase .....	51
Tabel 4.6	Hasil Penentuan Konsentrasi Optimum Substrat .....	51
Tabel 4.7	Hasil Uji Penghambatan Xantin Oksidase oleh Alopurinol ....	53
Tabel 4.8	Hasil Uji Penghambatan Xantin Oksidase oleh Ekstrak Buah Andaliman .....	54
Tabel 4.9	Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Buah Andaliman .....	55
Tabel 4.10	Bobot Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Ekstrak n-Butanol	56
Tabel 4.11	Data Pergeseran Kimia Proton dan Karbon Senyawa ZAB-1	58
Tabel 4.12	Data Pergeseran Kimia Proton dan Karbon Senyawa ZAB-2	63
Tabel 4.13	Hasil Uji Antioksidan ZAB-1 dan ZAB-2 .....	68
Tabel 4.14	Hasil Uji Penghambatan Xantin Oksidase oleh ZAB-1 dan ZAB-2 .....	70
Tabel 4.15	Data Serapan ZAB-1 Konsentrasi 10 $\mu$ g/mL pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase .....	71
Tabel 4.16	Data Serapan ZAB-2 Konsentrasi 10 $\mu$ g/mL pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase .....	71
Tabel 4.17	Data Serapan Tanpa Inhibitor pada Uji Kinetika Penghambatan Aktivitas Xantin Oksidase oleh Senyawa Isolat .....	71

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema Kerja Pembuatan Ekstrak Buah <i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC .....	97
Lampiran 2	Skema Kerja Isolasi Senyawa dari Ekstrak Buah <i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC .....	98
Lampiran 3	Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan .....	99
Lampiran 4	Skema Kerja Uji Penghambatan Xantin Oksidase .....	100
Lampiran 5	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin Oksidase 0,1 unit/mL .....	101
Lampiran 6	Perhitungan dan Pembuatan Larutan Xantin .....	102
Lampiran 7	Hasil Determinasi Tanaman .....	103
Lampiran 8	Spektrum <sup>1</sup> H-NMR ZAB-1 .....	104
Lampiran 9	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR ZAB-1 .....	105
Lampiran 10	Spektrum DEPT ZAB-1 .....	106
Lampiran 11	Spektrum CHSHF ZAB-1 .....	107
Lampiran 12	Spektrum <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H-COSY ZAB-1 .....	108
Lampiran 13	Spektrum HMBC ZAB-1 .....	109
Lampiran 14	Spektrum Bagian Pertama <sup>1</sup> H-NMR ZAB-2 .....	110
Lampiran 15	Spektrum Bagian Kedua <sup>1</sup> H-NMR ZAB-2 .....	111
Lampiran 16	Spektrum Bagian Ketiga <sup>1</sup> H-NMR ZAB-2 .....	112
Lampiran 17	Spektrum Bagian Keempat <sup>1</sup> H-NMR ZAB-2 .....	113
Lampiran 18	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR ZAB-2 .....	114
Lampiran 19	Spektrum DEPT ZAB-2 .....	115
Lampiran 20	Spektrum CHSHF ZAB-2 .....	116
Lampiran 21	Spektrum <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H-COSY ZAB-2 .....	117
Lampiran 22	Spektrum HMBC ZAB-2 .....	118
Lampiran 23	Sertifikat Analisis Xantin Oksidase .....	119
Lampiran 24	Sertifikat Analisis Xantin .....	120
Lampiran 25	Sertifikat Analisis Alopurinol .....	122

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Antioksidan adalah mikronutrien penting yang telah mendapatkan perhatian dalam beberapa tahun terakhir karena memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas (Lee, Kim, dan Ang, 2002). Radikal bebas (*Reactive Oxygen Species*) seperti anion superoksida dan hidroksil, berperan penting dalam stres oksidatif yang berhubungan dengan patogenesis berbagai penyakit penting (Shyur, Tsung, Chen, Chiu, dan Lo, 2005). Penyakit tersebut antara lain penyakit degeneratif termasuk aterosklerosis, penyakit jantung iskemik, penuaan, diabetes melitus, kanker, dan neurodegeneratif (Young dan Woodside, 2001).

Radikal bebas anion superoksida dihasilkan sebagian besar secara enzimatik yang dimediasi oleh xantin oksidase. Pada saat enzim mengoksidasi hipoxantin menjadi asam urat yang berkontribusi terhadap penyakit gout, rheumatoid arthritis dan kondisi inflamasi lainnya, radikal superoksida ikut diproduksi (Tiwari, 2001). Kemampuan xantin oksidase menghasilkan radikal bebas telah menarik banyak minat penelitian dalam bidang enzim terkait kemampuannya sebagai faktor pencetus atau inisiasi kerusakan jaringan pada kondisi patologis (Baghiani et al., 2012). Penghambatan pembentukan ROS melalui mekanisme penghambatan xantin oksidase dapat menurunkan jumlah radikal bebas dan melindungi tubuh dari kerusakan jaringan (Lin et al., 2010).

Cara yang paling efektif untuk mengeliminasi radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif adalah dengan menggunakan antioksidan. Kerja antioksidan dapat dibagi melalui dua mekanisme utama yaitu dengan meredam radikal bebas dan meniadakan sumber inisiasi oksidatif seperti dengan menghambat enzim (Vaya dan Aviram, 2001). Antioksidan, baik eksogen maupun endogen, baik sintetik maupun alami, dapat mencegah pembentukan radikal bebas secara efektif (Souri, Amin, Farsam, Jalalizadeha, dan Barezia, 2008).

Berbagai macam antioksidan sintetik seperti *butylated hydroxytoluene* (BHT) yang banyak digunakan dalam makanan telah dilaporkan memiliki

beberapa efek samping seperti kerusakan hati dan mutagenesis (Sahgal et al., 2009). Alopurinol sebagai obat sintetik yang telah lama digunakan untuk mengobati penyakit gout (Pacher, Nivorozhkin, dan Szabo, 2006) dengan mekanisme kerja menghambat xantin oksidase (Marks dan Smith, 2000), dilaporkan memberikan banyak efek samping seperti reaksi alergi pada kulit dan diare (McInnes, Lawson, dan Jick, 1981). Dengan demikian, diperlukan obat alternatif yang memiliki aktivitas pengobatan lebih baik dan aman, yaitu dari bahan alam atau tumbuhan.

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang sangat baik untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat. Salah satu potensi kekayaan alam Indonesia yang perlu dikembangkan adalah golongan rempah-rempah, terutama yang masih tergolong tanaman liar. Tanaman rempah telah menarik perhatian industri pangan dan penelitian ilmiah karena khasiat antioksidannya yang kuat. Sifat antioksidan tersebut diduga berasal dari banyak senyawa, termasuk beberapa vitamin, flavonoid, terpenoid, karotenoid, fitoestrogen, dan mineral (Suhaj, 2006).

Dalam masyarakat Batak, dikenal rempah yang tergolong tanaman liar yakni andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang merupakan tanaman khas daerah Sumatera Utara (Siregar, 2003; Tensiska, Wijaya, dan Nuri, 2003) tetapi belum dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Tanaman ini memiliki buah yang sering digunakan sebagai bumbu masak terutama untuk masakan tradisional.

Penelitian antioksidan terhadap buah andaliman yang telah dilaporkan masih terbatas pada pengujian terhadap ekstrak kasar dan penelitian yang mengungkap aktivitas buah andaliman dalam menghambat xantin oksidase belum pernah dilaporkan sampai saat ini. Telah diteliti aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah andaliman dalam beberapa sistem pangan (Tensiska, Wijaya, dan Andarwulan, 2003) dan aktivitas antiradikal ekstrak etanol buah andaliman konsentrasi 200 ppm yang menunjukkan daya inhibisi sebesar 61,81% (Suryanto, Sastrohamidjojo, Raharjo, Tranggono, 2004). Isolasi senyawa kimia dari buah andaliman masih terbatas pada hasil identifikasi sedangkan pengujian aktivitas biologinya belum pernah dilakukan. Senyawa yang sudah dikarakterisasi dari buah andaliman adalah senyawa amida tersubstitusi (Wijaya, 2000), komponen volatil dalam aroma buah (Wijaya, Hadiprodjo, dan Apriyantono, 2001), dan

senyawa glikosida flavon (Babu dan Khurana, 2007). Komponen non volatil yang telah diisolasi dari genus *Zanthoxylum* umumnya berasal dari golongan alkaloid yang memiliki aktivitas antimikroba (Pattino dan Cuca, 2011).

Berdasarkan penelusuran pustaka yang telah dilakukan, sampai saat ini belum ditemukan publikasi penelitian mengenai kandungan senyawa aktif antioksidan dan penghambat xantin oksidase yang diisolasi dari buah andaliman. Berdasarkan hal tersebut, maka pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan elusidasi struktur senyawa aktif antioksidan dan penghambat xantin oksidase dari buah andaliman. Diharapkan dengan berhasilnya isolasi dan identifikasi senyawa aktif, buah andaliman dapat menjadi salah satu alternatif sumber antioksidan alami dan penghambat alami xantin oksidase.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah :

- a. apakah ekstrak buah andaliman memiliki aktivitas antioksidan dan penghambatan xantin oksidase?
- b. apakah senyawa murni yang berhasil diisolasi dari ekstrak teraktif buah andaliman memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat xantin oksidase?
- c. apakah struktur senyawa isolat aktif yang diperoleh dari buah andaliman tersebut?

## 1.3 Hipotesa

Senyawa hasil isolasi dan elusidasi struktur dari buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat xantin oksidase.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

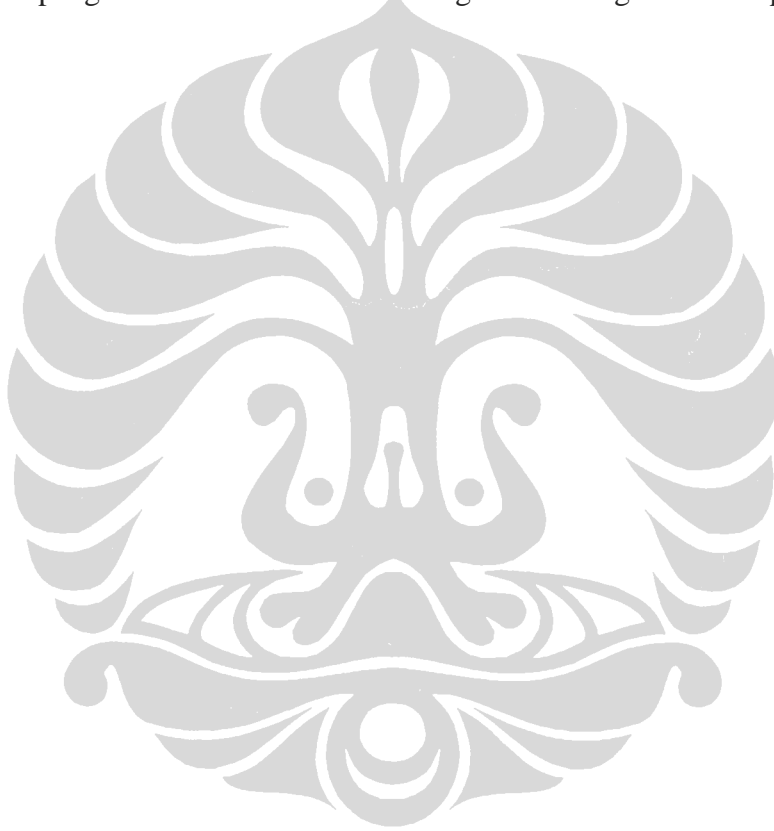
- a. memperoleh ekstrak dari buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat xantin oksidase.
- b. Memperoleh senyawa isolat dari ekstrak teraktif yang memiliki aktivitas antioksidan dan penghambat xantin oksidase.

- c. Memperoleh identitas dan struktur senyawa kimia dari buah andaliman melalui penelusuran spektroskopi.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat atau kegunaan dari penelitian ini adalah :

- a. Melengkapi data penelitian bahan alam mengingat masih terbatasnya laporan mengenai *Zanthoxylum acanthopodium* DC.
- b. Meningkatkan kegunaan andaliman sebagai bahan obat antioksidan dan penghambat xantin oksidase dengan didukung oleh hasil penelitian.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Genus *Zanthoxylum*

#### 2.1.1 Penyebaran di Alam

Famili dari Rutaceae memiliki 150 genus dan 1500 spesies yang tersebar di daerah beriklim sedang dan tropis. Kelompok tanaman ini banyak terdapat di Afrika Selatan dan Australia. Beberapa genus yang utama yaitu *Citrus*, *Zanthoxylum*, *Ruta*, *Murraya*, dan *Fortunella* (Jones dan Luchsinger, 1987).

Genus *Zanthoxylum* terdiri dari sekitar 250 spesies, berbentuk pohon dan semak, termasuk famili Rutaceae yang tumbuh di daerah beriklim hangat dan daerah subtropis di seluruh dunia. Buah dari beberapa spesies digunakan untuk membuat bumbu lada Sichuan (*sichuan pepper*). Secara historis, kulit kayu digunakan secara luas untuk sakit gigi, kolik, dan rematik (Wilbur dan Keith, 1980).

*Zanthoxylum* merupakan genus yang jarang diteliti. Beberapa spesies utama dari genus ini adalah *Zanthoxylum piperitum* DC (*Z. sansho*) di Cina, Jepang, dan Korea, *Z. simulans* (*Z. bungei*) di Cina dan Taiwan, *Z. bungeanum* Max. di Cina, *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc. di Cina dan Korea, *Z. nitidum* Roxb (DC) di Cina dan Asia Tenggara, *Z. limonella* di India dan Asia Tenggara, *Z. armatum* DC (*Z. alatum* Roxb.) di Himalaya, Asia Timur, dan Asia Tenggara, *Z. avicennae* (Lamk) DC (*Z. tidorensis*) di Cina, Asia Tenggara, Indonesia dan *Z. acanthopodium* DC di bagian timur Himalaya, Cina, Asia Tenggara, dan Sumatera (Katzer, 2001).

#### 2.1.2 Kandungan Kimia dan Aktivitas Biologi

Sebagian besar spesies *Zanthoxylum* menghasilkan alkamida pedas yang diturunkan dari asam karboksilat tak jenuh ganda yang terdapat dalam buah (Katzer, 2001). Senyawa lainnya yang telah diidentifikasi dari genus *Zanthoxylum* adalah alkaloid dan terpenoid (Negi, Bish, Bhandari, Singh, Sundriyah, 2011), serta kumarin dan flavonoid (Rasooli, 2011).

Sebuah senyawa alkaloid baru yaitu monofilidin telah diisolasi dari kulit batang *Zanthoxylum monophyllum* (Pattino dan Cuca, 2011). Senyawa kumarin



diisolasi dari batang *Z. schinifolium* dan dari buah *Z. americanum*. Isolasi flavonoid telah dilakukan dari buah *Z. integrifolium* (Rasooli, 2011). Terpenoid yang diisolasi dari genus *Zanthoxylum* sebagian besar merupakan komponen minyak atsiri yang terakumulasi dalam daun, bunga dan buah.  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol dan kampesterol telah diisolasi dari berbagai bagian tanaman *Zanthoxylum* (Rasooli, 2011).

Secara tradisional, buah digunakan sebagai makanan untuk mengobati pencernaan, mengobati asma dan bronkitis, menghilangkan rasa sakit, mengobati penyakit jantung, penyakit mulut, gigi dan tenggorokan, juga untuk mengatasi diare. Kulit akar dan daun digunakan untuk menyembuhkan sakit perut, sakit gigi, batuk, dan penyakit kelamin, rematik dan sakit pinggang. *Zanthoxylum* memiliki beberapa aktivitas biologis seperti larvasida, anti inflamasi, analgesik, antioksidan, antibiotik, hepatoprotektif, antiplasmodial, sitotoksik, antiproliferatif, antelmintik, antivirus, antikonvulsan dan antijamur (Negi, Bish, Bhandari, Singh, dan Sundriyah, 2011).

## **2. 2 Andaliman ( *Zanthoxylum acanthopodium* DC)**

### **2.2.1 Deskripsi Tanaman**

Tanaman andaliman dideskripsikan oleh Siregar (2002) sebagai berikut, semak atau pohon kecil bercabang rendah, tegak, tinggi mencapai 5 m, menahun. Batang, cabang, dan ranting berduri. Daun tersebar, bertangkai, majemuk menyirip beranak daun gasal, panjang 5-20 cm dan lebar 3-15 cm, terdapat kelenjar minyak. Bunga majemuk terbatas, anak payung menggarpu majemuk, kecil-kecil; dasar bunga rata atau bentuk kerucut; kelopak 5-7 bebas, panjang 1-2 cm, warna kuning pucat; berkelamin dua, benang sari 5-6 duduk pada dasar bunga, kepala sari kemerahan, putik 3-4, bakal buah apokarp, bakal buah menumpang. Buah berbentuk bulat, diameter 2-3 mm, muda hijau, tua merah; tiap buah satu biji, kulit keras, warna hitam berkilat. Gambar tanaman dan buah andaliman dapat dilihat pada Gambar 2.1 dan 2.2.

Sistematika tanaman andaliman adalah sebagai berikut (Jones & Luchsinger, 1987):

Dunia : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Sub divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledoneae  
Sub kelas : Rosidae  
Bangsa : Sapindales  
Suku : Rutaceae  
Marga : *Zanthoxylum*  
Jenis : *Zanthoxylum acanthopodium* DC.



**Gambar 2.1** Pohon andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC)



**Gambar 2.2** Buah andaliman

*Zanthoxylum acanthopodium* DC dikenal di Indonesia dengan nama andaliman. Tanaman ini memiliki nama daerah (Sumatera Utara) yaitu intir-intir dan nama asing yaitu *Sichuan pepper* atau *Indonesian lemon pepper* (Katzner, 2001). Di Jepang terdapat rempah sansho (*Zanthoxylum piperitum* DC) yang memiliki bentuk dan aroma buah serupa andaliman. Selain itu, di beberapa negara dikenal juga rempah *Z. simulans* dan *Z. bungeanum* Maxim yang memiliki aroma dan kandungan komponen volatil serupa andaliman (Wijaya, 2000).

Di Indonesia, tanaman andaliman khas dijumpai di daerah Sumatera Utara. Di dunia, tanaman ini tersebar antara lain di India Utara, Nepal, Pakistan Timur, Myanmar, Thailand, dan China (Wijaya, 1999; Hasairin, 1994). Andaliman tumbuh liar pada daerah dengan ketinggian 1500 meter di atas permukaan laut (Siregar, 2002) pada temperatur 15-18°C (Wijaya, 1999; Hasairin, 1994).

Buah andaliman umum digunakan sebagai bumbu masakan tradisional suku Batak. Buahnya mengandung senyawa aromatik dengan rasa pedas dan getir yang khas. Jika dimakan menghasilkan efek menggetarkan alat pengecap dan menyebabkan lidah terasa kebal (Siregar, 2003).

Andaliman adalah tanaman liar dan sulit dibudidayakan, tumbuh pada ladang atau lahan bukaan baru di hutan belantara. Andaliman bukan ditanam, seperti cabai, merica, dan sayur-mayur lainnya. Biasanya andaliman tumbuh begitu saja (Wijaya, 2000). Daya kecambah andaliman rendah. Tanaman yang tumbuh alami berasal dari

**Universitas Indonesia**

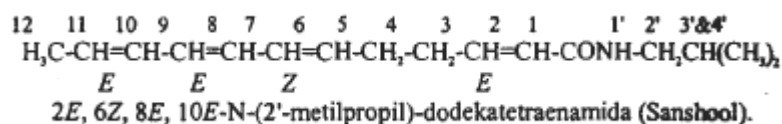
biji yang disebarkan oleh burung (setelah memakan buah andaliman). Petani juga memperoleh bibit secara tidak sengaja dari lokasi bekas pembakaran gulma di daerah tanaman yang sudah tua (Siregar, 2002).

### 2.2.2 Kandungan Kimia

Spesies dari *Zanthoxylum* umumnya mempunyai rasa pedas dan getir yang makin menyengat bila buah telah matang sempurna. Kekhasan dari tanaman andaliman ialah kemampuan buahnya memberi sifat sensorik yang unik yaitu sensasi trigeminal menggigit pada lidah, selain aromanya yang menyenangkan (Wijaya, 2000).

Sebagian besar komponen volatil dari genus *Zanthoxylum* adalah terpenoid. Salah satu komponen yang paling banyak dalam minyak atsiri dari *Z. acanthopodium* (Indonesia) adalah geranil asetat (35%), sedangkan komponen lainnya adalah senyawa limonen, sitronelal, dan linalol.

Beberapa kandungan kimia dari buah andaliman telah dipublikasikan antara lain oleh Wijaya (2000) yang mengisolasi senyawa amida tersubstitusi (Gambar 2.3) dengan pelarut etil asetat-etanol. Hasil analisis spektrofotometri menunjukkan bahwa komponen bernitrogen mempunyai bobot molekul sebesar 247 dengan rumus molekul  $C_{16}H_{25}ON$ . Komponen tersebut merupakan komponen alifatik dengan rantai karbon yang terdapat baik dalam bentuk metil, metilen, maupun metin, bercabang dan memiliki beberapa ikatan rangkap. Oksigen terikat dalam bentuk karbonat. Interpretasi data menunjukkan bahwa komponen tersebut adalah sebuah amida dengan konfigurasi sebagai berikut:



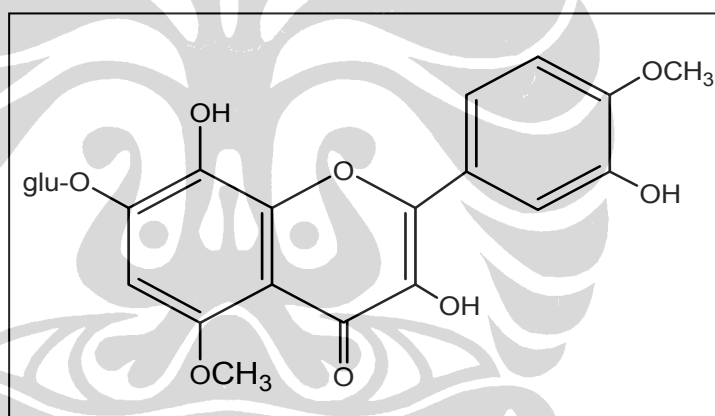
[Sumber : Wijaya, Hadiprodjo, Apriyantono, 2001]

**Gambar 2.3** Struktur molekul senyawa trigeminal aktif dari buah andaliman

Komponen volatil dalam aroma buah andaliman telah dikarakterisasi oleh Wijaya, Hadiprodjo, dan Apriyantono (2001). Berdasarkan hasil identifikasi

minyak atsiri dalam andaliman dengan GC-MS terdeteksi sebanyak 24 komponen volatil dengan mayoritas terdiri dari monoterpen teroksigenasi. Sitronelal adalah komponen kunci aroma andaliman yang intensitas aromanya paling tinggi. Sitronelal memberikan aroma citrus, kuat, hangat. Limonen yang juga salah satu komponen kunci aroma andaliman memberikan aroma kulit jeruk dan manis. Komponen lainnya pembawa aroma pada andaliman meliputi linalol, geraniol, geranial, dan geranil asetat.

Senyawa glikosida flavon baru berhasil diisolasi dari buah andaliman yang tumbuh di India. Senyawa 7-O- $\alpha$ -D-glukosil-3-8-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-5-metoksi-4H-1-benzopiran-4-on (Gambar 2.4) diperoleh dari ekstrak metanol serbuk kering buah andaliman dan merupakan flavon yang pertama kali dilaporkan dari genus *Zanthoxylum* (Babu dan Khurana, 2007).



[Sumber : Babu dan Khurana, 2007]

**Gambar 2.4** Struktur molekul senyawa flavon diisolasi dari buah andaliman di India

### 2.2.3 Aktivitas Biologi

Andaliman dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba. Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak buah andaliman mampu menghambat pertumbuhan berbagai mikroba yang bersifat patogen dan merusak bahan pangan seperti *Eschericia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas fluorescens*, dan *Aspergillus flavus* (Miftakhurohmah dan Suhirman, 2009). Minyak atsiri daun andaliman menghambat pertumbuhan jamur

*Botryodiplodia theobromae* dan *Colletotrichum gloeosporioides* (Dubey, Kumar, Jaya, 2007). Penelitian lainnya adalah uji efek perlakuan ekstrak buah andaliman terhadap fertilitas dan perkembangan embrio mencit yang menunjukkan ekstrak buah andaliman bersifat antifertil (Sabri, 2007). Aktivitas ekstrak etanol buah andaliman sebagai antiinflamasi telah diteliti secara *in vitro* dan membuktikan bahwa ekstrak etanol buah andaliman mampu menghambat *Tumor Necrosis Factor*, Interleukin-6, dan siklooksigenase yang berperan penting dalam proses inflamasi (Yanti, Pramudito, Nuriasari, dan Juliana, 2011).

Beberapa penelitian membuktikan bahwa ekstrak buah andaliman mempunyai aktivitas antioksidan (Tensiska, Wijaya, dan Andarwulan, 2003; Wijaya, 1999). Aktivitas antiradikal ekstrak etanol buah andaliman dengan konsentrasi 200 ppm menunjukkan daya inhibisi sebesar 61,81% (Suryanto, Sastrohamidjojo, Raharjo, Tranggono, 2004). Aktivitas antioksidan ekstrak buah andaliman dibuktikan juga stabil terhadap berbagai kondisi suhu dan pH (Tensiska, Wijaya, dan Andarwulan, 2003).

## **2.3 Aktivitas Antioksidan**

### **2.3.1 Spesies Oksigen Reaktif (ROS)**

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat molekul sel tersebut (Wijaya, 1996). Radikal bebas dihasilkan secara normal oleh metabolisme dalam tubuh seperti metabolisme sel, peradangan, atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan (Langseth, 1995). Namun jika keberadaannya melebihi daya proteksi endogen, radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif dapat merusak membran sel, mengoksidasi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang merupakan faktor utama penyebab penyakit jantung koroner dan menginisiasi terjadinya kanker dengan mengoksidasi DNA (Reynertson, 2007). Radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak bahkan DNA dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Leong dan Shui, 2002).

Keluarga radikal bebas yang dihasilkan dari oksigen disebut spesies oksigen reaktif (ROS), terbentuk dalam kondisi fisiologis normal, tetapi menjadi merugikan ketika tidak dieliminasi oleh sistem endogen, yang menyebabkan

**Universitas Indonesia**

kerusakan molekul lain dengan menarik elektron untuk mencapai stabilitas. ROS adalah ion, atom atau molekul yang memiliki kemampuan untuk mengoksidasi molekul. ROS adalah berbagai bentuk oksigen yang diaktifkan, seperti radikal anion superoksida ( $O_2^-$ ) dan radikal hidroksil ( $OH^\bullet$ ). Radikal anion superoksida akan sangat berbahaya apabila terdapat bersama-sama dengan hidrogen peroksida karena akan menghasilkan radikal hidroksil (Marks dan Smith, 2000; Pokorny, Yanishlieva, dan Gordon, 2001).

Di dalam tubuh, radikal bebas berasal dari dua sumber: sumber endogen, misalnya dari metabolisme sel, proses penuaan, peradangan dan lain-lain serta sumber eksogen misalnya asap tembakau, ionisasi radiasi, polusi udara, pelarut organik, dan pestisida, yang dapat mengoksidasi biomolekul sampai mengakibatkan kematian sel. Stres oksidatif adalah hasil dari ketidakseimbangan antara ROS dan sistem antioksidan endogen yang menghasilkan berbagai penyakit dan gangguan seperti penyakit kardiovaskular, gangguan saraf, penyakit hati (*liver*) yang diinduksi dari alkohol, dan aterosklerosis. Radikal anion superoksida meningkat dalam kondisi stres seperti olahraga berat, obat-obatan tertentu, infeksi dan berbagai penyakit (Chanda dan Dave, 2009). Produksi ROS intraseluler terkait dengan sejumlah peristiwa selular termasuk karena aktivasi NAD(P)H oksidase, xantin oksidase (XOD), dan siklus respirasi mitokondria sel (Lin et al., 2008).

### 2.3.2 Antioksidan

Antioksidan dinyatakan sebagai senyawa yang secara signifikan dapat menghambat oksidasi, sekalipun dengan konsentrasi yang lebih rendah, dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi (Apaka et al., 2007). Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas (Prakash, Rigelhof, Miller, 2001). Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam (Suhartono, 2002).

Sel tubuh manusia dilengkapi dengan berbagai jenis mekanisme untuk melawan ROS dan untuk menjaga homeostasis redoks sel. Sebagai contoh, antioksidan enzim seperti superoksida dismutase, katalase dan glutathione

peroksidase memainkan peran penting dalam peredaman radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Molekul seperti vitamin C dan E menghambat peroksidasi lipid dalam sel (Chanda dan Dave, 2009). Tubuh manusia menghasilkan senyawa antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh (Hernani, 2005). Hal ini akan menyebabkan terjadinya penurunan status antioksidan secara menyeluruh dan berakibat perlindungan tubuh terhadap serangan radikal bebas melemah, sehingga terjadilah berbagai macam penyakit (Wijaya, 1997). Ketika mekanisme perlindungan antioksidan menjadi tidak seimbang pada tubuh manusia, suplemen antioksidan dapat digunakan untuk membantu mengurangi kerusakan oksidatif (Chanda dan Dave, 2009).

Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen untuk mengatasi masalah-masalah seperti penyakit degeneratif (Tahir, Wijaya, Widianingsih, 2003). Selain itu, antioksidan juga berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Berbagai kerusakan seperti ketengikan, perubahan nilai gizi, perubahan warna dan aroma, serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena oksidasi dapat dihambat oleh antioksidan .

Antioksidan tidak hanya digunakan dalam industri farmasi, tetapi juga digunakan secara luas dalam industri makanan, industri petroleum, industri karet dan sebagainya (Tahir, Wijaya, dan Widianingsih, 2003). Fungsi utama antioksidan digunakan dalam makanan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi. Lipid peroksidasi merupakan salah satu faktor yang cukup berperan dalam kerusakan selama dalam penyimpanan dan pengolahan makanan. Adanya antioksidan alami maupun sintetik dapat menghambat oksidasi lipid, mencegah kerusakan, perubahan dan degradasi komponen organik dalam bahan makanan sehingga dapat memperpanjang umur simpan (Hernani, 2005).



Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan dari bahan alami). Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk pangan yaitu *Butylated hydroxyanisol* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), propil galat, dan tokoferol (Pokorny, Yanishlieva, dan Gordon, 2001).

Berdasarkan fungsinya, antioksidan dibagi atas dua kelas yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer bekerja mencegah pembentukan senyawa radikal baru, mengubah radikal bebas menjadi berkurang reaktivitasnya sebelum radikal bebas ini sempat bereaksi. Antioksidan yang termasuk golongan ini adalah senyawa golongan fenol seperti BHA, BHT, dan flavonoid. Antioksidan sekunder berfungsi mencegah terjadinya reaksi berantai dan memperlambat laju autooksidasi melalui berbagai mekanisme yaitu pengikatan dengan ion logam dan atom oksigen dan penyerapan radiasi ultraviolet. Contoh senyawa yang termasuk golongan ini adalah asam askorbat (Pokorny, Yanishlieva, dan Gordon, 2001).

Menurut Pratt dan Hudson (1990) serta Shahidi dan Naczk (1995), senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, dan tokoferol. Metabolit sekunder tersebut ditemukan pada semua bagian dalam tanaman seperti daun, buah, biji, akar, dan batang (Chanda dan Dave, 2009). Selain senyawa fenolik dan polifenolik, penelitian terbaru telah mengungkapkan bahwa triterpenoid juga memiliki aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal bebas (Aparecida, Pereira, Gamboa, Zanoni, dan Furlan, 2010).

Kekuatan antioksidan tergantung pada jumlah dan posisi gugus hidroksil dalam struktur rantai utama, kehadiran glikosida (-OR) atau aglikon (-OH), dan ikatan rangkap terkonjugasi. Flavon dan flavanon yang tidak memiliki substituen OH tidak menunjukkan aktivitas antioksidan (Apaka et al., 2007).

Pada penelitian Aparecida, Pereira, Gamboa, Zanoni, dan Furlan (2010), triterpen kuinonmetida memiliki ciri khas sistem fenol/dienonik dan ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatik A dan B. Aktivitas peredaman radikal bebas dari triterpen kuinonmetida sebagian besar disebabkan oleh rantai karbonil

tak jenuh dengan konjugasi diperpanjang melalui cincin B. Senyawa rutin yang digunakan sebagai model flavonoid menghasilkan persen inhibisi 3,7 kali lebih kuat daripada triterpenoid. Hal ini mengkonfirmasi aktivitas antioksidan flavonoid yang lebih kuat daripada triterpenoid.

### 2.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Sejumlah besar metode *in vitro* telah dikembangkan untuk mengukur aktivitas antioksidan alami baik sebagai senyawa murni atau sebagai ekstrak tanaman. Pengujian antioksidan secara *in vitro* baik dari yang paling umum maupun yang jarang digunakan, antara lain metode uji *reducing power*, uji peredaman radikal DPPH (difenilpicrilhidrazil), uji aktivitas peredaman radikal superoksida, uji penghambatan xantin oksidase, uji peredaman radikal hidroksil, uji pembentukan kompleks dengan logam, dan uji kapasitas serapan radikal oksigen atau *Oxygen Radical Absorbance Capacity/ ORAC* (Chanda dan Dave, 2009).

Metode-metode tersebut populer terkait dengan kecepatan dan sensitivitasnya yang tinggi. Namun, adalah penting untuk menggunakan lebih dari satu metode untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan bahan tanaman karena sifat fitokimia yang kompleks (Salazar et al., 2008.).

Metode uji aktivitas antioksidan dibagi atas 2 kelompok utama yaitu 1) mengukur potensi sampel dalam menyumbang elektron atau atom hidrogen kepada spesies oksigen reaktif yang spesifik atau akseptor elektron lainnya; 2) mengukur kemampuan sampel mengeliminasi sumber inisiasi oksidatif, contohnya dengan menghambat enzim, membentuk kompleks dengan ion logam transisi, dan menyerap radiasi sinar UV (Vaya dan Aviram, 2001).

#### 2.3.3.1 Uji Anti Radikal Bebas

Jenis pengujian ini membutuhkan radikal bebas yang stabil, meliputi radikal DPPH (Blois, 1958; Brand-Williams, Cuvelier, Berset, 1995) dan ABTS (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) (Thaipong, Boonprakob, Crosby, Cisneros-Zevallos, dan Byrne, 2006). Pengujian yang termasuk kelompok antiradikal bebas ini antara lain uji peredaman radikal anion superoksida dan uji

peredaman radikal hidroksil. Sistem xantin oksidase sering digunakan untuk menghasilkan radikal anion superoksida (Cos et al., 1998).

#### 2.3.3.2 Uji Penghambatan Enzim

Beberapa enzim yang terlibat dalam produksi ROS selama reaksi berlangsung antara lain adalah lipooksigenase, siklooksigenase, dan xantin oksidase. Xantin oksidase mengkatalisis produksi asam urat (Marks & Smith, 2000) dan radikal anion superoksida (Cos et al., 1998). Lipooksigenase dan siklooksigenase menghasilkan lipid hidroperoksida sebagai hasil metabolisme asam arakidonat. Inhibitor dari enzim-enzim tersebut dapat menurunkan jumlah ROS dalam sistem biologis (Vaya dan Aviram, 2001).

#### 2.3.3.3 Pembentukan Kompleks dengan Logam Transisi

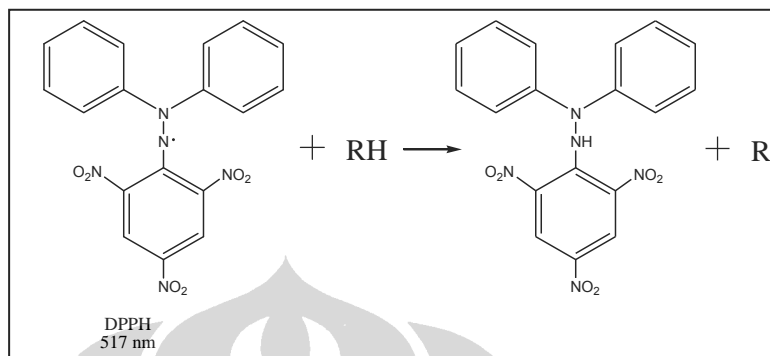
Dalam sistem biologis, logam transisi seperti besi dan tembaga ditemukan bersama dengan protein dan enzim. Dalam keadaan bebas, logam tersebut dapat mengkatalisis reaksi radikal bebas. Kemampuan suatu antioksidan dalam mengkompleks ion logam transisi dapat dipelajari secara spektrofotometri (Vaya dan Aviram, 2001) dengan mengukur kemampuannya melepaskan ion besi dari kompleks besi-EDTA kemudian membentuk kompleks dengan ion besi tersebut (Chanda dan Dave, 2009).

#### 2.3.4 Metode Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan adalah difenilpicrilhidrazil (DPPH). Metode DPPH merupakan metode sederhana dan mudah untuk skrining aktivitas peredaman radikal beberapa senyawa, selain itu metode ini terbukti akurat dan praktis (Prakash, Rigelhof, dan Miller, 2001).

Menurut Molyneux (2004), DPPH adalah suatu senyawa radikal bebas yang stabil berdasarkan delokalisasi elektron bebas dalam molekul secara keseluruhan, sehingga molekul-molekul tidak berdimerisasi, seperti yang akan terjadi dengan sebagian radikal bebas lainnya. Delokalisasi juga menghasilkan warna ungu tua, ditandai oleh penyerapan suatu pita dalam larutan etanol di

sekitar 520 nm. Ketika larutan DPPH direaksikan dengan suatu zat yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, maka ini menimbulkan bentuk tereduksi (DPPH-H) dengan hilangnya warna ungu (Gambar 2.5).



[Sumber : Prakash, Rigelhof, dan Miller, 2001]

**Gambar 2.5** Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan

Larutan DPPH yang berisi sampel diukur serapan cahayanya dan dihitung aktivitas antioksidannya dengan menghitung persentase inhibisi, yaitu besarnya aktivitas senyawa antioksidan yang dapat meredam radikal bebas DPPH. Parameter yang juga digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan adalah  $IC_{50}$ , yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal sebesar 50% (Molyneux, 2004).

Untuk menentukan  $IC_{50}$ , diperlukan persamaan garis dari persen inhibisi sebagai sumbu  $y$  dan konsentrasi fraksi antioksidan (sampel) sebagai sumbu  $x$ .  $IC_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 50 ke dalam persamaan garis sebagai sumbu  $y$  kemudian dihitung nilai  $x$  sebagai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux, 2004). Dalam hal ini diharapkan bahwa radikal bebas dapat diredam oleh senyawa antioksidan hanya dengan konsentrasi yang kecil.

### 2.3.5 Uji Penghambatan Xantin Oksidase

#### 2.3.5.1 Enzim

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai katalisator, senyawa yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Untuk mengkatalisis suatu reaksi kimia, enzim berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim-substrat. Kecepatan, spesifisitas, dan kendali pengaturan terhadap reaksi enzim adalah akibat dari urutan asam amino spesifik yang unik yang membentuk enzim. Kerja enzim dapat diterangkan dengan dua teori, yaitu teori gembok dan kunci serta teori *induced fit*. Kedua teori ini menjelaskan spesifitas enzim dengan substratnya (Marks dan Smith, 2000).

Reaksi berlangsung di suatu daerah pada enzim yang disebut sisi aktif. Sisi aktif juga dapat mengandung kofaktor yang merupakan senyawa organik non protein atau logam yang ikut serta dalam reaksi. Meningkatkan kecepatan reaksi dilakukan dengan menurunkan energi aktivasi (energi yang diperlukan untuk reaksi). Penurunan energi aktivasi dilakukan dengan membentuk kompleks dengan substrat. Setelah produk dihasilkan, enzim kemudian lepas dan bebas untuk membentuk kompleks yang baru dengan substrat yang lain (Marks dan Smith, 2000).

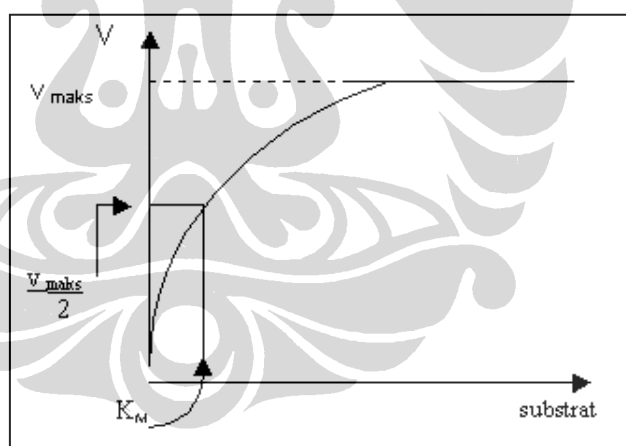
Faktor-faktor yang mempengaruhi kerja enzim adalah suhu, pH, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, keberadaan aktivator dan inhibitor (Marks dan Smith, 2000; Murni, Kholisoh, Tanti, dan Petrissia, 2011). Jika faktor-faktor tersebut dioptimasi, maka enzim dapat menghasilkan kinerja optimum yang ditunjukkan dengan tingginya nilai aktivitas enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu, semakin tinggi konsentrasi enzim maka semakin besar pula aktivitas enzim tersebut. Pada konsentrasi enzim yang tetap, penambahan konsentrasi substrat sampai pada batas konsentrasi tertentu akan meningkatkan kecepatan reaksi. Kenaikan suhu dan perubahan pH lingkungan dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi yang mengakibatkan aktivitas enzim menurun (Murni, Kholisoh, Tanti, dan Petrissia 2011).

### 2.3.5.2 Kinetika Enzim (Marks dan Smith, 2000)

Kecepatan semua enzim bergantung pada konsentrasi substrat. Persamaan kinetika enzim memberi suatu cara kuantitatif untuk menjelaskan enzim dalam kaitannya dengan ketergantungan enzim terhadap konsentrasi substrat.

Persamaan Michaelis-Menten menghubungkan kecepatan awal reaksi yang dikatalisis enzim ( $V_i$ ) dengan konsentrasi substrat ( $S$ ), dan dua tolak ukur  $K_m$  dan  $V_m$ .  $V_m$  adalah kecepatan reaksi yang diekstrapolasikan ke konsentrasi substrat tak terhingga dan  $K_m$  adalah konsentrasi substrat sewaktu kecepatan awal setara dengan separuh  $V_m$ . Pada model kinetika enzim Michaelis-Menten, kecepatan reaksi sebanding dengan konsentrasi kompleks enzim-substrat (ES).

Pada konsentrasi substrat yang lebih tinggi daripada konsentrasi enzim, semua molekul enzim telah mengandung substrat yang terikat sehingga jumlah substrat yang diubah menjadi produk dapat diabaikan. Jika  $[S]$  diplotkan dalam grafik terhadap  $V_i$ , maka kurva Michaelis-Menten akan berbentuk sigmoid (Gambar 2.6).

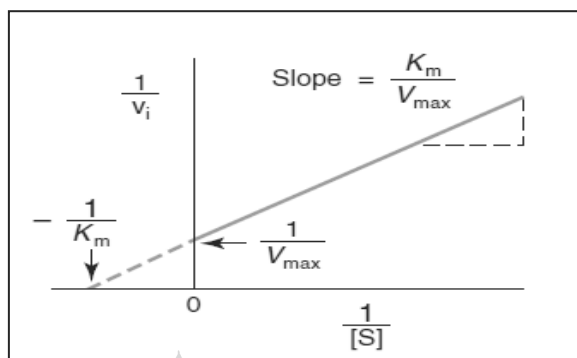


[Sumber : Marks dan Smith, 2000]

**Gambar 2.6** Grafik persamaan Michaelis-Menten

$K_m$  dan  $V_m$  untuk suatu enzim dapat ditentukan secara visual dari gambar grafik  $1/v$  terhadap  $1/S$  yang disebut grafik Lineweaver-Burk (*double reciprocal plot*).  $K_m$  dapat diperkirakan dengan menggunakan garis miring  $y$  dan titik potong  $y$  atau titik potong negatif  $x$ . Transformasi Lineweaver-Burk (Gambar 2.7) untuk

persamaan Michaelis-Menten menghasilkan suatu persamaan yang memiliki bentuk garis lurus,  $y = bx + a$ .



[Sumber : Marks dan Smith, 2000]

**Gambar 2.7** Grafik Lineweaver-Burk

Suatu inhibitor enzim adalah senyawa yang menurunkan kecepatan reaksi enzimatik melalui pengikatan dengan enzim. Molekul inhibitor yang didasarkan pada ikatan enzim mencakup inhibitor ireversibel dan inhibitor reversibel. Inhibitor ireversibel membentuk ikatan kovalen atau ikatan yang sangat erat pada sisi aktif enzim. Analog substrat merupakan inhibitor enzim yang sangat kuat dan spesifik karena mengikat enzim lebih kuat dibandingkan dengan yang dilakukan oleh substrat atau produk. Inhibitor reversibel adalah senyawa yang tidak berikatan secara kovalen dengan enzim dan dapat terlepas dari enzim dengan kecepatan yang bermakna (Marks dan Smith, 2000).

Berdasarkan sifat kinetika, inhibitor reversibel yang berikatan dengan tempat aktif enzim dapat bersifat kompetitif dan non kompetitif. Inhibitor kompetitif berkompetisi dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim. Inhibitor ini biasanya adalah analog substrat. Peningkatan konsentrasi substrat dapat mengatasi inhibisi kompetitif. Oleh karena itu, inhibitor kompetitif meningkatkan  $K_m$  enzim tetapi tidak  $V_m$ .

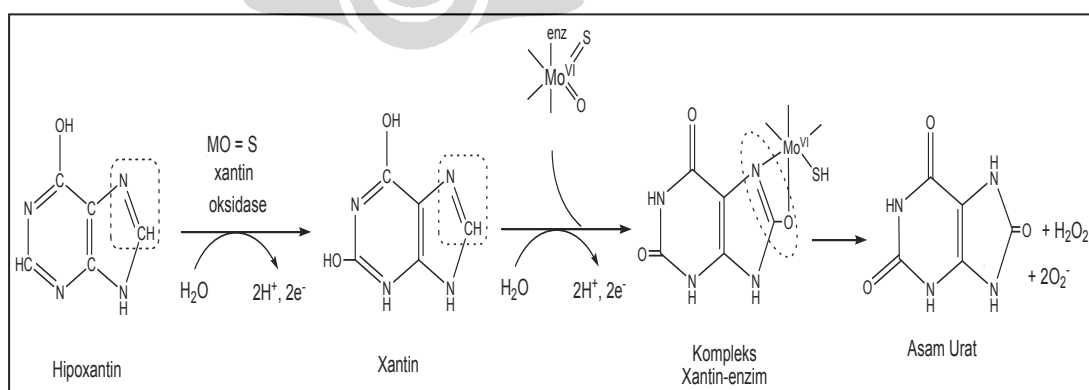
Inhibisi non kompetitif terjadi apabila inhibitor tidak bersaing dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim. Inhibitor dapat berikatan dengan enzim dengan atau tanpa keberadaan substrat, dan peningkatan konsentrasi substrat tidak dapat mencegah pengikatan inhibitor. Inhibitor non kompetitif akan selalu mengubah  $V_m$  enzim tanpa mempengaruhi  $K_m$ .

### 2.3.5.3 Xantin Oksidase

Xantin oksidase (XO) adalah homodimer dari subunit independen yang bersifat katalitik dengan perkiraan bobot massa molekul 290 kD. Masing-masing subunit terdiri dari 1 mol atom Mo, 4 mol atom Fe, dan 1 mol FAD (Lin et al., 2008). Xantin oksidase di dalam tubuh terdapat pada hati dan otot. Enzim ini dapat mengkatalisis reaksi oksidasi hipoxantin dan xantin menjadi asam urat yang berperan penting dalam timbulnya gout.

Xantin oksidase dapat menjadi sumber radikal bebas yang menyebabkan berbagai kondisi patologis seperti aterosklerosis, inflamasi, kanker, dan penuaan dini. Enzim ini mereduksi molekul oksigen dan menghasilkan radikal superoksida dan hidrogen peroksida (Cos et al., 1998; Lin et al., 2008). Selain menyebabkan pembentukan batu ginjal dan iskemik miokardium, peningkatan kadar XO juga menyebabkan penyakit yang diinduksi spesies oksigen reaktif/ROS (Tamta, Sukirti, dan Anup, 2006).

Xantin oksidase mengandung sebuah kompleks molibdenum-sulfida (Mo-S) yang mengikat substrat dan memindahkan elektron yang diperlukan untuk reaksi hidroksilasi. Selama proses oksidasi xantin membentuk asam urat, elektron dan atom oksigen datang dari air. Oksidasi dilangsungkan oleh suatu kompleks koordinasi molibdenum-okso-sulfida di sisi aktif yang membentuk kompleks dengan gugus yang sedang dioksidasi (Marks dan Smith, 2000). Reaksi perubahan hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat dapat dilihat pada Gambar 2.8.



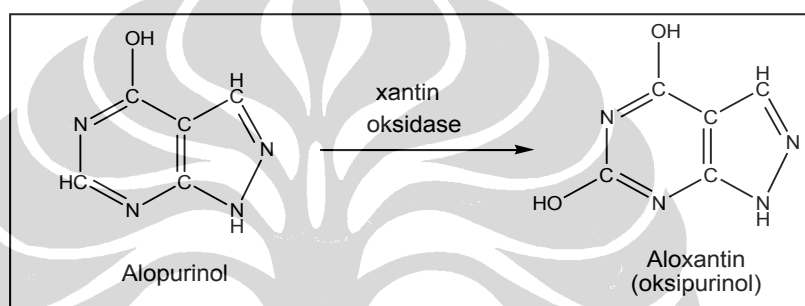
[Sumber : Cos et al., 1998; Marks dan Smith, 2000; Ringertz, 1966]

**Gambar 2.8** Skema reaksi xantin oksidase menjadi asam urat



#### 2.3.5.4 Senyawa Penghambat Xantin Oksidase

Alopurinol adalah inhibitor kompetitif bagi enzim xantin oksidase yang berperan dalam degradasi nukleotida purin menjadi asam urat. Alopurinol, suatu analog struktural hipoxantin, mengalami oksidasi oleh xantin oksidase menjadi oksipurinol, suatu analog xantin (Gambar 2.9). Apabila telah terbentuk, oksipurinol akan tetap terikat ke kompleks molibdenum-sulfida sehingga tidak dapat dihasilkan kompleks molibdenum-sulfida yang tereduksi. Akibatnya, enzim melakukan bunuh diri dan asam urat yang terbentuk menjadi berkurang (Marks dan Smith, 2000).



[Sumber : Marks dan Smith , 2000]

**Gambar 2.9** Skema reaksi alopurinol menjadi oksipurinol

Penemuan Lin et al. (2010) menunjukkan bahwa triterpenoid memiliki aktivitas penghambat xantin oksidase sehingga bisa melindungi tubuh manusia dari radikal bebas dengan cara menghambat pembentukan ROS. Triterpenoid mungkin dapat menjadi agen protektif terhadap penyakit yang terkait dengan peningkatan jumlah ROS.

Flavonoid adalah golongan metabolit sekunder yang memiliki banyak aktivitas biologi seperti antibakteri, antivirus, antioksidan, antimutagenik dan penghambat beberapa enzim. Telah dilaporkan bahwa flavonoid dapat menghambat xantin oksidase dan memiliki aktivitas peredaman superoksida (Cos et al., 1998).

Aktivitas kumarin menghambat xantin oksidase serta hubungan antara struktur dan aktivitas kumarin yang berinteraksi dengan enzim ini telah dilaporkan. Eskuletin telah diteliti merupakan senyawa paling ampuh dalam menghambat aktivitas xantin oksidase dan meredam ROS. Karena ada banyak

sumber ROS selain xantin oksidase, eskuletin tidak hanya menghambat xantin oksidase tetapi juga dapat memblokir NADPH oksidase dan memelihara fungsi mitokondria untuk mereduksi jumlah ROS, sedangkan alopurinol hanya memiliki peran tunggal sebagai penghambat xantin oksidase (Lin et al., 2008).

#### 2.3.5.5 Metode Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase

Uji aktivitas penghambatan xantin oksidase diukur dengan mengamati penurunan pembentukan asam urat pada panjang gelombang optimum (Bergmeyer, 1974; Umamaheswari, Asokkumar, Sivashanmugam, dan Remyaraju, 2009). Campuran uji terdiri dari substrat (xantin) dan inhibitor untuk melihat persaingan yang sama dari substrat dan inhibitor pada situs aktif enzim (Tamta, Sukirti, dan Anup, 2006). Sistem pengujian terdiri dari campuran yang mengandung dapar fosfat, larutan xantin sebagai substrat yang dibuat segar, dan xantin oksidase (Bergmeyer, 1974). Pengujian dilakukan dengan menambahkan enzim untuk reaksi campuran tanpa atau dengan inhibitor (Lin et al., 2008) menggunakan alopurinol sebagai kontrol positif (Lin et al., 2008; Tamta, Sukirti, Anup, 2006). Satu unit xantin oksidase dapat mengkonversi satu  $\mu\text{mol}$  substrat (xantin) menjadi asam urat tiap satu menit pada pH optimum dan suhu optimum (Bergmeyer, 1974).

#### 2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan senyawa aktif dari jaringan tanaman (dan hewan) dengan menggunakan pelarut yang selektif melalui suatu prosedur. Ekstrak yang diperoleh mengandung campuran metabolit yang kompleks, dalam keadaan cair, kental, atau bentuk serbuk kering, serta ditujukan untuk penggunaan oral atau eksternal (Handa, Khainuja, Longo, dan Rakesh, 2008).

Berikut adalah beberapa metode ekstraksi yang umum digunakan untuk tanaman obat (Handa, Khainuja, Longo, dan Rakesh, 2008) :

##### a. Maserasi

Dalam proses ini, seluruh bahan ditempatkan dalam wadah tertutup dan direndam dengan pelarut pada suhu ruangan selama waktu tertentu disertai

pengocokan yang teratur sampai komponen larut. Cairan penyari berdifusi melalui dinding sel untuk melarutkan komponen dalam sel dan menariknya keluar dari sel. Pengocokan membantu difusi dan penyebaran pelarut secara merata. Akhir proses maserasi adalah tercapainya konsentrasi pada keseimbangan.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan pada suhu kamar. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 3-4 kali bahan.

c. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi kontinu pada suhu titik didih pelarut dengan alat khusus menggunakan sejumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

d. *Ultrasonic Extraction*

Proses ini melibatkan penggunaan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20 kHz sampai 2000 kHz sehingga permeabilitas dinding sel meningkat dan pelepasan isi sel serta perpindahan massa dapat terfasilitasi oleh efek mekanik yang ada. Meskipun proses ini berguna dalam beberapa hal seperti ekstraksi akar *Rauwolfia*, metode ultrasonik dapat merusak senyawa aktif tanaman obat (lebih dari 20 kHz) dan membentuk radikal bebas serta perubahan dalam molekul obat yang tidak diinginkan.

e. *Supercritical Fluid Extraction (SFE)*

SFE adalah metode alternatif dengan tujuan untuk mengurangi jumlah pelarut yang digunakan dan meningkatkan hasil/output sampel. Faktor yang perlu diperhatikan antara lain suhu, tekanan, volume sampel, pengumpulan analit, dan laju alir. Ekstraktan yang biasa digunakan adalah karbondioksida.

f. *Microwave assisted extraction* (MAE)

MAE merupakan metode ekstraksi dengan pemanasan pada gelombang *microwave* (2450 MHz) yang terjadi dengan selektif dan tertarget pada bahan yang memiliki dipol polar. Mekanisme pemanasan yang unik ini dapat menurunkan waktu ekstraksi secara signifikan dibandingkan metode konvensional seperti maserasi (12 – 24 jam) dan mengurangi jumlah pelarut yang digunakan.

g. Metode lainnya

Untuk memperoleh ekstrak dari tanaman yang mengandung minyak atsiri (*aromatic plants*), beberapa metode ekstraksi yang dapat dilakukan antara lain adalah destilasi, *expression* atau *cold pressing*, enfleurage, atau ekstraksi dengan pelarut organik.

## 2.5 Metode Pemisahan

### 2.5.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan mengalir (kromatografi kolom) atau berupa pembentukan lapis tipis dimana fase gerak dibiarkan untuk naik berdasarkan kapilaritas (kromatografi lapis tipis) (Christian, 1994; Skoog, 1993).

Kromatografi lapis tipis (KLT) ialah metode pemisahan fisikokimia yang banyak digunakan untuk analisis kualitatif senyawa organik, analisis kuantitatif, dan isolasi skala preparatif. Sistem pelarut untuk KLT dapat dipilih dari pustaka, tetapi lebih sering dari percobaan. Sebagian besar pengembangan KLT dilakukan dengan cara menaik sederhana. Penampakan bercak dilakukan untuk mengetahui letak bercak senyawa tanwarna pada lapisan yang telah dikembangkan. Cara penampakan dapat digolongkan ke dalam penampak bercak umum atau penampak bercak khas yang hanya berlaku untuk senyawa jenis atau golongan tertentu. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf (Stahl, 1969; Gritter, Bobbitt, dan Schwarting, 1985).

### 2.5.2 Kromatografi Kolom

Pada kromatografi kolom, sampel yang akan dipisahkan (berupa campuran) ditempatkan pada bagian atas kolom yang berisi serbuk penyerap (umumnya silika), penyerap yang paling banyak digunakan dan mudah didapat, dilanjutkan dengan elusi beruntun setiap komponen memakai pelarut yang cocok. Aliran melalui kolom dapat disebabkan oleh gaya berat atau didorong dengan tekanan. Pita senyawa linearut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah, dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari dasar kolom (Gritter Gritter, Bobbitt, dan Schwarting, 1985).

Pengelusian dapat dilakukan secara isokratik dan secara bertahap atau gradien. Pada pengelusian isokratik, pelarut atau campuran pelarut yang sama dipakai untuk keseluruhan kromatografi. Pada pengelusian bertahap, susunan pelarut diubah tahap demi tahap, setiap tahap lebih polar dari tahap sebelumnya. (Gritter Gritter, Bobbitt, dan Schwarting, 1985).

### 2.5.3 Kromatografi Gas

Kromatografi gas digunakan untuk memisahkan campuran yang komponennya dapat menguap dengan menggunakan gas sebagai fase gerak. Sebagai fase diam dapat berupa zat padat atau zat cair. Bila fase diam berupa zat padat maka teknik ini disebut *Gas Solid Chromatography* (GSC). Bila berupa lapisan tipis zat cair pada zat padat yang inert disebut *Gas Liquid Chromatography* (GLC).

Resolusi pada kromatografi gas ditentukan oleh dua faktor yaitu efisiensi kolom dan efisiensi pelarut. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram dan efisiensi pelarut menentukan posisi puncak kromatogram (Gritter Gritter, Bobbitt, dan Schwarting, 1985).

## 2.6 Metode Identifikasi secara Spektrofotometri (Supratman, 2010; Silverstein Webster, dan Kiemle, 2005)

Spektroskopi adalah studi mengenai antaraksi energi cahaya elektromagnetik dengan senyawa organik yang dikenal dengan metode fisikokimia. Panjang gelombang yang diperoleh bila senyawa organik menyerap cahaya, bergantung

pada struktur senyawa organik tersebut. Setiap senyawa organik akan menyerap energi gelombang elektromagnetik yang berbeda.

### 2.6.1 Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak

Penyerapan sinar ultra violet dan sinar tampak oleh suatu molekul organik akan menghasilkan transisi di antara tingkat energi elektronik pada molekul. Transisi tersebut umumnya antara orbital ikatan atau orbital pasangan elektron bebas ke orbital anti ikatan. Spektrum tampak terletak antara 400 nm (ungu) – 750 nm (merah), sedangkan ultraviolet pada panjang gelombang 200-400 nm.

Untuk keperluan elusidasi struktur, kegunaan spektrofotometri ini terletak pada kemampuannya mengukur jumlah ikatan rangkap atau konjugasi aromatik di dalam suatu molekul dan dapat membedakan diena terkonjugasi dari diena tak terkonjugasi. Letak serapan dapat dipengaruhi oleh substituen dan terutama yang berhubungan dengan substituen (auksokrom) yang menimbulkan pergeseran dalam diena terkonjugasi, senyawa aromatik, dan karbonil terkonjugasi. Penggunaan pelarut yang berbeda juga dapat mempengaruhi pergeseran letak dan intensitas suatu serapan, dapat menyebabkan terjadinya pergeseran batokromik atau hipsokromik.

### 2.6.2 Spektrofotometri Infra Merah

Spektrum infra merah suatu molekul adalah hasil transisi antara tingkat energi getaran (vibrasi) yang berlainan. Tiap senyawa organik memiliki serapan yang khas pada daerah sidik jari ( $1400-800\text{ cm}^{-1}$ ). Meskipun begitu, daerah sidik jari haruslah cocok dengan daerah gugus fungsi agar dapat disimpulkan bahwa senyawa itu identik.

Tipe ikatan yang berlainan menyerap radiasi infra merah pada panjang gelombang yang berlainan pula. Dengan demikian, spektrofotometri infra merah dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya gugus fungsi dalam suatu molekul. Pita-pita infra merah dalam sebuah spektrum dapat dikelompokkan menurut intensitasnya, kuat (s), medium (m), dan lemah (w).

### 2.6.3 Spektrofotometri Massa

Ion organik yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tinggi terhadap sebuah molekul organik bersifat tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam sebuah spektrometer massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif ini akan dideteksi.

Spektrum massa adalah alur kelimpahan jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan versus massa per muatan ( $m/z$  atau  $m/e$ ) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion dari kebanyakan partikel yang dideteksi dalam suatu spektrometer massa adalah +1; maka nilai  $m/z$  sama dengan massa molekulnya ( $M$ ). Struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai struktur molekul induknya dan petunjuk bobot molekul suatu senyawa.

Spektrum massa dipaparkan sebagai grafik batangan. Setiap puncak dalam spektrum menyatakan suatu fragmen molekul. Fragmen-fragmen disusun sedemikian rupa sehingga puncak-puncak ditata menurut kenaikan  $m/z$  dari kiri ke kanan dalam spektrum.

### 2.6.4 Spektrofotometri Resonansi Magnet Inti

Resonansi magnet inti (RMI atau NMR) berhubungan dengan sifat magnet dari inti atom. Spektroskopi NMR didasarkan pada penerapan gelombang radio oleh inti tertentu dalam molekul organik. Dari spektra resonansi magnet inti proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) akan diperoleh informasi tentang jenis hidrogen, jumlah hidrogen, dan lingkungan hidrogen dalam suatu senyawa, begitu juga halnya dengan spektra resonansi magnet inti karbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ). Spektrum RMI dua dimensi digunakan untuk penentuan struktur molekul/senyawa yang lebih kompleks.

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok dan di Laboratorium Badan Narkotika Nasional, Jakarta mulai bulan Juni 2011 hingga Mei 2012.

### 3.2 Bahan dan Alat

#### 3.2.1 Bahan

##### 3.2.1.1 Bahan Uji

Buah segar andaliman diperoleh dari Kabupaten Dairi, Sumatera Utara. Tanaman andaliman dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Pusat Penelitian Biologi, Cibinong.

##### 3.2.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan antara lain petroleum eter, *n*-heksana, diklorometana, etil asetat, metanol, dan *n*-butanol teknis (Brataco Chemika, Indonesia) yang telah didestilasi, kloroform p.a, metanol p.a, dan *n*-heksana p.a (Merck, Jerman), air suling demineral (Bratacco, Indonesia), dimetil sulfoksida atau DMSO (Merck, Jerman), kalium dihidrogen ortofosfat (Merck, Jerman), asam klorida (Merck, Jerman), natrium hidroksida (Univar, USA), lempeng kromatografi lapis tipis silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Jerman), Alopurinol (Pyridam Farma, Indonesia), silika gel G-60 (Merck, Jerman), DPPH (Sigma Aldrich, Singapura), BHT (Sigma Aldrich, Singapura), Kuersetin (Sigma Aldrich, Singapura), Xantin (Sigma Aldrich, Singapura), Xantin oksidase (Sigma Aldrich, Singapura).

#### 3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lemari pendingin, peralatan maserasi, *rotary vacum evaporator* (Janke & Kunkel IKA, Jerman), bejana kromatografi, lampu UV (Camag, Jerman), peralatan kromatografi kolom,



vial dan botol penampung berbagai ukuran, penangas air (Imperial IV, Amerika Serikat), timbangan analitik (AND HR-200, Kanada), timbangan mikro (Sartorius, Jerman), pipet mikro (Eppendorf, Jerman), sonikator (Elmasonic 60, Jerman), *vortex mixer* (Health, Taiwan), pHmeter (Eutech pH-510, Singapura), spektrofotometer UV-Vis (PG Instruments Ltd., Inggris), spektrofotometer GC-MS (Shimadzu, Jepang), spektrofotometer infra merah (FTIR-8400S Shimadzu, Jepang), Resonansi Magnet Inti (Jeol 400 MHz, Jepang), alat penentuan titik leleh (*Stuart Scientific*, Inggris), lemari pendingin, dan alat-alat gelas.

### 3.3 Tahap Kerja

Secara garis besar, penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap yaitu penyiapan simplisia, ekstraksi, pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan penghambatan xantin oksidase, identifikasi golongan senyawa kimia, isolasi dan pemurnian senyawa aktif, serta identifikasi senyawa aktif secara fisikokimia dan spektroskopi.

#### 3.3.1 Penyiapan Simplisia

Bagian tanaman yang digunakan sebagai simplisia adalah buah yang berwarna hijau. Buah disortasi, dicuci, dan dikeringkan di lemari pengering pada suhu 40°C. Selanjutnya simplisia dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.

#### 3.3.2 Ekstraksi

Simplisia buah andaliman dimaserasi secara bertingkat mulai dari pelarut petroleum eter, diklorometana, etil asetat, *n*-butanol, dan metanol. Sebanyak 3 kg serbuk dibagi dalam beberapa bejana maserasi masing-masing berisi 500 g serbuk dan ditambahkan 1500 mL pelarut hingga merendam seluruh serbuk kemudian dikocok selama 6 jam dengan pengaduk mekanik. Campuran didiamkan 24 jam lalu disaring. Filtrat dikumpulkan dalam suatu wadah. Total pemakaian pelarut adalah 9 L petroleum eter, 8 L diklorometana, 8 L etil asetat, 10 L *n*-butanol, dan 7 L metanol. Masing-masing filtrat diuapkan menggunakan rotavapor pada suhu 50-60°C kecuali ekstrak *n*-butanol pada suhu 75°C sehingga diperoleh ekstrak

kental petroleum eter, diklorometana, etil asetat, *n*-butanol dan metanol, lalu ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap bobot simplisia awal.

### 3.3.3 Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan Ekstrak secara Kualitatif

Masing-masing ekstrak yang diperoleh diuji aktivitasnya secara kualitatif. Larutan uji (30 mg/ 10 mL) ditotolkan pada plat KLT sebanyak 20  $\mu$ L kemudian disemprot menggunakan larutan DPPH 100 ppm sebagai pereaksi semprot dengan hasil positif berupa zona kuning dan latar belakang berwarna ungu.

### 3.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak

Pada penelitian ini, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap masing-masing ekstrak kental menggunakan metode peredaman radikal DPPH dengan metode Blois (1958) yang dimodifikasi.

#### 3.3.4.1. Penyiapan Larutan Percobaan

##### a. Pembuatan larutan DPPH

Serbuk DPPH ditimbang seksama 10 mg kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 100 mL dan dicukupkan hingga batas. Konsentrasi larutan DPPH yang diperoleh adalah 100  $\mu$ g/mL. Wadah dilindungi dari cahaya dengan melapiskan kertas aluminium. Larutan dibuat baru setiap kali pemakaian.

##### b. Pembuatan larutan uji

Ekstrak petroleum eter, diklorometana, etil asetat, *n*-butanol, dan metanol ditimbang seksama 10 mg kemudian dilarutkan dalam metanol p.a dalam labu ukur 10 mL hingga diperoleh larutan induk 1000 ppm. Konsentrasi larutan induk ini ditentukan dengan melakukan orientasi terlebih dahulu. Masing-masing diencerkan hingga menjadi lima seri konsentrasi dengan metanol p.a yaitu 10, 20, 50, 100, dan 200 ppm untuk selanjutnya digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan.

c. Pembuatan larutan standar

Masing-masing BHT dan kuersetin ditimbang seksama 10 mg dan masing-masing dilarutkan dalam metanol p.a hingga diperoleh larutan induk 100 ppm. Dari larutan induk tersebut diencerkan menjadi 5 konsentrasi dengan metanol p.a yaitu 1, 2, 4, 10, dan 16 ppm untuk selanjutnya digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan.

### 3.3.4.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Untuk penentuan panjang gelombang maksimum, ditimbang seksama 10 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dan dicukupkan dalam labu ukur 100 ml sehingga diperoleh larutan DPPH 100 µg/ml. Larutan tersebut kemudian dipipet ke dalam labu ukur 10 mL dan dicukupkan dengan metanol p.a hingga diperoleh konsentrasi akhir larutan 30 µg/mL untuk ditentukan spektrum serapannya pada panjang gelombang 700 nm hingga 400 nm serta ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

### 3.3.4.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 1,0 mL diambil dari masing-masing larutan uji yang telah dibuat, dicampur dengan 1,0 mL larutan DPPH 100 µg/mL dan 2,0 mL metanol p.a serta dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit pada suhu 37°C terlindung dari cahaya. Serapan dari larutan diukur pada panjang gelombang hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH. Pengujian dilakukan duplo. Prosedur yang sama juga dilakukan terhadap pembanding.

Persentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dapat dihitung dengan rumus :

$$Q = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (3.1)$$

Keterangan :

- Q = persentase inhibisi (%)
- A<sub>0</sub> = serapan kontrol (pelarut + DPPH)
- A<sub>1</sub> = serapan larutan uji (pelarut + DPPH + sampel)

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, aktivitas antioksidan ditentukan menggunakan persamaan garis dari % inhibisi sebagai sumbu  $y$  dan konsentrasi sampel sebagai sumbu  $x$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan  $\text{IC}_{50}$  yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%.  $\text{IC}_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 50 ke dalam persamaan garis sebagai sumbu  $y$  kemudian dihitung nilai  $x$  sebagai konsentrasi  $\text{IC}_{50}$ .

Semakin kecil nilai  $\text{IC}_{50}$  menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux, 2004). Ekstrak yang mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  antara 10-50  $\mu\text{g/mL}$  adalah ekstrak dengan aktivitas antioksidan yang kuat (Phongpaichit et al., 2007). Ekstrak aktif tersebut selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawanya kemudian diisolasi menggunakan kromatografi kolom.

### 3.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat

Penyiapan larutan uji dilakukan dengan menimbang 5,0 mg isolat yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL hingga diperoleh larutan induk 200 ppm. Masing-masing larutan induk isolat diencerkan dengan metanol p.a hingga menjadi lima seri konsentrasi yaitu 20, 10, 5, 2, dan 1 ppm untuk selanjutnya digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan. Selanjutnya, pengujian aktivitas masing-masing isolat dilakukan dengan prosedur pengerjaan yang sama dengan pengujian aktivitas ekstrak yaitu dengan metode peredaman radikal DPPH (Blois, 1958) yang dimodifikasi.

### 3.3.6 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase oleh Ekstrak

Pada penelitian ini, dilakukan pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh masing-masing ekstrak kental dengan metode Owen dan Johns (1999) serta metode Tamta, Sukirti, Anup (2006) yang dimodifikasi. Pengujian sampel dilakukan duplo.

### 3.3.6.1. Penyiapan Larutan Percobaan

#### a. Pembuatan larutan xantin

Ditimbang xantin sebanyak 15,21 mg dan dilarutkan dalam sedikit NaOH dan ditambahkan air demineralisasi hingga 100 mL (1mM). Dari larutan tersebut kemudian diencerkan dengan air demineralisasi dalam labu ukur 100 mL hingga diperoleh beberapa konsentrasi substrat yaitu 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; dan 0,25 mM.

#### b. Pembuatan larutan xantin oksidase 0,1 unit/mL

Berdasarkan etiket yang tertera pada kemasan enzim, diperoleh hasil perhitungan 1 mg protein  $\approx$  7,27 mg solid  $\approx$  0,8 unit sehingga ditimbang 9,09 mg xantin oksidase dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat sampai 10,0 mL hingga diperoleh larutan xantin oksidase 0,1 unit/mL (Lampiran 5).

#### c. Pembuatan larutan uji

Ditimbang 10,0 mg ekstrak kental dan dilarutkan dalam sedikit DMSO kemudian dilarutkan dalam dapar fosfat menggunakan labu ukur 10 ml sebagai larutan induk (1000 ppm). Larutan induk dipipet ke dalam labu ukur dan diencerkan dengan dapar fosfat hingga diperoleh konsentrasi akhir larutan sampel sebesar 100, 50, 20, 10, 5 dan 1 ppm.

#### d. Pembuatan larutan Alopurinol

Ditimbang 10,0 mg alopurinol lalu dilarutkan dalam 10 ml dapar fosfat dengan menggunakan labu ukur sebagai larutan induk (1000 ppm). Larutan induk dipipet dan diencerkan dengan dapar fosfat untuk mendapatkan konsentrasi akhir larutan sebesar 0,1; 0,25; 0,5; dan 1 ppm.

### 3.3.6.2 Optimasi Enzim

Kondisi optimum aktivitas enzim untuk pengujian ekstrak kental dan isolat ditentukan dengan melakukan serangkaian optimasi multivarian dengan meragamkan nilai konsentrasi substrat, pH, dan suhu.

- a. Penentuan panjang gelombang maksimum
- Sebanyak 2,9 mL larutan dapar fosfat pH 7,5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM, kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan xantin oksidase 0,1 Unit/mL dalam dapar fosfat. Campuran diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit lalu segera ditambahkan asam klorida 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.
- b. Penentuan suhu optimum
- Sebanyak 2,9 mL larutan dapar fosfat pH 7,5 dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin 0,15 mM, kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan xantin oksidase 0,1 Unit/mL dalam dapar fosfat. Campuran diinkubasi pada suhu 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C selama 30 menit lalu segera ditambahkan asam klorida 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.
- c. Penentuan pH optimum
- Larutan dapar fosfat 50 mM dengan pH masing-masing 7,5; 7,8; 8,0; 8,3; dan 8,5 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2,0 mL larutan substrat xantin konsentrasi 0,15 mM, kemudian dilakukan prainkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 Unit/mL dalam dapar fosfat. Selanjutnya campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian segera ditambahkan 1,0 mL asam klorida 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.
- d. Penentuan konsentrasi optimum substrat
- Larutan dapar fosfat 50 mM pH 7,8 sebanyak 2,9 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2,0 mL larutan xantin dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; dan 0,25 mM, kemudian dilakukan prainkubasi pada

suhu 30°C selama 10 menit, lalu ditambahkan 0,1 mL larutan enzim 0,1 Unit/mL dalam dapar fosfat. Campuran diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 menit. Kemudian segera ditambahkan 1,0 mL asam klorida 1 N untuk menghentikan reaksi. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

Aktivitas enzim dihitung dengan rumus (Sigma Aldrich,1994):

$$\text{unit/mL enzim} = \frac{(\text{Serapan blangko} - \text{serapan kontrol blangko}) \times \text{vol} \times \text{df}}{12,2 \times 0,1} \quad (3.2)$$

Keterangan :

df = faktor pengenceran

vol = volume total larutan uji yang digunakan ( 6 mL)

12,2 = koefisien ekstingsi asam urat pada 284 nm (mM)

0,1 = volume enzim yang digunakan (mL)

### 3.3.6.3 Uji Penghambatan Xantin Oksidase

#### a. Pengujian kontrol blangko

Sebanyak 4,0 mL larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) dan 2,0 mL larutan substrat (xantin 0,15 mM) diinkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit kemudian ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N, lalu diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### b. Pengujian blangko

Sebanyak 3,9 mL dapar fosfat dipipet dan 2,0 mL larutan xantin dicampur serta dihomogenkan dalam tabung reaksi lalu dilakukan prainkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan xantin oksidase serta dihomogenkan dan diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 30 menit. Sebanyak 1,0 mL larutan asam klorida 1N ditambahkan untuk menghentikan reaksi.

#### c. Pengujian sampel

Kondisi optimum pengujian mengacu pada optimasi yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu pada waktu inkubasi 40 menit, suhu 30°C, pH 7,8, dan

konsentrasi substrat (xantin) 0,15 mM. Masing-masing sampel sebanyak 1,0 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi terpisah dengan variasi konsentrasi tertentu. Selanjutnya ke dalamnya ditambahkan 2,9 mL larutan dapar fosfat dan 2,0 mL xantin lalu diprainskubasi pada suhu 30°C selama 10 menit. Xantin oksidase 0,1 unit/mL sebanyak 0,1 mL ditambahkan lalu diinkubasi kembali pada suhu 30°C selama 30 menit. Setelah masa inkubasi, ke dalam campuran dengan segera ditambahkan asam klorida 1N sebanyak 1 mL untuk menghentikan reaksi dan dihomogenkan. Campuran larutan uji selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang hasil optimasi (284 nm) untuk melihat besarnya pembentukan asam urat yang terjadi dalam larutan uji kemudian ditentukan seberapa besar persen hambatan ekstrak yang diujikan terhadap xantin oksidase.

Persentase hambatan xantin oksidase (XO) dihitung dengan rumus (Owen dan Johns, 1999):

$$\% \text{ hambatan xantin oksidase} = 1 - \frac{B}{A} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan :

A = selisih serapan blanko dengan kontrol blanko ( $A_1 - A_0$ )

B = selisih serapan sampel dengan kontrol sampel ( $B_1 - B_0$ )

Nilai  $IC_{50}$  diperoleh melalui analisis regresi linier yang diplot antara konsentrasi sampel terhadap persentase hambat (Apaya dan Chichioco-Hernandez, 2011).

d. Pengujian kontrol sampel

Sebanyak 1,0 mL larutan sampel yaitu ekstrak dengan konsentrasi 1, 5, 10, 20, 50, dan 100, ditambahkan dapar fosfat 50 mM pH 7,8 sebanyak 3,0 mL dan 2,0 mL larutan xantin 0,15 mM. Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



**Tabel 3.1** Larutan percobaan dan volume yang dibutuhkan untuk uji penghambatan xantin oksidase

Larutan Percobaan	Volume			
	Blangko (A <sub>1</sub> )	Kontrol Blangko (A <sub>0</sub> )	Sampel (B <sub>1</sub> )	Kontrol Sampel (B <sub>0</sub> )
Larutan uji (inhibitor)	-	-	1,0 mL	1,0 mL
Dapar fosfat	3,9 mL	4,0 mL	2,9 mL	3,0 mL
Xantin	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Pra inkubasi (suhu optimum)		10 menit		
Enzim	0,1 mL	-	0,1 mL	-
Inkubasi (suhu optimum)		30 menit		
HCl 1N	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Serapan diukur menggunakan spektrofotometer $\lambda$ 284 nm				

### 3.3.7 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase oleh Isolat

Penyiapan larutan uji dilakukan dengan menimbang 5,0 mg isolat dan dilarutkan dalam sedikit DMSO kemudian dilarutkan dalam 5 ml dapar fosfat menggunakan labu ukur sehingga diperoleh larutan induk (1000 ppm). Larutan induk dipipet ke dalam labu ukur dan diencerkan dengan dapar fosfat hingga diperoleh konsentrasi akhir larutan sampel sebesar 10, 5, 2, 1, dan 0,5 ppm. Selanjutnya, pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh masing-masing isolat dilakukan dengan prosedur yang sama pada pengujian aktivitas ekstrak.

### 3.3.8. Uji Kinetika Penghambatan Xantin Oksidase

Uji kinetika penghambatan enzim dilakukan terhadap isolat yang telah diperoleh. Sebelum uji dilakukan, perlu diketahui terlebih dahulu konsentrasi isolat yang memberikan hambatan maksimum. Isolat dengan konsentrasi terbaik selanjutnya digunakan untuk uji kinetika penghambatan xantin oksidase.

#### a. Pengujian tanpa inhibitor

Sebanyak 3,9 mL larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) dan 2,0 mL larutan substrat dengan variasi konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM dicampur

kemudian dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit. Sebanyak 0,1 mL larutan enzim ditambahkan dan diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

b. Pengujian kontrol tanpa inhibitor

Sebanyak 4,0 mL larutan dapar fosfat 50 mM (pH 7,8) dan 2,0 mL larutan substrat (Xantin) dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM diinkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit, lalu ditambahkan 1,0 mL HCl 1 N. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

c. Pengujian dengan inhibitor

Sebanyak 1,0 mL larutan isolat sebagai inhibitor (konsentrasi terpilih) ditambahkan 2,9 mL dapar fosfat pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat (Xantin 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM) lalu dilakukan pra inkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 0,1 mL larutan enzim 0,1 unit/mL. Campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1,0 mL HCl 1 N, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

d. Pengujian kontrol dengan inhibitor

Sebanyak 1,0 mL larutan isolat sebagai inhibitor (konsentrasi terpilih) ditambahkan 3,0 mL dapar fosfat pH 7,8 dan 2,0 mL larutan substrat (Xantin 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 mM) lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 40 menit, kemudian ditambah 1,0 mL HCl 1 N, dan diukur serapannya pada panjang gelombang 284 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Data yang diperoleh kemudian dikonversi dan diinterpretasikan ke dalam persamaan Lineweaver-Burk dalam bentuk grafik. Konsentrasi xantin (substrat)

diubah menjadi  $1/S$  pada sumbu X dan kecepatan reaksi pembentukan asam urat diubah menjadi  $1/V$  pada sumbu Y. Selanjutnya dicari persamaan garis yang terbentuk dan tipe hambatannya berdasarkan perpotongan garis antara kinetika enzim normal (tanpa penambahan isolat) dengan kinetika enzim setelah mendapat perlakuan isolat (Sivashanmugam dan Chatterjee, 2012).

### 3.3.9 Penapisan Fitokimia

Terhadap ekstrak yang aktif menurut uji peredaman radikal DPPH, dilakukan pemeriksaan kandungan kimia dengan beberapa pereaksi kimia antara lain pereaksi untuk alkaloid, flavonoid, triterpenoid/steroid, glikosida, saponin, dan tanin.

#### 3.3.9.1 Identifikasi alkaloid (Depkes RI, 1995)

Untuk mengidentifikasi adanya alkaloid, 50 mg ekstrak kental ditambahkan dengan asam klorida encer 2 N dan air lalu dipanaskan selama 2 menit. Setelah disaring, filtrat yang diperoleh kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Bouchardat LP, Dragendorff LP.

Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif Dragendorff LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Penambahan Bouchardat LP memberikan hasil positif jika terbentuk endapan coklat sampai hitam (Materia Medika, 1995).

#### 3.3.9.2 Identifikasi flavonoid (Depkes RI, 1995)

- a. Ekstrak kental sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 1-2 mL etanol 96% kemudian ditambahkan 0,5 gram serbuk seng P dan 1 mL asam klorida 2 N, didiamkan selama 1 menit lalu ditambahkan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terbentuk warna merah intensif, hal tersebut menunjukkan adanya flavonoid.
- b. Ekstrak kental sebanyak 50 mg dilarutkan dalam 1 mL etanol 96% kemudian ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium P dan 5 tetes asam klorida pekat P. Jika terbentuk warna merah jingga sampai merah ungu, menunjukkan

adanya flavonoid. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon, dan auron.

- c. Ekstrak kental sebanyak 50 mg yang diuji diuapkan hingga kering, sisanya dibasakan dengan aseton P kemudian ditambahkan sedikit serbuk halus asam borat P dan oksalat P. Secara hati-hati, dipanaskan di atas penangas air dan hindari pemanasan yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 5 mL eter P. Perubahan warna diamati dengan sinar UV 366 nm. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning.

#### 3.3.9.3 Identifikasi glikosida (Depkes RI, 1980)

Ekstrak kental sebanyak 100 mg ditambahkan 25 mL air dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit dan saring. Sari filtrat tiga kali, tiap kali dengan 20 mL campuran (3:2) kloroform P dan isopropanol P. Pada kumpulan sari ditambahkan natrium sulfat anhidrat, disaring, dan diuapkan pada suhu tidak lebih dari 50°. Dilarutkan sisa dengan 2 mL metanol. Larutan ini digunakan sebagai larutan percobaan.

Sebanyak 1 mL larutan percobaan diuapkan di atas penangas air, sisa dilarutkan dalam 5 mL asam asetat anhidrat kemudian ditambahkan 10 tetes asam sulfat P, jika terbentuk warna biru atau hijau menunjukkan adanya terpen atau sterol (reaksi Lieberman-Burchard). Sebanyak 1 mL larutan percobaan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian diuapkan di atas penangas air. Sisa ditambahkan 1 mL air dan 5 tetes Molish LP lalu ditambahkan secara hati-hati 10 tetes asam sulfat P. Jika terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan menunjukkan adanya gula (reaksi Molish).

#### 3.3.9.4 Identifikasi antrakinon (Depkes RI, 1995)

Ekstrak kental sebanyak 100 mg dilarutkan dengan 5 mL asam sulfat 2 N, panaskan sebentar kemudian dinginkan. Sebanyak 1 mL larutan percobaan diuapkan di atas penangas air. Residu ditambahkan 1 mL benzen P, dikocok dan didiamkan, kemudian lapisan benzen dipisahkan. Filtrat yang berwarna kuning menunjukkan adanya antrakinon. Lapisan benzen dikocok dengan 1-2 mL natrium

hidroksida 2 N kemudian didiamkan, lapisan benzen yang tidak berwarna dan lapisan air yang berwarna merah intensif menunjukkan adanya antraknon.

#### 3.3.9.5 Identifikasi saponin (Depkes RI, 1980)

Ekstrak kental sebanyak 100 mg ditambahkan 10 mL air panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

#### 3.3.9.6 Identifikasi tanin (Depkes RI, 1980)

Ekstrak kental sebanyak 100 mg dilarutkan dengan air panas lalu dikocok hingga homogen. Larutan didinginkan lalu disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan sebagai larutan percobaan. Larutan percobaan kemudian ditambahkan pereaksi besi (III) klorida 3%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya larutan biru kehitaman atau hijau kehitaman dengan penambahan besi (III) klorida 3%.

Larutan percobaan diberi larutan NaCl 10% kemudian disaring. Filtrat sebanyak 1 mL ditambahkan 3 mL larutan gelatin 10% dan diperhatikan adanya endapan. Ditambahkan 3 mL larutan NaCl-gelatin (larutan gelatin 1% dalam larutan NaCl 10%) dan diperhatikan adanya endapan putih.

#### 3.3.9.7 Identifikasi terpen (Farnsworth, 1966)

Ekstrak kental sebanyak 100 mg ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif ditandai oleh terbentuknya warna merah-hijau atau violet-biru.

### 3.3.10 Isolasi dan Pemurnian Senyawa Aktif

#### 3.3.10.1 Isolasi secara Kromatografi Kolom

Ekstrak yang menunjukkan aktivitas paling baik yaitu ekstrak *n*-butanol selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan adsorben silika gel G-60 (70-230 mesh). Adsorben dibuat bubuk terlebih dahulu kemudian

dimasukkan ke dalam kolom (cara basah) yang berukuran 3,5 cm x 70 cm. Sebanyak 40 g ekstrak *n*-butanol dicampur dengan silika gel sampai homogen kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi secara gradien dengan pelarut *n*-heksana-etil asetat mulai dari perbandingan 100:0, 95:5, 90:10, 85:15 sampai dengan perbandingan 5:95 dan 0:100 kemudian etil asetat-metanol mulai dari perbandingan 100:0, 95:5, 90:10, 85:15 sampai dengan perbandingan 5:95 dan 0:100 dengan laju alir 2 mL/menit. Eluat yang keluar ditampung setiap 100 mL dalam botol berdasarkan warna yang terbentuk dari masing-masing eluat dan diidentifikasi secara KLT.

Fraksi-fraksi yang memberikan profil KLT yang sama dengan pengembang  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (9:1) digabung dan diuapkan pelarutnya hingga diperoleh 7 fraksi. Dilakukan pemeriksaan aktivitas antioksidan terhadap masing-masing fraksi secara kualitatif menggunakan DPPH. Isolat yang langsung diperoleh dari fraksi A yang berasal dari hasil pemisahan menggunakan eluen *n*-heksana-etil asetat 7:3 dan isolat yang langsung diperoleh dari fraksi E yang berasal dari hasil pemisahan menggunakan eluen etil asetat- metanol 9:1 diperiksa aktivitasnya secara kualitatif menggunakan DPPH untuk selanjutnya dimurnikan.

#### 3.3.10.2 Pemurnian senyawa aktif

Kristal isolat 1 yang diperoleh dari fraksi A (ZAB-1) dan serbuk isolat 2 yang diperoleh dari fraksi E (ZAB-2) dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut yang sesuai. ZAB-1 direkristalisasi dengan dua pelarut yaitu dengan pelarut *n*-heksana p.a dan metanol p.a. ZAB-2 dimurnikan dengan cara rekristalisasi satu pelarut yaitu dengan menggunakan pelarut metanol p.a, disaring, kemudian sisa filtrat dipisahkan dari kristal yang terbentuk. Proses rekristalisasi dilanjutkan sampai terbentuk bercak tunggal ketika diperiksa pada KLT. Pemeriksaan kemurnian isolat dilakukan secara fisika dan secara KLT menggunakan berbagai jenis eluen.

#### 3.3.10.3 Pemeriksaan Fisika

Isolat yang diperoleh dikarakterisasi secara organoleptik meliputi wujud, bentuk dan warna, serta dikarakterisasi secara fisika yaitu penentuan jarak lebur

menggunakan Stuart Scientific *melting point apparatus*. Caranya yaitu dengan meletakkan sebutir kristal atau serbuk pada wadah yang ada pada alat tersebut kemudian suhu dinaikkan secara perlahan-lahan, lazimnya tiap menit temperatur dinaikkan 1°C. Jarak lebur adalah rentang suhu pada saat zat padat atau kristal mulai melebur sampai seluruhnya melebur sempurna. Senyawa yang dikatakan murni ditandai dengan jarak lebur yang kecil  $\pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 3.3.10.4 Pemeriksaan secara Kromatografi Lapis Tipis

Pada plat KLT ditotolkan larutan sampel (isolat) menggunakan pipa kapiler kemudian dimasukkan ke dalam bejana yang sudah dijenuhkan dengan pelarut pengembang yang optimum. Bercak diamati secara visual dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm atau menggunakan pereaksi semprot universal asam sulfat 10% yang dilanjutkan dengan pemanasan kemudian ditentukan nilai Rf.

#### 3.3.11 Penentuan Struktur Molekul Senyawa Murni

Terhadap isolat dilakukan identifikasi dan penentuan struktur molekul dengan spektrofotometri UV-Visibel, Infra Merah, GC-MS, spektrofotometri resonansi magnet inti proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) dan karbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ).

##### 3.3.11.1 Pemeriksaan Spektrum Ultra Violet

Pemeriksaan dilakukan dengan alat Spektrofotometer UV-Vis PG Instruments Ltd. yaitu dengan melarutkan 5 mg sampel dalam pelarutnya sampai 5 mL sehingga konsentrasi sampel menjadi  $1000\mu\text{g/mL}$ , kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya secara bersamaan dengan pelarut pada kuvet lain.

##### 3.3.11.2 Pemeriksaan Spektrum Infra Merah

Sejumlah 1 mg sampel digerus dengan 100 mg KBr secara homogen. Campuran dikempa dengan kekuatan  $10\text{ ton/cm}^3$  sehingga terbentuk sebuah pelet yang tipis dan transparan kemudian diukur serapan infra merahnya.

### 3.3.11.3 Pemeriksaan Spektrum Massa dengan GC-MS

Sejumlah 5 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai lalu diambil 1  $\mu\text{L}$  sampel dan disuntikkan pada GC-MS melalui kolom Rtx-5 MS dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Temperatur diprogram pada suhu 50° C – 250° C.

### 3.3.11.4 Pemeriksaan Spektrum Resonansi Magnet Inti

Sebanyak 5 mg ZAB-1 dilarutkan dalam pelarut DMSO dan sebanyak 7 mg ZAB-2 dilarutkan dalam kloroform untuk selanjutnya diukur dengan menggunakan  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  *Homonuclear Correlated Spectroscopy* (H-COSY),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *Heteronuclear Shift Correlation* (CHSHF), dan  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (HMBC).





## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Penyiapan Bahan**

Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah buah segar *Zanthoxylum acanthopodium* DC berwarna hijau sebanyak 13 kg yang diperoleh dari Kabupaten Dairi, Sumatera Utara. Pemilihan buah andaliman berwarna hijau berdasarkan pertimbangan bahwa buah yang paling banyak digunakan sebagai bumbu masakan dalam masyarakat Batak adalah buah yang berwarna hijau. Selain itu, buah yang berwarna hijau adalah buah yang sudah masak namun belum tua sehingga kualitas buah cukup memadai untuk dipanen. Bagian dari tanaman andaliman berupa daun, batang, dan buah yang diperoleh dari desa Namori Kecamatan Sumbul pegagan Kabupaten Dairi, Sumatera Utara dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Pusat Penelitian Biologi, Cibinong (Lampiran 7). Setelah melalui proses sortasi, pengeringan, dan penghalusan, diperoleh 3 kg serbuk simplisia berwarna coklat kehitaman.

Sortasi dan pencucian dengan air dilakukan bertujuan untuk menghilangkan debu, kotoran, dan bahan-bahan asing lainnya yang dapat mengganggu pengujian lebih lanjut. Setelah diangin-anginkan, selanjutnya dilakukan pengeringan dalam lemari pengering untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik dalam bahan simplisia sehingga waktu penyimpanannya bisa menjadi lebih lama. Simplisia yang telah kering kemudian disortasi kembali untuk memisahkan kotoran-kotoran yang masih tertinggal dan ranting-ranting yang ikut terbawa lalu dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk untuk memudahkan penyarian.

#### **4.2 Ekstraksi**

Serbuk buah andaliman dimaserasi secara bertingkat mulai dari pelarut non polar sampai dengan pelarut polar yang bertujuan untuk memperoleh ekstrak dengan rentang kepolaran yang berbeda. Asam-asam lemak dan minyak atsiri yang terdapat di dalam buah dapat dipisahkan dengan pelarut petroleum eter. Maserasi dilakukan hingga diperoleh filtrat yang tidak berwarna lagi kemudian disaring dan dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental petroleum eter. Terhadap

ampas petroleum eter dilakukan maserasi berturut-turut dengan diklorometana, etil asetat, *n*-butanol, dan metanol, kemudian masing-masing pelarut diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan dilanjutkan dengan pemanasan di atas penangas air hingga diperoleh ekstrak kental diklorometana, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-butanol, dan ekstrak metanol. Masing-masing ekstrak kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya terhadap simplisia awal (Tabel 4.1). Diperoleh ekstrak petroleum eter dan ekstrak *n*-butanol dengan rendemen yang lebih besar dibandingkan ekstrak lainnya dan ekstrak metanol sebagai ekstrak dengan rendemen paling kecil.

**Tabel 4.1** Data rendemen ekstrak buah andaliman

No.	Ekstrak	Bobot ekstrak (g)	Bobot simplisia (g)	Rendemen (%)
1.	Petroleum eter	100	3000	3,33
2.	Diklorometana	60		2,00
3.	Etil asetat	50		1,67
4.	<i>n</i> -butanol	65		2,17
5.	Metanol	30		1,00

### 4.3 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak

#### 4.3.1 Uji Aktivitas secara Kualitatif

Terhadap masing-masing ekstrak dilakukan pemeriksaan pada plat KLT dengan pereaksi semprot DPPH 100 ppm untuk melihat aktivitas ekstrak dalam meredam radikal DPPH secara kualitatif. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua ekstrak memiliki kemampuan meredam radikal DPPH karena menghasilkan bercak/zona kuning dengan latar belakang ungu. Intensitas warna yang kuat dihasilkan oleh ekstrak *n*-butanol dan metanol sedangkan intensitas paling lemah dihasilkan oleh ekstrak petroleum eter.

#### 4.3.2 Uji Aktivitas secara Kuantitatif

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif terhadap masing-masing ekstrak buah andaliman dengan metode peredaman radikal DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH menunjukkan serapan maksimum larutan

DPPH terletak pada panjang gelombang 517 nm. Oleh karena itu, semua pengukuran antioksidan dilakukan pada panjang gelombang tersebut. Pengujian dilakukan pada larutan blangko, sampel, kuersetin dan BHT. Pengujian larutan sampel dan standar dilakukan untuk mengetahui kemampuan antioksidan yang diberikan oleh ekstrak dan standar .

Hasil pengujian terhadap sampel, yaitu ekstrak petroleum eter, ekstrak diklorometana, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-butanol, dan ekstrak metanol menunjukkan bahwa ekstrak *n*-butanol dan metanol memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih kecil dibandingkan ekstrak lainnya yaitu dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 53,51 dan 26,39  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak yang mempunyai nilai  $IC_{50}$  antara 50-100  $\mu\text{g/mL}$  adalah ekstrak dengan aktivitas antioksidan menengah dan ekstrak yang mempunyai nilai  $IC_{50}$  antara 10-50  $\mu\text{g/mL}$  adalah ekstrak dengan aktivitas antioksidan yang kuat (Phongpaichit et al., 2007). Berdasarkan rentang tersebut, ekstrak *n*-butanol memiliki aktivitas antioksidan menengah dan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Nilai  $IC_{50}$  setiap ekstrak dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Pada pengujian ini, digunakan dua senyawa standar yaitu kuersetin sebagai antioksidan alami dengan nilai  $IC_{50}$  2,43  $\mu\text{g/mL}$  dan BHT sebagai antioksidan sintetik dengan nilai  $IC_{50}$  5,5  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.3) yang menunjukkan bahwa kedua senyawa standar tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat ( $<10\mu\text{g/mL}$ ).

Meskipun nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol lebih kecil dibandingkan ekstrak *n*-butanol, namun bobot ekstrak *n*-butanol yang diperoleh lebih banyak dibandingkan ekstrak metanol. Pertimbangan ini menjadi alasan pemilihan ekstrak *n*-butanol untuk isolasi selanjutnya.

**Tabel 4.2** Hasil uji antioksidan ekstrak buah andaliman

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		% inhibisi	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Blangko	Sampel		
Ekstrak petroleum eter	200	0,609	0,518 $\pm$ 0,0007	14,92	220,67
	100		0,520 $\pm$ 0,0141	14,61	
	50		0,559 $\pm$ 0,0003	8,19	
	20		0,568 $\pm$ 0,0007	6,83	
	10		0,571 $\pm$ 0,0127	6,29	
Persamaan linier		$y = 0,198(x) + 6,417$			
Ekstrak diklorometana	200	0,609	0,404 $\pm$ 0,0141	33,71	88,26
	100		0,498 $\pm$ 0,0068	18,27	
	50		0,539 $\pm$ 0,0113	11,44	
	20		0,535 $\pm$ 0,0233	12,12	
	10		0,533 $\pm$ 0,0007	12,44	
Persamaan linier		$y = 0,468(x) + 8,707$			
Ekstrak etil asetat	200	0,609	0,427 $\pm$ 0,0007	29,91	83,50
	100		0,497 $\pm$ 0,0004	18,34	
	50		0,553 $\pm$ 0,0007	9,18	
	20		0,573 $\pm$ 0,0002	5,99	
	10		0,598 $\pm$ 0,0007	1,82	
Persamaan linier		$y = 0,573(x) + 2,163$			
Ekstrak <i>n</i> -butanol	200	0,609	0,323 $\pm$ 0,0007	46,97	53,51
	100		0,451 $\pm$ 0,0007	25,89	
	50		0,521 $\pm$ 0,0007	14,43	
	20		0,555 $\pm$ 0,0007	8,95	
	10		0,571 $\pm$ 0,0002	6,27	
Persamaan linier		$y = 0,855(x) + 4,258$			
Ekstrak metanol	100	0,609	0,319 $\pm$ 0,0004	47,66	26,39
	50		0,458 $\pm$ 0,0007	24,87	
	20		0,532 $\pm$ 0,0028	12,71	
	10		0,565 $\pm$ 0,0012	7,27	
Persamaan linier		$y = 1,774(x) + 3,168$			

**Tabel 4.3** Hasil uji antioksidan BHT dan kuersetin

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		% inhibisi	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Blangko	Sampel		
BHT	16		$0,352 \pm 0,0012$	37,09	5,52
	10		$0,410 \pm 0,0001$	26,65	
	4	0,559	$0,474 \pm 0,0001$	15,22	
	2		$0,508 \pm 0,0001$	9,23	
	1		$0,521 \pm 0,0012$	6,87	
Persamaan linier		$y = 8,009(x) + 5,794$			
Kuersetin	16		$0,185 \pm 0,0001$	69,15	2,43
	10		$0,298 \pm 0,0072$	50,33	
	4	0,609	$0,401 \pm 0,0006$	33,17	
	2		$0,464 \pm 0,0001$	22,75	
	1		$0,481 \pm 0,0002$	19,80	
Persamaan linier		$y = 12,855(x) + 18,74$			

#### 4.4 Uji Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase

Pengujian aktivitas penghambatan masing-masing ekstrak buah andaliman terhadap xantin oksidase dilakukan secara *in vitro*. Prinsip dasar pengujian ini adalah mengukur serapan dari asam urat sebagai produk akhir dari reaksi katalisis xantin oksidase terhadap substratnya yaitu xantin (Umamaheswari, Asokkumar, Sivashanmugam, dan Remyaraju, 2009) menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang hasil optimasi, suhu optimum, pH optimum dan konsentrasi substrat yang optimum.

Panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran selanjutnya terdapat pada panjang gelombang 284 nm. Dari hasil pengukuran, kondisi optimum ditunjukkan pada suhu 30°C dan pH 7,8 dimana serapan dan nilai aktivitas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan suhu dan pH lainnya (Tabel 4.4 dan 4.5 ). Konsentrasi substrat yang digunakan pada uji penghambatan aktivitas xantin oksidase adalah 0,15 mM. Hasil optimasi konsentrasi substrat dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.1

**Tabel 4.4** Hasil penentuan suhu optimum xantin oksidase

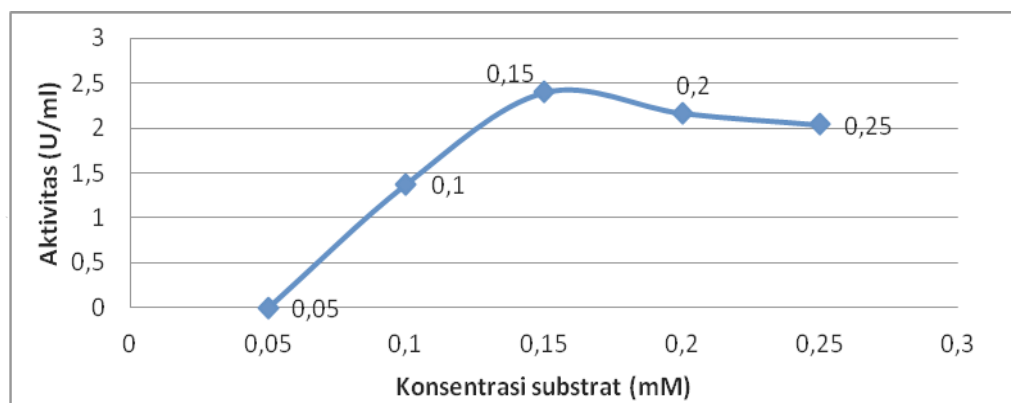
Suhu	Absorbansi			Aktivitas enzim (unit/mL)
	Blangko (B)	Kontrol blangko (KB)	B-KB	
20°C	0,340 ± 0,0007	0,099	0,241	0,98
25°C	0,490 ± 0,0247	0,099	0,391	1,97
30°C	0,556 ± 0,0014	0,099	0,457	2,25
35°C	0,222 ± 0,0021	0,075	0,147	0,72
40°C	0,200 ± 0,0035	0,071	0,129	0,63

**Tabel 4.5** Hasil penentuan pH optimum xantin oksidase

pH	Absorbansi			Aktivitas enzim (unit/mL)
	Blangko (B)	Kontrol blangko (KB)	B-KB	
7,5	0,555 ± 0,0042	0,099	0,456	2,24
7,8	0,605 ± 0,0035	0,101	0,504	2,47
8,0	0,320 ± 0,0014	0,094	0,226	1,11
8,3	0,272 ± 0,0049	0,085	0,187	0,92
8,5	0,211 ± 0,0028	0,074	0,13	0,67

**Tabel 4.6** Hasil penentuan konsentrasi optimum substrat

Konsentrasi xantin	Absorbansi			Aktivitas enzim (unit/mL)
	Blangko (B)	Kontrol blangko (KB)	B-KB	
0,05	0,188 ± 0,0063	0,034	0,154	0,76
0,1	0,383 ± 0,0042	0,098	0,285	1,40
0,15	0,637 ± 0,0021	0,113	0,524	2,58
0,2	0,583 ± 0,0056	0,150	0,433	2,13
0,25	0,620 ± 0,0007	0,202	0,418	2,06



**Gambar 4.1** Aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat

Peningkatan aktivitas enzim terjadi pada peningkatan konsentrasi substrat 0,05 mM sampai 0,15 mM, dengan aktivitas enzim berturut-turut 0,76 Unit/mL; 1,40 Unit/mL; dan 2,58 Unit/mL, kemudian aktivitas enzim menurun pada konsentrasi substrat 0,2 mM dan 0,25 mM dengan aktivitas enzim berturut-turut 2,13 Unit/mL dan 2,06 Unit/mL. Penurunan aktivitas ini dapat terjadi karena adanya penghambatan aktivitas enzim oleh produk sehingga akan bersaing dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim (Bisswanger, 2008). Produk tersebut adalah asam urat yang memiliki kemiripan struktur dengan substrat xantin, sehingga dapat berperan sebagai inhibitor.

Pengujian dilakukan pada larutan blangko, kontrol blangko, sampel, kontrol sampel, alopurinol, dan kontrol alopurinol. Pengujian larutan blangko dan kontrol blangko dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa penambahan ekstrak, pengujian larutan sampel dan alopurinol sebagai standar dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim yang diberikan oleh ekstrak dan senyawa standar, sedangkan kontrol sampel dan kontrol alopurinol dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel dan senyawa standar.

Pengujian aktivitas penghambatan ekstrak terhadap xantin oksidase dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi bertujuan untuk melihat pengaruh penambahan konsentrasi ekstrak terhadap peningkatan daya hambat. Ekstrak yang tidak dapat larut dengan air bebas karbondioksida P dilarutkan terlebih dahulu dengan 5 tetes DMSO (dimetil sulfoksida). Penggunaan DMSO sebaiknya hanya 5% dari konsentrasi akhir yang diharapkan tidak mempengaruhi

pengujian dengan menggunakan enzim (Umamaheswari, Asokkumar, Sivashanmugam, dan Remyaraju, 2009).

Sebagai standar digunakan senyawa alopurinol. Hasil pengujian menunjukkan bahwa alopurinol memiliki efek penghambatan aktivitas xantin oksidase dengan nilai  $IC_{50}$  0,02  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil uji penghambatan aktivitas alopurinol dapat dilihat pada Tabel 4.7.

**Tabel 4.7** Hasil uji penghambatan xantin oksidase oleh alopurinol

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		% inhibisi	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Sampel	Kontrol sampel		
Alopurinol	0,1	$0,333 \pm 0,0028$	0,024	45,11	0,02
	0,25	$0,275 \pm 0,0353$	0,024	55,42	
	0,5	$0,171 \pm 0,0042$	0,028	74,6	
	1	$0,104 \pm 0,0014$	0,034	87,56	
Persamaan linier		$y = 43,87 + 334 (x)$			
Blangko	0,660	Kontrol blangko	0,097		

Hasil pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase oleh masing-masing ekstrak menunjukkan ekstrak *n*-butanol memiliki nilai  $IC_{50}$  lebih kecil dibandingkan ekstrak lainnya yaitu 3,69  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.5) sedangkan senyawa standar alopurinol memiliki kemampuan penghambatan enzim yang sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$  0,02  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.8). Diduga ekstrak buah andaliman ini mengandung senyawa yang memiliki aktivitas penghambat xantin oksidase. Karena aktivitas ekstrak *n*-butanol lebih kuat dibandingkan ekstrak lainnya, maka dipilih ekstrak *n*-butanol untuk diisolasi lebih lanjut.



**Tabel 4.8** Hasil uji penghambatan xantin oksidase oleh ekstrak buah andaliman

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		% inhibisi	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Sampel	Kontrol sampel		
Ekstrak petroleum eter	1	0,475 $\pm$ 0,0410	0,097	31,1	9,9
	5	0,422 $\pm$ 0,0205	0,081	37,8	
	10	0,345 $\pm$ 0,0064	0,091	53,6	
	20	0,323 $\pm$ 0,0042	0,088	57,1	
	50	0,379 $\pm$ 0,0057	0,097	48,5	
	100	0,382 $\pm$ 0,0035	0,107	49,9	
Persamaan linier		y = 1,26 (x) + 45,07			
Ekstrak diklorometana	1	0,381 $\pm$ 0,0035	0,092	47,3	3,9
	5	0,352 $\pm$ 0,0169	0,114	56,6	
	10	0,347 $\pm$ 0,0269	0,095	54,0	
	20	0,500 $\pm$ 0,0092	0,104	27,7	
	50	0,418 $\pm$ 0,0064	0,147	50,6	
	100	0,408 $\pm$ 0,0064	0,231	67,8	
Persamaan linier		y = -1,26 (x) + 45,07			
Ekstrak etil asetat	1	0,364 $\pm$ 0,0332	0,088	49,7	9,54
	5	0,337 $\pm$ 0,0262	0,08	53,1	
	10	0,470 $\pm$ 0,0099	0,098	32,1	
	20	0,390 $\pm$ 0,0170	0,077	42,9	
	50	0,395 $\pm$ 0,0106	0,106	47,3	
	100	0,397 $\pm$ 0,0035	0,150	55,0	
Persamaan linier		y = 0,65 (x) + 43,797			
Ekstrak n- butanol	1	0,405 $\pm$ 0,0028	0,073	39,5	3,69
	5	0,395 $\pm$ 0,0113	0,073	41,3	
	10	0,371 $\pm$ 0,0120	0,077	46,4	
	20	0,378 $\pm$ 0,0113	0,084	46,4	
	50	0,270 $\pm$ 0,0035	0,087	66,4	
	100	0,291 $\pm$ 0,0057	0,126	69,9	
Persamaan linier		y = 2,26 (x) + 41,65			
Ekstrak metanol	1	0,394 $\pm$ 0,0014	0,074	41,6	4,03
	5	0,353 $\pm$ 0,0113	0,083	50,7	
	10	0,358 $\pm$ 0,0078	0,082	49,6	
	20	0,371 $\pm$ 0,0064	0,09	48,7	
	50	0,355 $\pm$ 0,0007	0,107	54,7	
	100	0,392 $\pm$ 0,0247	0,154	56,6	
Persamaan linier		y = 0,77 (x) + 46,90			
Blangko	0,647	Kontrol blangko	0,099		

#### 4.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap ekstrak *n*-butanol sebagai ekstrak yang dipilih untuk isolasi selanjutnya. Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa berdasarkan golongannya sebagai informasi awal kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak aktif. Penapisan dilakukan menggunakan kontrol positif berupa simplisia yang telah diketahui mengandung golongan senyawa yang dimaksud. Kontrol positif tersebut antara lain *Chinchonae Cortex* untuk kontrol positif golongan senyawa alkaloid, *Rhei Radix* untuk golongan senyawa antrakuinon, daun katuk untuk golongan senyawa flavonoid dan terpen/sterol, *Theae Folium* untuk golongan senyawa tanin, dan *Liquiritiae Radix* untuk golongan senyawa saponin dan glikosida. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak *n*-butanol mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, glikosida, tanin, antrakuinon, dan terpenoid kecuali saponin dan tanin (Tabel 4.9). Diduga bahwa komponen yang aktif dari ekstrak *n*-butanol berasal dari golongan senyawa tersebut.

**Tabel 4.9** Hasil penapisan fitokimia ekstrak *n*-butanol buah andaliman

No.	Golongan kimia	Hasil pengamatan
1.	Alkaloid	+
2.	Flavonoid	+
3.	Glikosida	+
4.	Antrakuinon	+
5.	Terpenoid	+
6.	Saponin	-
7.	Tanin	-

#### 4.6 Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Dari hasil kromatografi kolom ekstrak *n*-butanol, tiap fraksi yang diperoleh dianalisis secara KLT dengan fase gerak diklorometana-metanol 9:1. Fraksi-fraksi dengan pola kromatografi yang sama digabung kemudian pelarut diuapkan. Diperoleh 7 fraksi gabungan dan ditimbang (Tabel 4.10) kemudian diperiksa secara kualitatif menggunakan DPPH, semua fraksi menghasilkan bercak kuning dengan latar belakang ungu yang berarti semua fraksi memiliki aktivitas antioksidan.

**Tabel 4.10** Bobot fraksi hasil kromatografi kolom ekstrak *n*-butanol buah andaliman

Nomor fraksi	Bobot fraksi (g)
A	2,5775
B	1,3109
C	1,1743
D	0,8385
E	0,7900
F	2,2470
G	2,4888

Isolat 1 yang langsung diperoleh dari fraksi A, hasil pemisahan dengan menggunakan eluen *n*-heksana-etil asetat 7:3, dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut *n*-heksana dan metanol hingga diperoleh isolat murni sebanyak 20 mg dan selanjutnya diberi nama ZAB-1. Isolat 2 yang diperoleh dari fraksi E (eluen etil asetat-metanol 9:1) kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut metanol hingga diperoleh isolat murni dengan bobot total sebesar 35,8 mg dan selanjutnya diberi nama ZAB-2.

Kemurnian isolat diperiksa secara KLT dengan berbagai fase gerak. Semua kromatogram isolat menunjukkan adanya bercak tunggal, dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ZAB-1 dan ZAB-2 tersebut murni. Hasil KLT menggunakan fase gerak diklorometana-metanol 7:3 memperlihatkan bahwa ZAB-1 memiliki  $R_f$  0,75 (Gambar 4.14) dan hasil KLT dengan fase gerak diklorometana-metanol 1:1 menunjukkan ZAB-2 memiliki  $R_f$  0,68 (Gambar 4.15). Kedua senyawa isolat tersebut juga diduga memiliki aktivitas antikoksidan berdasarkan hasil pemeriksaan pada plat KLT dengan pereaksi semprot DPPH (Gambar 4.13).

Analisis selanjutnya dilakukan pengukuran titik leleh. Pengamatan menunjukkan bahwa ZAB-1 yang berbentuk kristal berwarna putih meleleh pada suhu 128-130 °C dan ZAB-2 yang berbentuk serbuk berwarna putih memiliki titik leleh 273-275 °C.

## 4.7 Penentuan Struktur Isolat

Struktur senyawa isolat dianalisis dengan menggunakan spektroskopi infra merah (IR), GC-MS, NMR 1 dimensi ( $^1\text{H}$ -NMR dan  $^{13}\text{C}$ -NMR), NMR 2 dimensi meliputi DEPT,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CHSHF,  $^1\text{H}$  dan  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

### 4.7.1 Senyawa ZAB-1

Senyawa ZAB-1 berbentuk kristal berwarna putih dengan titik leleh 128-130 °C, memiliki Rf 0,75 pada KLT dengan fase gerak diklorometana-metanol 7:3. Analisis spektrum UV-Vis senyawa ZAB-1 memberikan serapan maksimum pada 209, 282, dan 390 nm. Adanya tiga buah serapan maksimum tersebut menunjukkan bahwa senyawa ZAB-1 memiliki gugus kromofor.

Data IR pada Gambar 4.18 memberikan pita serapan yang tajam dengan intensitas yang kuat pada bilangan gelombang  $3649,44\text{ cm}^{-1}$  dan agak melebar dengan intensitas sedang pada daerah bilangan gelombang  $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan bahwa senyawa ZAB-1 memiliki gugus OH bebas dan gugus OH terikat. Adanya pita serapan pada bilangan gelombang  $2933,83\text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas medium menunjukkan adanya gugus  $-\text{CH}_2$  yang diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang  $1456,30\text{ cm}^{-1}$ . Senyawa ZAB-1 juga memperlihatkan serapan pada bilangan gelombang  $1541,18$  dan  $1558,54\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya C=C aromatis dan pita serapan pada daerah bilangan gelombang  $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan eter.

Data  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) dari senyawa ZAB-1 menunjukkan terdapat dua singlet pada  $\delta_{\text{H}}$  0,68 dan 1,01; yang diduga merupakan gugus metil pada C-32 dan C-19 (Lampiran 8). Doblet pada pergeseran kimia 0,82 dan 0,96 ppm dihubungkan dengan adanya gugus metil pada C-35 dan C-33. Gugus metil lainnya ditunjukkan pada pergeseran kimia 0,85 dan 0,81 ppm pada C-21 dan C-18. Sementara itu proton aromatis ditunjukkan oleh adanya sinyal dobles pada  $\delta_{\text{H}}$  6,79 (1H, *d*,  $J = 1,6\text{ Hz}$ ) yang terkopling *orto* dengan sinyal singlet pada  $\delta_{\text{H}}$  6,81 pada posisi C-1 dan C-2. Sinyal singlet menunjukkan bahwa di sebelah sinyal proton tersebut atom karbonnya tidak memiliki proton dan ini diperkuat dengan adanya atom C kuartener pada posisi C-3. Sinyal dobles menunjukkan adanya atom karbon tetangga yang memiliki 1 atom proton. Data spektrum

$^{13}\text{C}$ -NMR (Lampiran 9) menunjukkan senyawa ZAB-1 memiliki 35 atom karbon yang terdiri dari 6 atom karbon metil ( $\text{CH}_3$ ), 9 atom karbon metilen ( $\text{CH}_2$ ), 15 atom metin ( $\text{CH}$ ), dan 5 atom C kuarternar dari hasil pengukuran DEPT (Lampiran 10). Data pergeseran kimia proton dan karbon senyawa ZAB-1 dapat dilihat pada Tabel 4.11.

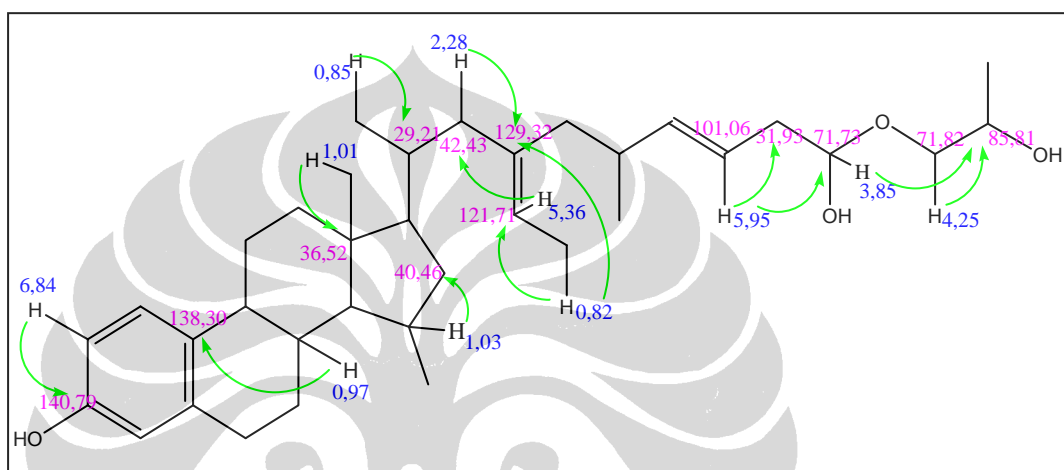
**Tabel 4.11** Data pergeseran kimia proton dan karbon senyawa ZAB-1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

No	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	No	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	119,33 (=CH)	6,79	19	19,05 ( $\text{CH}_3$ )	1,01 (s)
2	106,49 (=CH)	6,81	20	29,21 (CH)	1,71
3	140,79 (=C-OH)	-	21	19,81 ( $\text{CH}_3$ )	0,85
4	108,19 (=CH)	6,79	22	42,34 ( $\text{CH}_2$ )	2,28 & 2,27
5	135,11 (C)	-	23	129,32 (C)	-
6	26,15 ( $\text{CH}_2$ )	1,18 & 1,97	24	37,28 ( $\text{CH}_2$ )	1,04 & 1,87
7	24,31 ( $\text{CH}_2$ )	1,56 & 1,59	25	36,15 (CH)	1,35
8	51,25 (CH)	0,97	26	101,06 (=CH)	5,95
9	45,89 (CH)	0,95	27	101,06 (=CH)	5,95
10	138,30 (C)	-	28	31,93 ( $\text{CH}_2$ )	1,44 & 1,9
11	21,10 ( $\text{CH}_2$ )	1,04 & 1,51	29	71,73 (CH-OH)	3,85
12	31,70 ( $\text{CH}_2$ )	1,55 & 1,86	30	71,82 ( $\text{CH}_2$ )	4,25 & 3,56
13	36,52 (C)	-	31	85,80 ( $\text{CH}_2$ -OH)	4,72 & 4,71
14	54,36 (CH)	3,06	32	12,05 ( $\text{CH}_3$ )	0,68 (s)
15	56,89 (CH)	1,03	33	18,79 ( $\text{CH}_3$ )	0,95
16	40,46 ( $\text{CH}_2$ )	1,15 & 2,02	34	121,71 (=CH)	5,36
17	56,79 (CH)	1,12	35	12,23 ( $\text{CH}_3$ )	0,82
18	18,99 ( $\text{CH}_3$ )	0,81 (s)			

Hasil pengukuran  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -COSY (CHSHF) senyawa ZAB-1 memperlihatkan adanya korelasi langsung antara proton pada  $\delta_H$  4,25 dengan karbon pada  $\delta_c$  71,82 ppm,  $\delta_H$  3,8 dengan  $\delta_c$  71,73 ppm,  $\delta_H$  4,720 dengan  $\delta_c$  85,80 ppm,  $\delta_H$  5,36 dengan  $\delta_c$  121,71 ppm, dan  $\delta_H$  5,95 dengan  $\delta_c$  101,06 ppm. Korelasi antara proton dan karbon lainnya ditunjukkan di Lampiran 7. Hasil analisa  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY menunjukkan korelasi antara proton-proton yang berdekatan yakni antara  $\delta_H$  0,96 dengan  $\delta_H$  1,35 ppm,  $\delta_H$  4,25 dengan  $\delta_H$  3,85 ppm,  $\delta_H$  0,85 dengan  $\delta_H$  1,71 ppm,  $\delta_H$  1,15 dan 1,01 dengan  $\delta_H$  2,02 ppm (Lampiran 12).

Data spektrum HMBC dari senyawa ZAB-1 (Lampiran 13) menunjukkan korelasi tidak langsung antara proton dan karbon yang ada di dekatnya yakni

antara proton pada  $\delta_H$  6,84 dengan karbon pada  $\delta_C$  140,79 ppm,  $\delta_H$  0,97 dengan karbon pada  $\delta_C$  138,3 ppm,  $\delta_H$  0,85 dengan karbon pada  $\delta_C$  29,21 ppm,  $\delta_H$  2,28 pada  $\delta_C$  129,32 ppm,  $\delta_H$  0,82 dengan karbon pada  $\delta_C$  121,71 dan 129,32 ppm,  $\delta_H$  1,01 dengan  $\delta_C$  36,52,  $\delta_H$  1,03 dengan  $\delta_C$  40,46,  $\delta_H$  5,36 dengan karbon pada  $\delta_C$  42,43 ppm,  $\delta_H$  4,25 dan 3,85 dengan karbon pada  $\delta_C$  85,80 ppm, serta  $\delta_H$  5,95 dengan karbon pada  $\delta_C$  31,93 dan 71,73 ppm. Korelasi HMBC senyawa ZAB-1 dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2** Analisis HMBC senyawa ZAB-1

Fragmentasi yang diduga terjadi karena pemutusan rantai samping yang terikat dengan rantai siklik menghasilkan ion dengan  $m/z$  269. Pemutusan rantai metil pada rantai samping selanjutnya serta pemutusan rantai metil pada sistem cincin steroid menghasilkan ion dengan  $m/z$  255. Fragmentasi tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.2. Fragmentasi yang menghasilkan ion  $m/z$  160 diduga terjadi karena pemutusan cincin aromatik A dan cincin B dari molekul. Prediksi fragmentasi lainnya adalah dari pemutusan rantai samping yang mengandung ikatan eter dan hidroksil dari sistem cincin sterol dengan menghasilkan ion  $m/z$  145. Fragmentasi yang menghasilkan ion  $m/z$  92 diduga berasal dari pemutusan fenol. Analisis fragmentasi ZAB-1 dapat dilihat pada Gambar 4.3

Dari hasil analisa  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , DEPT dan spektrum massa dari senyawa ZAB-1 yang memberikan puncak pada  $m/z$  536 yang diduga merupakan bobot molekul, diperkirakan senyawa ZAB-1 memiliki rumus molekul  $\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_4$ .

Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa dapat dihitung dengan rumus *double bond equivalent* sebagai berikut:

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

Dimana :

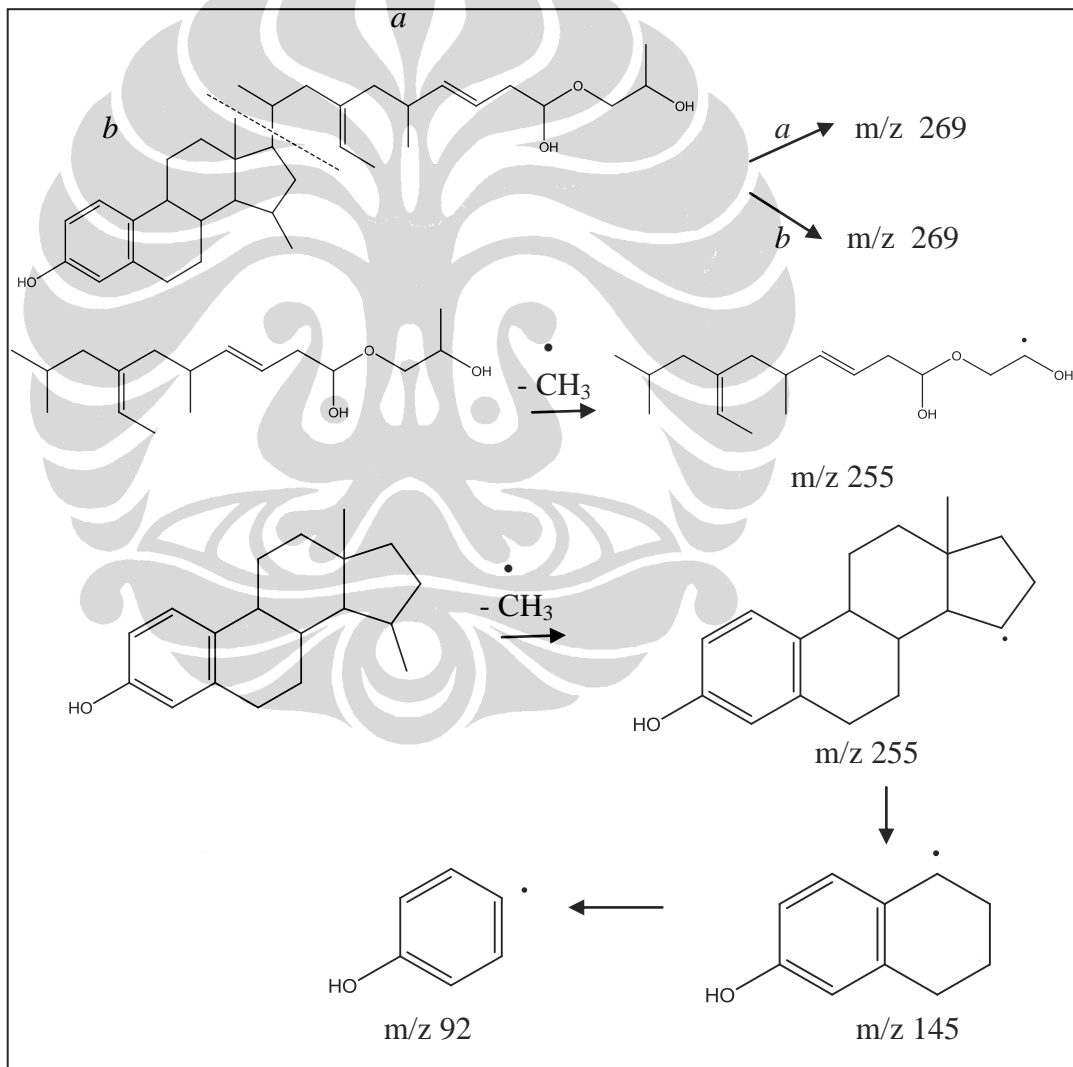
F = jumlah cincin dan atau ikatan rangkap

X = jumlah atom C atau tetravalen

Y = jumlah atom H, halogen, atau atom monovalen

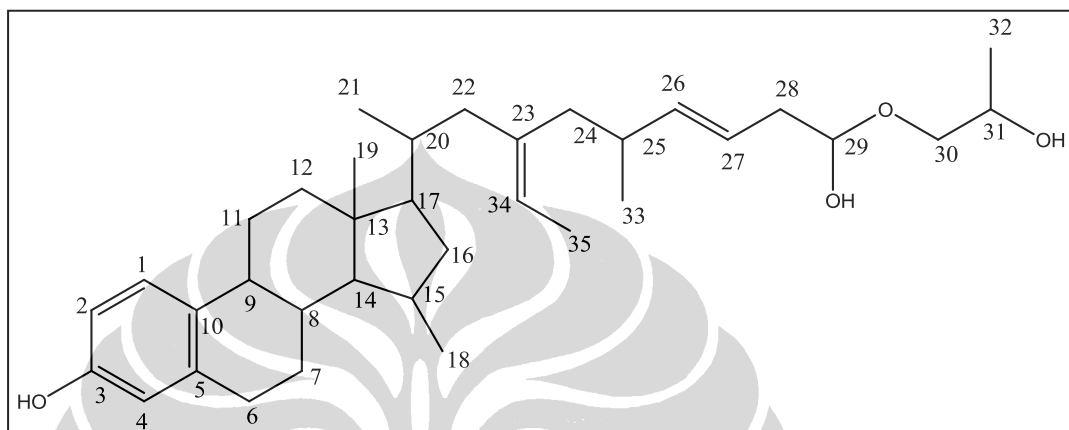
Z = jumlah atom N,P, atau atom trivalen

Dari perhitungan tersebut diperoleh nilai F adalah 9 dan dapat disimpulkan bahwa senyawa ZAB-1 memiliki 1 cincin aromatik, 3 cincin siklik dan 2 ikatan rangkap.



**Gambar 4.3** Analisis fragmentasi senyawa ZAB-1

Dengan adanya beberapa gugus hidroksil yang dimiliki, ZAB-1 merupakan senyawa hidroksi eter sterol dengan cincin aromatik dan dapat digolongkan ke dalam senyawa terpenoid polar dengan nama senyawa 17-((23E,26E)-23-etiliden-29-hidroksi-29-(2-hidroksipropoksi)-25-metildek-26-en-20-il)-13,15-dimetil-gona-1,3,5(10)-trien-3-ol.



**Gambar 4.4** Struktur molekul senyawa ZAB-1

Molekul sterol terdiri dari tiga bagian yakni ekor hidrokarbon, 4 cincin hidrokarbon, dan gugus hidroksil. Karena sterol terdiri dari bagian larut air dan bagian yang larut lemak, senyawa ini juga disebut amfipatik (Kemal, 2006). Itulah sebabnya senyawa ZAB-1 yang cenderung bersifat non polar dapat ikut terekstraksi dengan pelarut *n*-butanol yang polar.

Isolasi senyawa sterol dengan cincin aromatik A telah dilaporkan umumnya dari bahan alam laut antara lain senyawa geodisterol, sebuah senyawa sterol polioksigenasi dengan cincin aromatik A, berhasil diisolasi dari spons genus *Geodia* (Wang & Crew, 1996) dan senyawa 19-nor-steroid dari spons *Sollasella moretonensis* (Lu, Wagoner, Harper, Hooper, dan Ireland, 2010).

#### 4.7.2 Senyawa ZAB-2

Senyawa ZAB-2 berupa serbuk berwarna putih, memiliki titik leleh 273-275 °C. Hasil KLT dengan eluen diklorometana-metanol 1:1, menunjukkan ZAB-2 memiliki Rf 0,68. Analisis spektrum UV-Vis senyawa ZAB-2 memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 206 nm. Adanya



serapan pada daerah UV menunjukkan bahwa senyawa ZAB-2 memiliki ikatan rangkap.

Data IR (Gambar 4.19) memberikan pita serapan melebar dengan intensitas sedang pada daerah bilangan gelombang  $3402,54\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya vibrasi ulur (*stretching*) dari gugus OH ( $3200\text{-}3550\text{ cm}^{-1}$ ). Diduga senyawa ZAB-2 memiliki gugus OH terikat karena memberikan serapan dengan frekuensi yang rendah dan lebar. Hal ini diperkuat oleh adanya serapan pada daerah bilangan gelombang  $1022,31\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya vibrasi regang C-OH siklik ( $1000\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ ). Adanya pita tajam dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang  $2931,90\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur dari  $\text{CH}_3$  dan pita serapan pada bilangan gelombang  $2870,17\text{ cm}^{-1}$  merupakan vibrasi ulur dari  $\text{CH}_2$  (alkana,  $2850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ). Hal ini diperkuat dengan adanya serapan pada daerah bilangan gelombang  $1456,30$  yang menunjukkan adanya tekukan C-H dari  $\text{CH}_2$  ( $1450\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$ ). Jika suatu senyawa mempunyai banyak ikatan C-H, maka efek gabungan dari absorpsi C-H ini akan menghasilkan suatu puncak yang bersifat medium atau bahkan kuat pada daerah  $2700\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  (Supratman, 2010). Interpretasi data IR memberikan gambaran bahwa senyawa isolat ZAB-2 merupakan senyawa siklik yang mengandung gugus OH dan memiliki banyak alkil.

Data  $^1\text{H-NMR}$  dari senyawa ZAB-2 (400 MHz, DMSO) dapat dilihat pada Lampiran 10, 11, 12, dan 13. Spektrum resonansi magnetik inti proton senyawa ini menunjukkan adanya tiga singlet pada pergeseran kimia 0,65; 0,79; 0,96 ppm yang diduga merupakan metil pada C-18, C-21, dan C-19. Doublet pada  $\delta_{\text{H}}$  0,81; 0,82 ( $J = 6,8$ ) dan  $\delta_{\text{H}}$  0,89; 0,911 ( $J = 6,4$ ) menghasilkan metil pada C-26 dan C-27. Adanya sinyal proton pada  $\delta_{\text{H}}$  2,90; 3,05; 3,15; 3,50; 3,41; 3,63; dan 4,21 menunjukkan dugaan adanya proton molekul gula.

Analisis spektrum resonansi  $^{13}\text{C-NMR}$  menyatakan bahwa senyawa ZAB-2 memiliki 33 atom karbon (Lampiran 18). Spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  menunjukkan adanya 4 atom karbon penyusun gula ( $\delta_{\text{C}}$  70,08; 73,43; 76,74; 76,90) dan 1 atom karbon anomer pada  $\delta_{\text{C}}$  100,77 serta dua atom karbon penyusun grup diena ( $\delta_{\text{C}}$  140,42 dan 121,13). Hasil analisis DEPT (Lampiran 19) menunjukkan atom-atom karbon senyawa ZAB-2 terdiri dari lima karbon metil

(CH<sub>3</sub>) yaitu pada  $\delta_c$  11,6; 18,57; 18,89; 19,03; dan 19,65; dua belas karbon metilen (CH<sub>2</sub>) tiga belas karbon metin (CH) dan tiga karbon kuartener pada  $\delta_c$  36,18; 41,8, dan 140,42. Data pergeseran kimia proton dan karbon senyawa ZAB-2 dapat dilihat pada Tabel 4.12.

**Tabel 4.12** Data pergeseran kimia proton dan karbon senyawa ZAB-2 (400 MHz, DMSO)

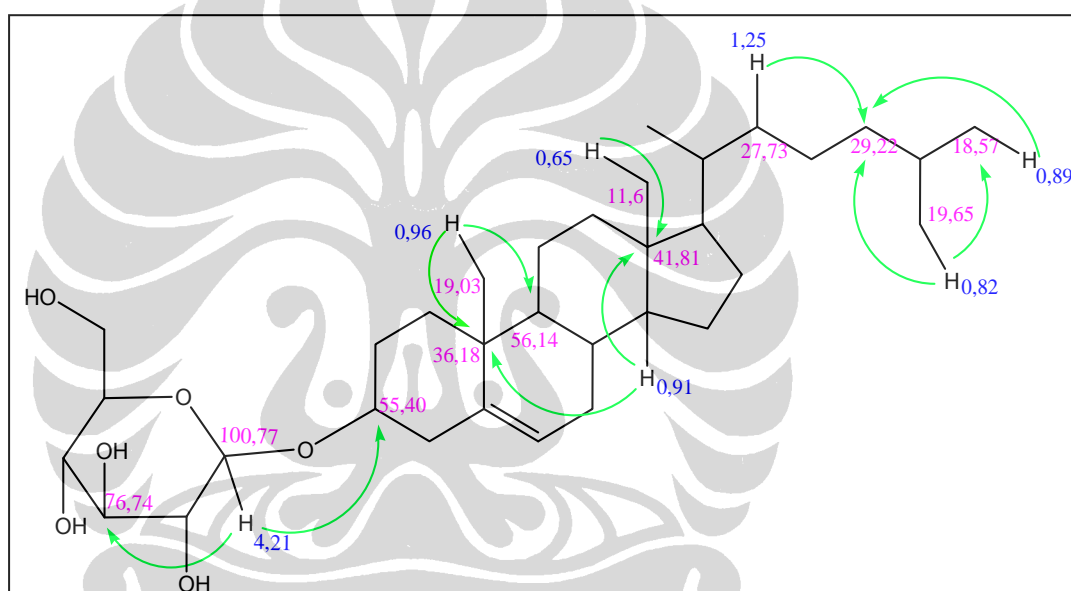
No	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	No	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	33,32 (CH <sub>2</sub> )	1,03 & 1,31	18	11,62 (CH <sub>3</sub> )	0,65 ( <i>s</i> )
2	22,58 (CH <sub>2</sub> )	1,21 & 1,28	19	19,03 (CH <sub>3</sub> )	0,96 ( <i>s</i> )
3	55,40 (CH)	1,08	20	31,88 (CH)	1,39
4	38,87 (CH <sub>2</sub> )	2,16 & 2,38	21	18,89 (CH <sub>3</sub> )	0,79 ( <i>s</i> )
5	140,42 (C)	-	22	27,73 (CH <sub>2</sub> )	1,25
6	121,13 (C)	-	23	29,22 (CH <sub>2</sub> )	1,524 & 1,81
7	38,27 (CH <sub>2</sub> )	1,78 & 2,08	24	36,78 (CH <sub>2</sub> )	0,99 & 1,81
8	28,69 (CH)	1,64	25	35,43 (CH)	1,36
9	56,135 (CH)	1,01	26	19,65 (CH <sub>3</sub> )	0,82 ( <i>d</i> )
10	36,18 (C)	-	27	18,57 (CH <sub>3</sub> )	0,89 ( <i>d</i> )
11	23,81 (CH <sub>2</sub> )	1,08 & 1,52	1'	100,77 (CH-O-R)	4,21 ( <i>d</i> , <i>J</i> =7,9)
12	25,45 (CH <sub>2</sub> )	1,16 & 1,14	2'	73,43 (CH-OH)	2,90
13	41,81 (C)	-	3'	76,74 (CH-OH)	3,15
14	49,57 (CH)	0,91	4'	70,08 (CH-OH)	3,05
15	20,55 (CH <sub>2</sub> )	1,50 & 1,92	5'	76,90 (CH-OH)	3,50
16	31,32 (CH <sub>2</sub> )	1,53 & 0,84	6'	61,07 (CH <sub>2</sub> -OH)	3,63 & 3,41
17	45,12 (CH)	0,94			

Data spektrum CH-COSY (CHSHF) senyawa ZAB-2 memperlihatkan adanya korelasi langsung antara proton dengan karbon antara lain proton dari metil pada pergeseran kimia 0,96 dengan karbon pada pergeseran kimia 19,03 ppm,  $\delta_H$  0,65 dengan  $\delta_c$  11,6 ppm,  $\delta_H$  0,79 dengan  $\delta_c$  18,89 ppm, serta proton-proton dalam molekul glukosa yakni pada  $\delta_H$  4,22 dengan  $\delta_c$  100,77 ppm,  $\delta_H$  3,41 dan 3,63 dengan  $\delta_c$  61,07 ppm,  $\delta_H$  3,5 dengan  $\delta_c$  76,90 ppm,  $\delta_H$  3,05 dengan  $\delta_c$  70,08 ppm,  $\delta_H$  3,15 dengan  $\delta_c$  76,74 ppm,  $\delta_H$  2,90 dengan  $\delta_c$  73,43 ppm. Korelasi antara proton dan karbon lainnya ditunjukkan oleh Lampiran 16.

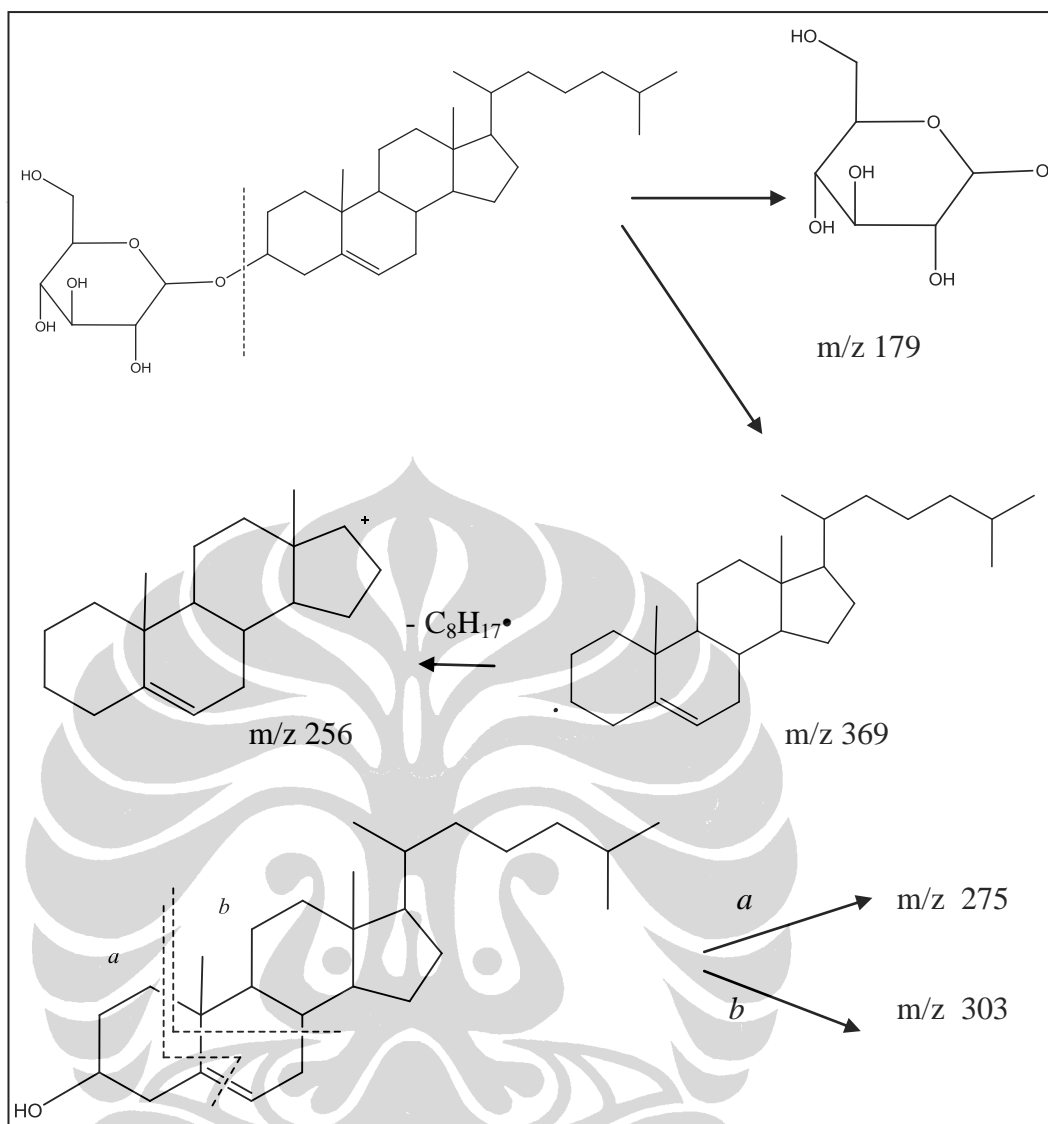
Hasil analisa <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY (Lampiran 21) menunjukkan korelasi antara proton-proton yang berdekatan yakni antara proton pada  $\delta_H$  4,21 dengan

$\delta_H$  2,16 ppm,  $\delta_H$  5,33 dengan  $\delta_H$  2,16 dan 1,92 ppm,  $\delta_H$  1,53 dengan  $\delta_H$  1,14 ppm,  $\delta_H$  1,81 dengan  $\delta_H$  1,25 ppm.

Data spektrum HMBC dari senyawa ZAB-2 (Lampiran 22) menunjukkan korelasi tidak langsung antara proton dan karbon yang ada di dekatnya yakni antara proton anomerik pada  $\delta_H$  4,21 dengan karbon molekul glukosa pada  $\delta_C$  76,74 dan karbon molekul sterol pada  $\delta_C$  55,40 ppm. Korelasi lainnya adalah antara proton pada  $\delta_H$  0,96 dengan karbon pada  $\delta_C$  36,18 dan 56,14 ppm,  $\delta_H$  0,65 dan 0,91 dengan karbon pada  $\delta_C$  41,81 ppm, proton pada  $\delta_H$  1,25; 0,89 serta 0,82 dengan karbon pada  $\delta_C$  29,22 ppm, dan proton pada  $\delta_H$  0,82 dengan karbon pada  $\delta_C$  18,57 ppm. Korelasi HMBC senyawa ZAB-2 dapat dilihat pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.5** Analisis HMBC senyawa ZAB-2

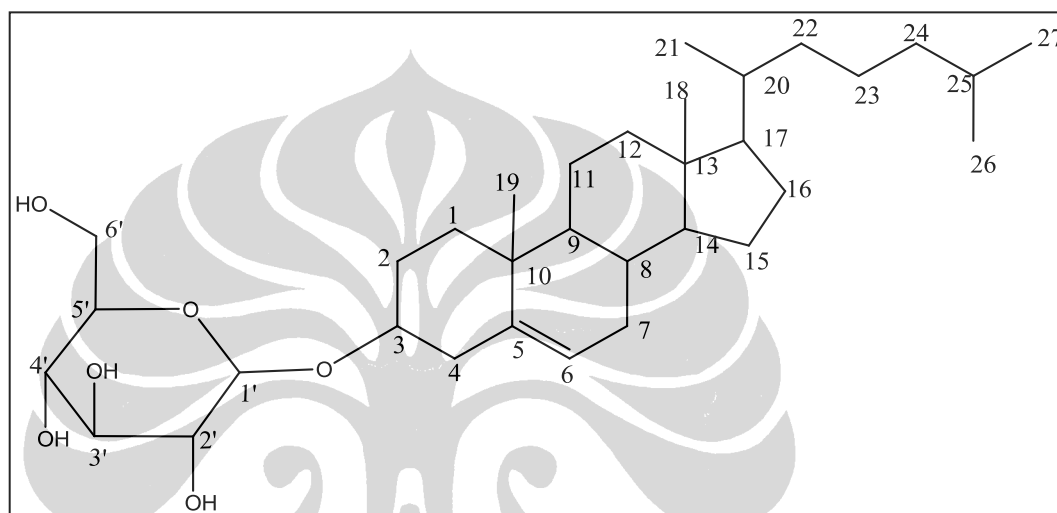


**Gambar 4.6** Fragmentasi senyawa ZAB-2

Spektrum massa dari ZAB-2 dapat dilihat pada Gambar 4.21. Data GC-MS memperlihatkan puncak ion molekul pada  $m/z$  548. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa ZAB-2 memiliki bobot molekul sebesar 548. Dugaan fragmentasi yang terjadi pada ikatan eter menghasilkan ion dengan  $m/z$  179 dan  $m/z$  369. Dugaan fragmentasi selanjutnya pada rantai samping menghasilkan ion dengan  $m/z$  256. Dua fragmentasi yang diprediksi melibatkan pemecahan cincin A dan cincin B pada rangka steroid menghasilkan ion dengan  $m/z$  303 dan 275 (Gambar 4.6).

Senyawa ZAB-2 memiliki 33 atom C dan 6 atom O (milik gula), maka jumlah atom H dapat dihitung yaitu  $\{548 - 33(12) - 6(16)\}/1 = 56$ . Dengan

demikian rumus molekul senyawa tersebut adalah  $C_{33}H_{56}O_6$ . Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa dapat dihitung dengan rumus *double bond equivalent*, diperoleh nilai F senyawa ZAB-2 sebesar 6. Dari perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa ZAB-2 memiliki 5 cincin siklik dan 1 ikatan rangkap. Dengan adanya inti kolesterol yang berikatan pada atom C-3 dengan rantai glukosa pada atom C-1'  $\delta_H$  4,22 (2H, *d*,  $J = 7,99$ ) maka senyawa ZAB-2 dapat dinamakan kolest-5-en-3 $\beta$ -il  $\beta$ -D-glukopiranosida.



**Gambar 4.7** Struktur senyawa ZAB-2

Hampir semua glikosida di alam mempunyai konfigurasi  $\beta$ . Gula yang paling sering dijumpai dalam glikosida alam adalah glukosa (Robinson, 1995). Sterol glukosida terbentuk ketika gugus hidroksil pada atom C-3 terikat dengan monosakarida, biasanya glukosa, pada posisi C-1'. Kolesterol yang ada di alam pada tanaman, hewan, dan ragi umumnya memiliki ikatan  $\beta$ -glukosida (Gul dan Amar, 2006).

Sterol memiliki sebuah sistem cincin tetrasiklik perhidro-siklopentana-fenantrena dengan rantai samping yang fleksibel pada atom C-17 dan 3  $\beta$ -monohidroksi. Sterol, bersama-sama dengan tokoferol, karotenoid dan klorofil, dibentuk dari polimerisasi unit isoprena. Senyawa fitosterol yang ada di alam antara lain kampesterol (24-metilkolesterol), sitosterol, dan stigmasterol. Struktur fitosterol dibedakan dari jumlah atom karbon pada rantai samping yang terikat pada atom C-17 serta jumlah dan posisi ikatan rangkap pada sistem cincin. Ciri

khas lainnya dari fitosterol adalah alkilasi pada atom C-24. Sitosterol dan stigmasterol memiliki gugus etil pada atom C-24 sedangkan kampesterol memiliki gugus metil yang teralkilasi pada atom karbon tersebut (Gul dan Amar, 2006).

Selain karena sterol terdiri dari bagian larut air dan bagian yang larut lemak (amfipatik), senyawa ZAB-2 juga terikat dengan molekul monosakarida. Karena bentuk glikosida menjadikan suatu senyawa lebih polar, maka senyawa ZAB-2 bisa tertarik oleh pelarut *n*-butanol. Beberapa penelitian yang memperoleh sterol glikosida dari ekstrak *n*-butanol antara lain isolasi stigmasterol glukosida dari *Prunella vulgaris* (Kojima, Sato, Hatano, 1990) dan dari daun *Passiflora alata* (Reginatto et al., 2001).

Di antara banyaknya molekul sterol yang telah ditemukan dalam tanaman, sitosterol merupakan bentuk yang paling umum tersebar di alam yaitu bentuk lain dari kolesterol yang mengalami substitusi etil pada posisi C-24. Tetapi tanaman juga mengandung kolesterol, baik dalam bentuk bebas maupun dalam bentuk teresterifikasi. Kolesterol dalam tanaman terbentuk sebagai komponen dalam membran jaringan dan dalam lipid pada permukaan daun. Jumlah kolesterol dalam tanaman biasanya sangat kecil jika dikalkulasikan sebagai persen total lipid, rata-rata 50 mg/kg total lipid, sedangkan pada hewan bisa mencapai 5 g/kg atau lebih (Behrman dan Gopalan, 2010).

Meskipun kolesterol biasanya merupakan komponen minor dari sterol tanaman (Kemal, 2006), tetapi juga bisa menjadi komponen utama seperti pada ganggang merah dan pada beberapa keluarga tanaman yang lebih tinggi seperti di Solanaceae dan Liliaceae (Christy, 2012). Kolesterol glikosida yang pertama kali dilaporkan berhasil diisolasi dari tanaman adalah kolesterol glikosida dari tanaman tembakau (Bolt dan Clarke, 1970). Senyawa sterol glikosida yang telah diisolasi dari genus *Zanthoxylum* adalah sitosterol- $\beta$ -D-glukosida dari tanaman *Zanthoxylum capense* Harv. yang diketahui memiliki aktivitas biologi sebagai antiulser dan telah dikembangkan sebagai fitomedisinal untuk sistem imun tubuh (Steyn, Van Den Heever, Vosloo, dan Ackerman, 1998).

## 4.8 Uji Aktivitas Isolat

### 4.8.1 Aktivitas Antioksidan Isolat

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metoda peredaman radikal DPPH, ZAB-1 memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 68,35  $\mu\text{g/mL}$  dan  $IC_{50}$  ZAB-2 sebesar 60,52  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.13).

**Tabel 4.13** Hasil uji antioksidan ZAB-1 dan ZAB-2

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan		% inhibisi	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Blangko	Sampel		
ZAB-1	20		$0,642 \pm 0,0057$	5,73	68,35
	10		$0,661 \pm 0,0007$	2,94	
	5	0,681	$0,662 \pm 0,0005$	2,79	
	2		$0,663 \pm 0,0007$	2,64	
	1		$0,667 \pm 0,0014$	2,06	
	Persamaan linier		$y = 0,704 (x) + 1,893$		
ZAB-2	20		$0,431 \pm 0,0007$	36,71	60,52
	10		$0,434 \pm 0,0007$	36,27	
	5	0,681	$0,436 \pm 0,0014$	35,98	
	2		$0,438 \pm 0,0007$	35,68	
	1		$0,439 \pm 0,0007$	35,54	
	Persamaan linier		$y = 0,238 (x) + 35,58$		

Kedua isolat tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan yang dimungkinkan oleh adanya gugus-gugus hidroksil pada rantai utama senyawa ZAB-1 dan gugus-gugus hidroksil pada molekul glukosa senyawa ZAB-2. Gugus hidroksil berperan sebagai donor proton sehingga mampu menangkap radikal DPPH dan menghambat reaksi oksidasi selanjutnya. Senyawa karbohidrat golongan oligosakarida (rafinosa) dan gula alkohol dapat melindungi sel tanaman dari kerusakan oksidatif dan menjaga homeostasis. Telah dilaporkan bahwa glukosa, fruktosa, sukrosa, dan manitol dapat meredam radikal hidroksil (Nishizawa-Yokoi, Yabuta, dan Shigeru, 2008).

Aktivitas peredaman radikal bebas juga dapat disebabkan oleh adanya ikatan rangkap terutama ikatan rangkap terkonjugasi. Adanya ikatan rangkap terkonjugasi meningkatkan transfer elektron dan aktivitas peredaman radikal melalui delokalisasi elektron (Apaka et al., 2007). Senyawa ZAB-1 memiliki

ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya yakni pada cincin aromatik. Sementara itu aktivitas antioksidan senyawa ZAB-2 dipengaruhi oleh adanya ikatan rangkap pada rangka utama kolesterol yakni ikatan rangkap pada posisi C-5 dan C-6 yang menjadikan kolesterol dalam lingkungan membran lebih mudah diserang oleh radikal bebas (Christy, 2012).

Nilai  $IC_{50}$  senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 lebih besar daripada nilai  $IC_{50}$  ekstrak *n*-butanol yang menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak *n*-butanol lebih baik daripada isolat. Hal ini dimungkinkan karena adanya senyawa-senyawa golongan lain (seperti golongan flavonoid) dalam ekstrak *n*-butanol yang bekerja sinergis dengan ZAB-1 dan ZAB-2 dalam meredam radikal bebas sehingga menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih baik daripada isolat itu sendiri.

Pada pengujian aktivitas antioksidan, BHT sebagai senyawa pembanding/standar memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 5,52  $\mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan aktivitas antioksidan BHT 12,38 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-1 ( $IC_{50}$  68,35  $\mu\text{g/mL}$ ) dan 10,96 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-2 ( $IC_{50}$  60,52  $\mu\text{g/mL}$ ). Senyawa standar lainnya yang digunakan adalah kuersetin dengan nilai  $IC_{50}$  2,43  $\mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan aktivitas antioksidannya 28,13 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-1 dan 24,9 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-2.

#### 4.8.2 Aktivitas dan Kinetika Penghambat Xantin Oksidase oleh Isolat

Senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 sama-sama memiliki aktivitas penghambat xantin oksidase yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sebesar 0,34  $\mu\text{g/mL}$  dan 0,06  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.14). Senyawa alopurinol sebagai senyawa standar pada pengujian ini memiliki nilai  $IC_{50}$  0,02  $\mu\text{g/mL}$  yang menunjukkan aktivitas penghambatan xantin oksidase 17 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-1 dan 3 kali lebih kuat daripada senyawa ZAB-2.

Aktivitas penghambatan terhadap enzim diduga terkait dengan adanya ikatan hidrogen pada gugus hidroksil yang terikat pada atom C-3 sterol dengan gugus amino pada rantai peptida yang dimiliki enzim (Howard et al., 2012; Lin et al., 2010). Oleh karena itu, adanya gugus hidroksil pada senyawa inhibitor dapat mempengaruhi interaksi dengan enzim. Senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan xantin oksidase mampu menghambat pembentukan anion



superoksida sehingga melindungi sel dari radikal bebas. Sterol dari tanaman yakni  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, dan bentuk glikosidanya telah dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan (Mohamed dan Al-Okbi, 2005).

**Tabel 4.14** Hasil uji penghambatan xantin oksidase oleh ZAB-1 dan ZAB-2

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Serapan	Kontrol sampel	% inhibisi	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Sampel			
ZAB-1	0,1	$0,328 \pm 0,0064$	0,009	42,11	0,34
	0,5	$0,313 \pm 0,0134$	0,011	45,19	
	1	$0,305 \pm 0,0120$	0,030	50,09	
	5	$0,294 \pm 0,0318$	0,049	55,54	
	10	$0,206 \pm 0,0106$	0,054	72,41	
Persamaan linier		$y = 19,45(x) + 43,84$			
ZAB-2	0,1	$0,318 \pm 0,0049$	0,027	47,19	0,06
	0,5	$0,309 \pm 0,0163$	0,036	50,45	
	1	$0,296 \pm 0,0106$	0,046	54,63	
	5	$0,281 \pm 0,0085$	0,051	58,26	
	10	$0,212 \pm 0,0007$	0,066	73,50	
Persamaan linier		$y = 16,97(x) + 48,95$			
Blangko	0,641	Kontrol blangko	0,090		

Analisis kinetika penghambatan xantin oksidase dilakukan menggunakan plot Lineweaver-Burk. Sampel yang digunakan adalah senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 pada konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$  karena memiliki penghambatan yang paling baik dengan persen inhibisi paling besar. Konsentrasi substrat xantin yang digunakan pada uji kinetika penghambatan xantin oksidase adalah 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; dan 0,25 mM. Hasil pengukuran serapan ZAB-1, ZAB-2 dan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan xantin oksidase dapat dilihat pada Tabel 4.15, 4.16, dan 4.17.

**Tabel 4.15** Data serapan ZAB-1 konsentrasi 10 µg/ml pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase

Konsentrasi xantin (S)	Serapan		Sm-KSm (V)	1/S	1/V
	Sampel (Sm)	Kontrol sampel (KSm)			
0,05 mM	0,082 ± 0,0014	0,005	0,077	20	12,99
0,1 mM	0,163 ± 0,0049	0,025	0,138	10	7,25
0,15 mM	0,244 ± 0,0078	0,006	0,238	6,67	4,20
0,2 mM	0,358 ± 0,0276	0,125	0,233	5	4,29
0,25 mM	0,447 ± 0,0184	0,219	0,228	4	4,39

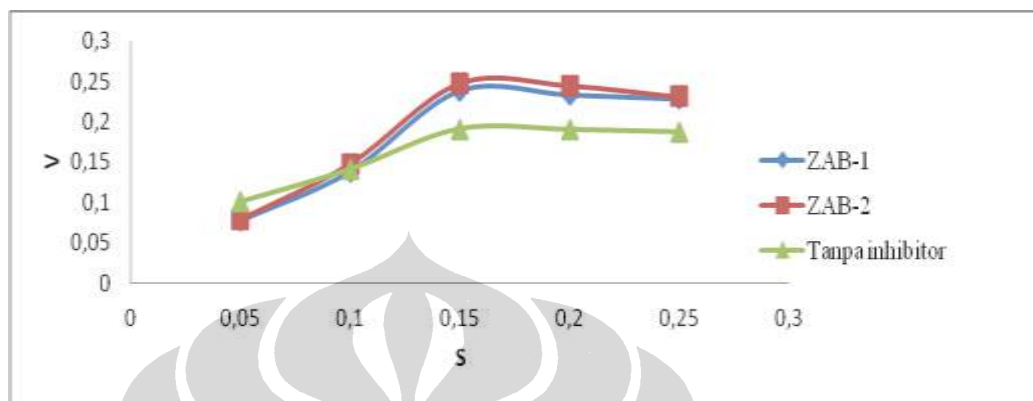
**Tabel 4.16** Data serapan ZAB-2 konsentrasi 10 µg/ml pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase

Konsentrasi xantin (S)	Serapan		Sm-KSm (V)	1/S	1/V
	Sampel (Sm)	Kontrol sampel (KSm)			
0,05 mM	0,086 ± 0,0226	0,007	0,079	20	12,66
0,1 mM	0,179 ± 0,0148	0,031	0,148	10	6,76
0,15 mM	0,252 ± 0,0092	0,004	0,248	6,67	4,03
0,2 mM	0,378 ± 0,0247	0,133	0,245	5	4,08
0,25 mM	0,472 ± 0,0156	0,241	0,231	4	4,33

**Tabel 4.17** Data serapan tanpa inhibitor pada uji kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase

Konsentrasi xantin (S)	Serapan		Sm-KSm (V)	1/S	1/V
	Sampel (Sm)	Kontrol sampel (KSm)			
0,05 mM	0,106 ± 0,0028	0,005	0,101	20	9,90
0,1 mM	0,169 ± 0,0078	0,028	0,141	10	7,09
0,15 mM	0,289 ± 0,0113	0,098	0,191	6,67	5,24
0,2 mM	0,386 ± 0,0198	0,196	0,272	5	5,26
0,25 mM	0,460 ± 0,0311	0,273	0,254	4	5,35

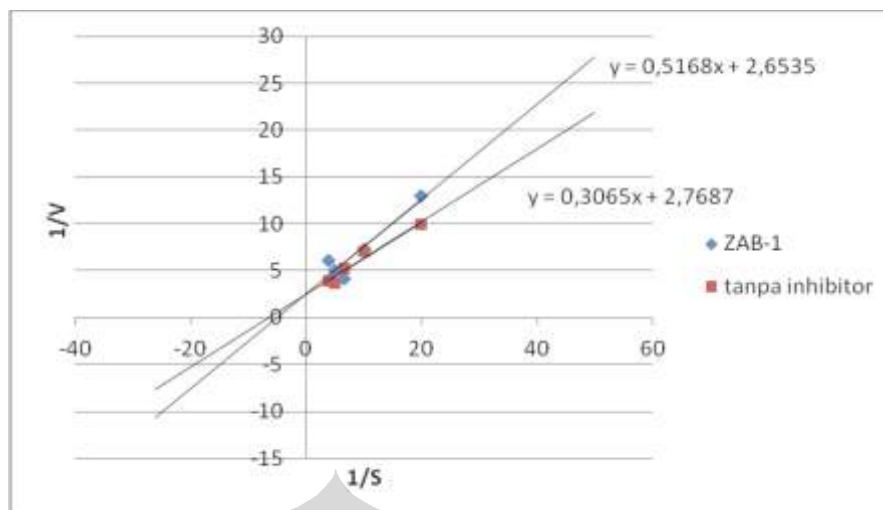
Setelah dilakukan pengukuran secara spektrofotometri kemudian konsentrasi substrat (S) diplotkan terhadap kecepatan reaksi (V), diperoleh grafik Michaelis-Menten seperti terlihat pada Gambar 4.8.



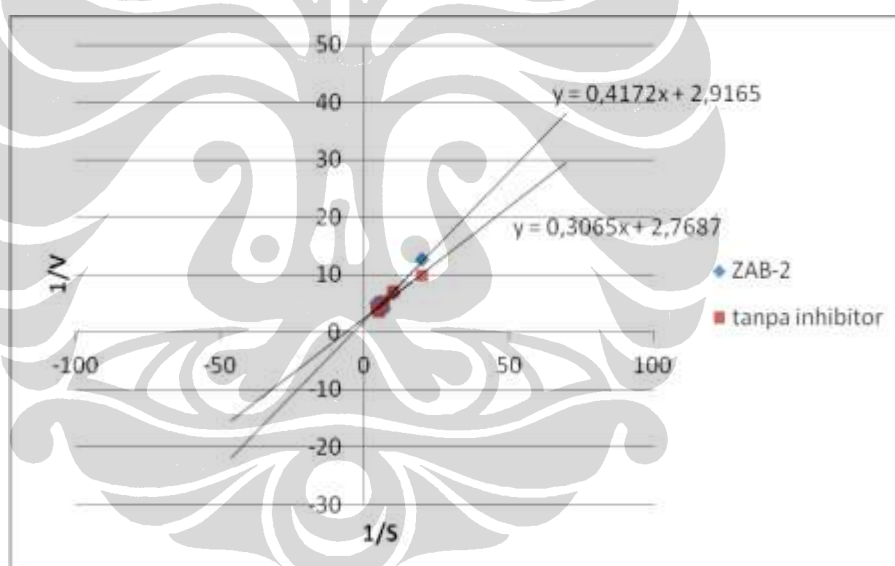
**Gambar 4.8** Grafik Michaelis-Menten senyawa ZAB-1, ZAB-2, dan tanpa inhibitor

Kecepatan reaksi pembentukan asam urat meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat sampai mencapai kecepatan maksimum tetapi kemudian mengalami penurunan yang dapat disebabkan oleh peningkatan jumlah enzim-substrat. Pada konsentrasi tertentu, ketika jumlah enzim-substrat sudah jenuh dan tidak ada lagi enzim bebas yang tersedia, peningkatan konsentrasi substrat tidak lagi meningkatkan kecepatan pembentukan enzim-substrat (Murray, Granner, Mayes, dan Rodwell, 2003).

Berdasarkan hasil uji kinetika penghambatan xantin oksidase, diperoleh plot Lineweaver-Burk seperti pada Gambar 4.9 dan 4.10. Perpotongan garis regresi linier tanpa inhibitor dan dengan inhibitor (isolat) terletak pada sumbu y, sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis kinetika penghambatan aktivitas xantin oksidase oleh isolat adalah inhibisi kompetitif.



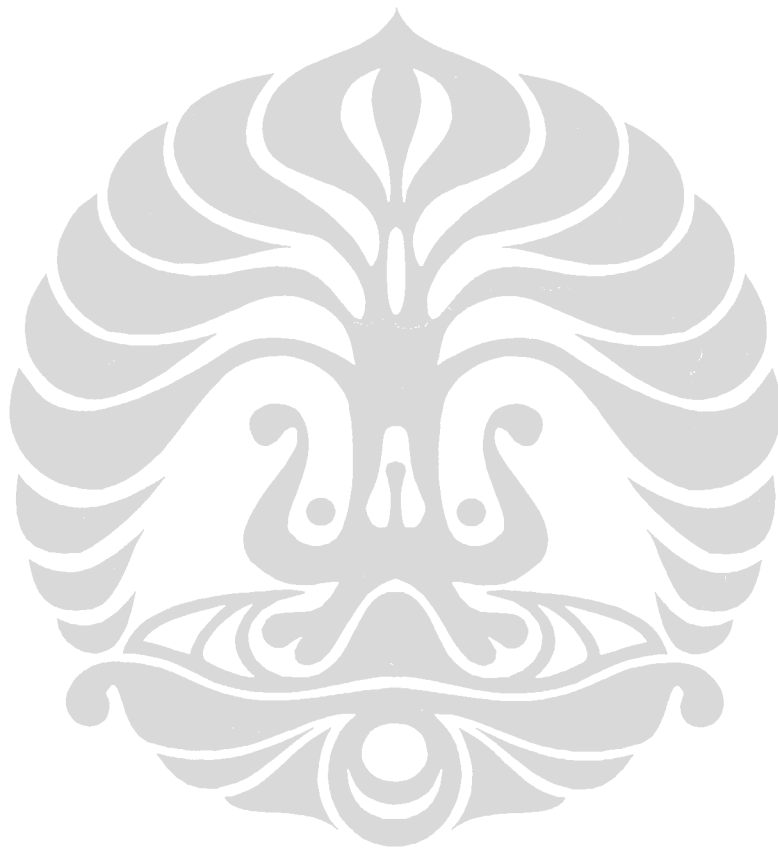
**Gambar 4.9** Plot Lineaweaver-Burk senyawa ZAB-1 10  $\mu\text{g/mL}$  dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM



**Gambar 4.10** Plot Lineaweaver-Burk senyawa ZAB-2 10  $\mu\text{g/mL}$  dengan konsentrasi xantin 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 dan 0,25 mM

Inhibitor kompetitif berkompetisi dengan substrat untuk menempati sisi aktif enzim dengan kecepatan ( $V_m$ ) yang sama. Pada mekanisme penghambatan kompetitif, inhibitor meningkatkan  $K_m$  enzim. Dari analisis plot Lineweaver-Burk, diperoleh persamaan garis  $y = bx + a$  sehingga tetapan kinetika  $V_m$  dan  $K_m$  dapat ditentukan. Dari hasil perhitungan, diperoleh nilai  $V_m$  ZAB-1 sebesar 0,37 dan ZAB-2 sebesar 0,35. Kedua isolat tersebut memiliki nilai  $V_m$  yang sama dengan

$V_m$  tanpa inhibitor yaitu 0,36. Ini menunjukkan bahwa senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 bersaing dengan xantin menempati sisi aktif enzim dengan kecepatan yang sama. Sedangkan nilai  $K_m$  ZAB-1 diperoleh sebesar 0,19 dan nilai  $K_m$  ZAB-2 sebesar 0,14, lebih besar daripada  $K_m$  tanpa inhibitor yaitu 0,11. Ini menunjukkan bahwa senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 meningkatkan  $K_m$ .



## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) melalui peredaman radikal bebas DPPH, diperoleh nilai IC<sub>50</sub> ekstrak *n*-butanol sebesar 53,51 µg/mL. Berdasarkan hasil pengujian penghambatan xantin oksidase, ekstrak *n*-butanol memiliki aktivitas yang kuat dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 3,69 µg/mL.

Berdasarkan hasil elusidasi struktur senyawa hasil isolasi dari ekstrak *n*-butanol melalui penelusuran spektroskopi, senyawa ZAB-1 adalah 17-((23E,26E)-23-etiliden-29-hidroksi-29-(2-hidroksipropoksi)-25-metildek-26-en-20-il)-13,15-dimetil-gona-1,3,5(10)-trien-3-ol dan senyawa ZAB-2 adalah senyawa kolest-5-en-3β-il β-D-glukopiranosida.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal bebas DPPH, senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 68,35 µg/mL dan 60,52 µg/mL sedangkan BHT dan kuersetin memiliki nilai IC<sub>50</sub> 5,52 µg/mL dan 2,43 µg/mL. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas penghambatan xantin oksidase, senyawa ZAB-1 dan ZAB-2 memiliki aktivitas dengan nilai IC<sub>50</sub> 0,34 µg/mL dan 0,06 µg/mL sedangkan alopurinol memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 0,02 µg/mL. Dibandingkan terhadap senyawa standar, aktivitas antioksidan senyawa ZAB-1 melalui peredaman radikal bebas DPPH lebih baik daripada aktivitas penghambatan xantin oksidase, sedangkan aktivitas senyawa ZAB-2 lebih baik dalam penghambatan xantin oksidase daripada peredaman radikal bebas DPPH.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi lebih lanjut golongan senyawa lainnya dari ekstrak *n*-butanol maupun dari ekstrak lainnya dari buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) dengan harapan memiliki aktivitas yang sama atau lebih baik daripada senyawa isolat ZAB-1 dan ZAB-2.

## DAFTAR ACUAN

- Apaka, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B. K., Berker, I., Ozyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Aparecida, V., Pereira, D., Gamboa, I.C., Zanoni, M.V.B., Furlan, M. (2010). Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, 15, 6956-6973.
- Apaya, K. L., Chichioco-Hernandez, C.L. (2011). Xanthine oxidase inhibition of selected Philippine medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2), 289-292.
- Babu, R. B., Khurana, S. (2007). A new flavone glycoside from *Zanthoxylum acanthopodium* DC. *Indian Journal of Chemistry*, 46B, 872-874.
- Baghiani, A., Djarmouni, M., Boumerfegi, S., Trabsa, H., Charefi, N., Khennouf, S., Arrar, L. (2012). Xanthine oxidase inhibition and antioxidant effects of *Peaganum harmala* seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants* 2(1): 42-56.
- Behrman, E.J. dan Gopalan, V. (2010). Cholesterol and plants. *Journal of Chemical Education*. 20(20) : 1-3.
- Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M. (1974). *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed.) 2<sup>nd</sup> Edition, Volume I, 521-522, New York : Academic Press Inc.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bisswanger, H. (2008). *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Jerman : Wiley-VCH.
- Bolt, A.J.N. dan Clarke, R.E. (1970). Cholesterol glucoside in tobacco. *Phytochemistry*. 9(4), 819-822.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and Technology*, 28, 25-30.

- Chanda, S. dan Dave, R. (2009). In Vitro Models for Antioxidant Activity Evaluation and Some Medicinal Plants Antioxidant Properties : An Overview. *African Journal of Microbiology Research*, 3(13), 981-996.
- Christian, Gary D. (1994). *Analytical Chemistry*. 5<sup>th</sup> ed. University of Washington. USA: John Wiley & Sons.
- Christy, W. (2012). *Sterols and Their Conjugate from Plants and Lower Organism*. Mei 17, 2012. [http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/plant\\_st/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/plant_st/index.htm).
- Cos P., Li, Y., Calomme, M., Jia P. H., Cimanga K., Bart Van Poel, Luc Pieters, Arnold J. Vlietinck, Dirk Vanden Berghe. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxides scavenger. *Journal of Natural Product*, 61, 71-76.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1980). *Materia Medika Indonesia* Jilid IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 159, 166-170.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Materia Medika Indonesia* Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 333-334.
- Dubey, R.K, Kumar, R., Jaya, Dubey, N.K. (2007). Evaluation of *Eupatorium cannabinum* Linn. oil in enhancement of shelf life of mango fruits from fungal rotting. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23, 467-473
- Fransworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science* , 55, 3.
- Gritter, R.J., Bobbitt, James, M., Schwarting, Arthur E. (1985). Pengantar Kromatografi. Terjemahan dari *Introduction to Chromatography* oleh Padmawinata, K. Bandung: Penerbit ITB.
- Gul, M.K., Amar, S. (2006). Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5, 71-79.
- Handa, S.S., Khainuja, S.P.S., Longo, G., Rakesh, D.D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre for Science and High Technology.
- Hasairin. A. (1994). *Etnobotani rempah dan makanan adat masyarakat Batak Angkola dan Mandailing*. Tesis. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- He, W., Puyvelde, L. V., Kimpe, N. D., Verbruggen, L., Anthonissen, K., Flaas, M. V. d., Bosselaers, J., Mathenge, S. G., Mudida, F. P. (2002), Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarense*. *Phytotherapy Research*, 16, 66-70.



- Hernani, R. M. (2005). *Tanaman berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadya.
- Howard, A.L., Liu, J., Elmegeed, G.A., Collins, E.K., Ganatra, K.S., Nwogwugwu, C.A., Nes, W.D. (2012). Sterol C24-methyltransferase: physio- and stereochemical features of the sterol C3 group required for catalytic competence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 521 (1-2), 43-50.
- Jones, S.B. Jr dan Luchsinger, A.E. (1987). *Plant Systematics*. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw-Hill, Inc., 380-381.
- Jullian, V., Bourdy, G., Georges, S., Maurel, S., Sauvain, M. (2006). Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3), 348-352.
- Katzer, G. (2001). *Spice Pages*. Maret 25, 2011. [http://www.unigraz.at/~katzer/engl/Zant\\_pip.html](http://www.unigraz.at/~katzer/engl/Zant_pip.html).
- Kemal, M. dan Amara, S. (2006). Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Cell and Molecular Biology*, 5: 71-79
- Kojima, H. Sato, N. Hatano, A. (1990). Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. *Phytochemistry*, 29(7), 2351-2355.
- Langseth, L. (1995). *Oxidant, Antioxidant, and Disease Prevention*. Belgium: International Life Science Institute press.
- Lee, I.E., Kim, H.R., Ang, Y.S. (2002). Antioxidant activity of ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6490-6496.
- Leong, L. P., dan Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore market. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- Lin, H.C., Tsai, S.H., Chen, C.S., Chang, Y.C., Lee, C.M., Lai, Z.Y, Lin, C.M.. (2008). Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical pharmacology*, 75, 1416-1425.
- Lin, C.N., Huang, A.M., Lin, K.W., Hour, T.C., Ko, H.H., Yang, S.C., Pu, Y.S. (2010). Xanthine oxidase inhibitory terpenoids of *Amentotaxus formosana* protect cisplatin-induced cell death by reducing reactive oxygen species (ROS) in normal human urothelial and bladder cancer cells. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2140-2146.

- Lu, Z., Wagoner R.M. Van, Harper M.K, Hooper, J.N.A, Ireland, C.M. (2010). Two Ring-A-Aromatized Bile Acids from the Marine Sponge *Sollasella moretonensis*. *Natural Product of Community*, 5(10), 1571–1574.
- Mangkudidjojo, M., Sirait, M., Siahaan, M. (1996). *Telaah buah andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC.)*. Simpul Nasional Apinmap. Puslitbang Biologi. Bogor : Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. (2000). *Biokimia Kedokteran Dasar*. Brahm U.P, penerjemah. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari : *Basic Medical Biochemistry : A Clinical Approach*.
- McInnes, GT., Lawson, DH., Jick, H. (1981). Acute adverse reactions attributed to allopurinol in hospitalised patients. *Annals of the Rheumatic Disease*, 40, 245-249.
- Miftakhurohmah dan Suhirman, S. (2009). Potensi Andaliman sebagai Antioksidan dan Antimikroba Alami. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*, 15(2), 8-10.
- Mohamed, D.A., Al-Okbi, S.Y. (2008). Evaluation of antigout activity of some plant food extract. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*. 58(3), 389-395.
- Murni, S.W., Kholisoh, S.D., Tanti D.L., dan Petriusia E.M. (2011). *Produksi, Karakterisasi, dan Isolasi Lipase dari Aspergillus niger*. Yogyakarta: Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes P.A., dan Rodwell, V.W. (2003). *Biokimia Harper Edisi.25*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Negi, J.S, Bish, V.K., Bhandari, A.K., Singh, P., Sundriyah, R.C. (2011). Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: A review. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(12), 412-416.
- Nile S.H., Khobragade, CN. (2011). Phytochemicals analysis, antioxidant, and xanthine oxidase inhibitory activity of *Tephrosia purpurea* Linn root extract. *Indian Journal of Natural Product and Resources*, 2(1), 52-58.
- Nishizawa-Yokoi, A., Yabuta, Y., Shigeru, S. (2008). The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signaling and Behavior*. 3(11), 1016–1018.

- Owen, P., Johns, T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 149-160.
- Pacher, P., Nivorozhkin, A., Szabo, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacology Review* 58(1), 87–114.
- Parhusip, A.J.N., Sibuea, P. dan Tarigan, A. (1999). *Studi Tentang Aktivitas Antimikroba Alami pada Andaliman*. Seminar Nasional Teknologi Pangan. Jakarta. 12-13 Oktober 1999.
- Patino, O.J dan Cuca, L.E. (2011). Monophyllidin, a new alkaloid *L*-proline derivative from *Zanthoxylum monophyllum*. *Phytochemistry Letters*, 4(1), 22-25.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). *Antioxidants in food. Practical Applications*. USA: Woodhead Publishing Ltd.
- Phongpaichit, S., Nikom, J., Rungjindamai, N., Sakayaroj, J., Hutadilok-Towatana, N., Rukachaisirikul, V., Kirtikara, K. (2007). Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from garcinia plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51, 517-525.
- Prakash, A. Rigelhof, F., Miller, E. (2001). Antioxidant activity, *Medallion Laboratories Analytical Progress*, Vol. 19( 2), 1-4.
- Pratt, D.E. dan Hudson, B.J.F. (1990). Natural antioxidants not exploited commercially. di dalam : B.J.F. Hudson (ed.). *Food Antioxidants*. London : Elsevier Applied Science.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, Karen. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Rasooli, I. (2011). Bioactive Compounds in Phytomedicine. Kroasia: *In Tech*. 185-207.
- Reginatto, F.H., Kauffmann, C., Schripsema, J., Guillaume, D., Gosmann, G., Schenkel, E.P. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(1).
- Reynertson, K.A. (2007). *Phytochemical analysis of bioactive constituents from edible Myrtaceae fruit*. Dissertation. New York: The City University of New York.
- Ringertz, H. (1966). The molecular and crystal structure of uric acid. *Acta Crystallography*. 20, 397-403.

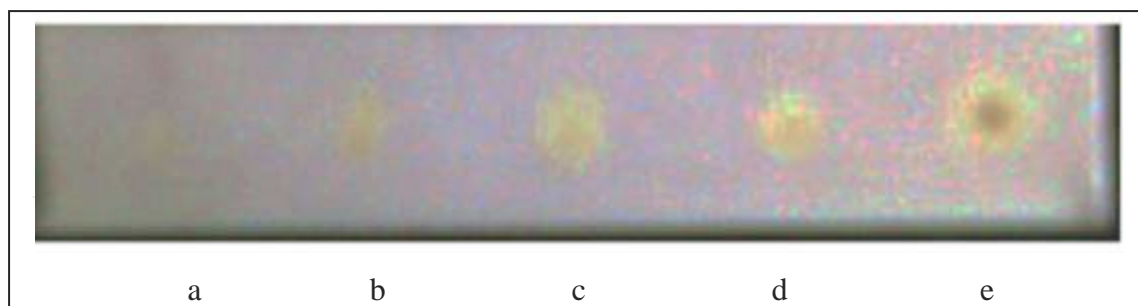
- Robinson, T. (1991). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Sabri, E. (2007). Efek perlakuan ekstrak andaliman pada tahap praimplantasi terhadap fertilitas dan perkembangan embrio mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Biologi Sumatera*, 2(2), 28-32.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, MD., Ismail, S., Mansor, SM. (2009). In vitro antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of methanolic *Swietenia mahagoni* seed extracts. *Molecules*, 14, 4476-4485.
- Salazar R, Pozos ME, Cordero P, Perez J, Salinas MC. Waksman N. (2008). Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast Mexico. *Pharmacy Biology*, 46, 166-170.
- Shahidi, F. dan Naczki, M. (1995). *Food Phenolics*. Technomic pub. Co. Inc, Lancaster-Basel.
- Shyur, L., Tsung, J.H, Chen, J.H., Chiu, G.Y., Lo, G.P. (2005). Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3(3), 195-202.
- Sigma Aldrich. (1994). Sigma Quality Control Test Procedure. [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/xanthine\\_oxidase.Par.0001.File.tmp/xanthine\\_oxidase.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/xanthine_oxidase.Par.0001.File.tmp/xanthine_oxidase.pdf). September 23, 2011.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. USA: John Wiley & Sons.
- Siregar, B.L. (2002). *Andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC.) di Sumatera Utara: Deskripsi dan Perkecambahannya*. *Jurnal Hayati*, 10(1), 38-40.
- Sivashanmugam, A.T, Chatterjee, T.K. (2012). Xanthine Oxidase Inhibitory Activity and Enzyme Kinetics of *Polyalthia longifolia* (Sonner.) Leaves Using in Vitro Method. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 3(1): 61-65.
- Skoog, D. A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. 5<sup>th</sup> ed. USA: Brooks/cole-Thomson Learning.
- Smith, C.M, Reynard, A.M. (1995). *Essential of Pharmacology*. USA: W.B Saunders Company, 189-190.
- Stahl, E. (1969). Apparatus and General Techniques in TLC. Dalam: Stahl,E. (ed). *Thin Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. Terj. Dari *Dunnschicht chromatographie*, oleh Ashworth, M.R.F. Berlin : Springer-Verlag, 61-77.

- Steyn, P.S., Van Den Heever, J.P., Vosloo, H.C.M, Ackerman, L.G.J. (1998). Biologically active substances from *Zanthoxylum capense* Harv. *South African Journal of Science*, 94, 391-393.
- Souri, E., Amin, G., Farsam, H., Jalalizadeha, H., Barezia, S. (2008). Screening of thirteen medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(2), 149-154.
- Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 531–537.
- Suryanto, E., Sastrohamidjojo, H., Raharjo, S., Tranggono. (2004). Antiradical activity of andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) fruit extract. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, II (1), 15-19.
- Supratman, U. (2010). *Elucidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya Padjajaran, 1, 9-21, 66-79, 117, 260-263.
- Tahir, I., Wijaya, K., Widianingsih, D., (2003). *Terapan Analisis Hansch Untuk Aktivitas Antioksidan senyawa Turunan Flavon/Flavonol*, Seminar on Chemometrics- Chemistry Dept Gadjah Mada University, 25 Januari.
- Tamta H, Sukirti, K., & Anup KM. (2006). Biochemical characterization of some pyrazolopyrimidinebased inhibitors of xanthine oxidase. *Biochemistry*, 71(1), S49-S54.
- Tensiska, C., Wijaya, H., & Nuri Andarwulan. (2003). Aktivitas antioksidan ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) dalam beberapa sistem pangan dan kestabilan aktivitasnya terhadap kondisi suhu dan pH. *Jurnal teknologi dan industri pangan*, XIV (1), 29-39.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.
- Thouvenel, C., Gantier, J.-C., Duret, P., Fourneau, C., Hocquemiller, R., Ferreira, M.-E., de Arias, A. R. and Fournet, A. (2003). Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *Phytotherapy Research*, 17, 678–680.
- Tiwari, A.K. (2001). Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. *Current Science*, 81(9), 1179-1187.

- Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, A. T., dan Remyaraju, A. (2009). In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 646-648.
- Vaya, J., Aviram, M. (2001). Nutritional antioxidants : mechanism of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry–Immunology, Endocrine & Metabolic Agents*, 1, 99-117.
- Wang, G.Y.S., Crew, P. (1996). Geodisterol, a novel polyoxygenated sterol with an aromatic A ring from the tropical marine sponge *Geodia* sp. *Tetrahedron Letters*, 37(45), 8145-8146.
- Wijaya, A. (1996). Radikal bebas dan parameter status antioksidan. *Forum Diagnosticum, Prodia Diagnostic Educational Service*, No. 1, 1-12
- Wijaya, A., (1997). Oksidasi LDL, aterosklerosis dan antioksidan, *Medika* (3), 1-15.
- Wijaya, CH. (1999). Andaliman, rempah tradisional sumatera utara dengan aktivitas antioksidan dan antimikroba. *Buletin Teknologi Industri Pangan*, 10, 59-61.
- Wijaya CH. (2000). Isolasi dan identifikasi senyawa trigeminal aktif buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC). *Jurnal Hayati* 7, 91-95.
- Wijaya CH, Hadiprodjo IT, Apriyantono A. (2001). Komponen volatil dan karakterisasi komponen kunci aroma buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.). *Jurnal Teknologi Industri Pangan*, 12, 117-125.
- Yanti, Pramudito, T.E., Nuriasari, N., Juliana, K. (2011). Lemon pepper fruit extract (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.) suppresses the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced macrophages in vitro. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(4), 176-186.
- Young, I.S. dan Woodside, J.V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.



**Gambar 4.11** Simplisia buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.)



Keterangan :

a : ekstrak petroleum eter

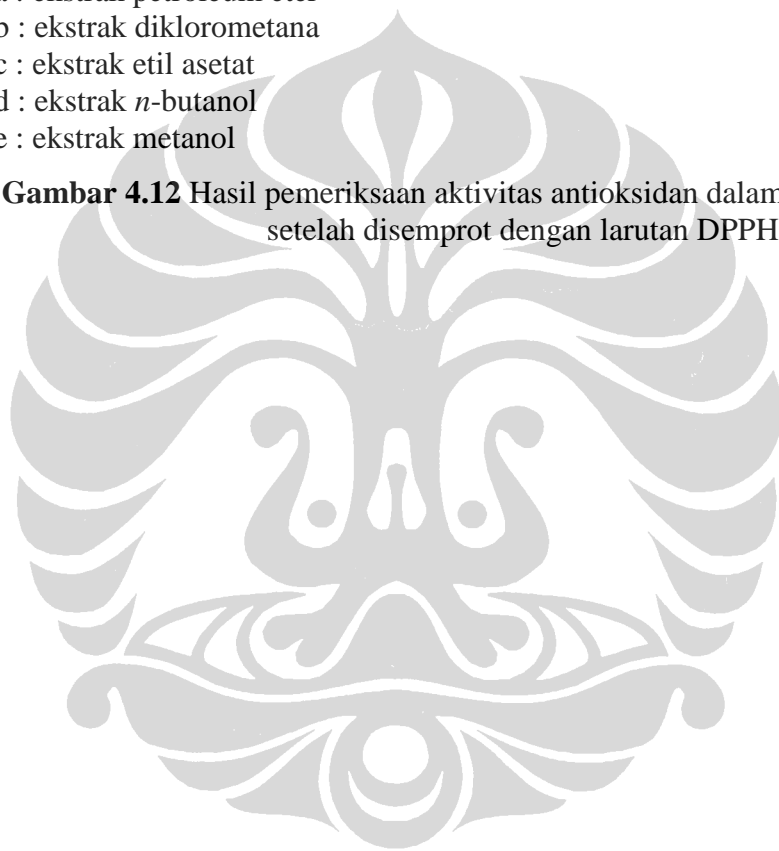
b : ekstrak diklorometana

c : ekstrak etil asetat

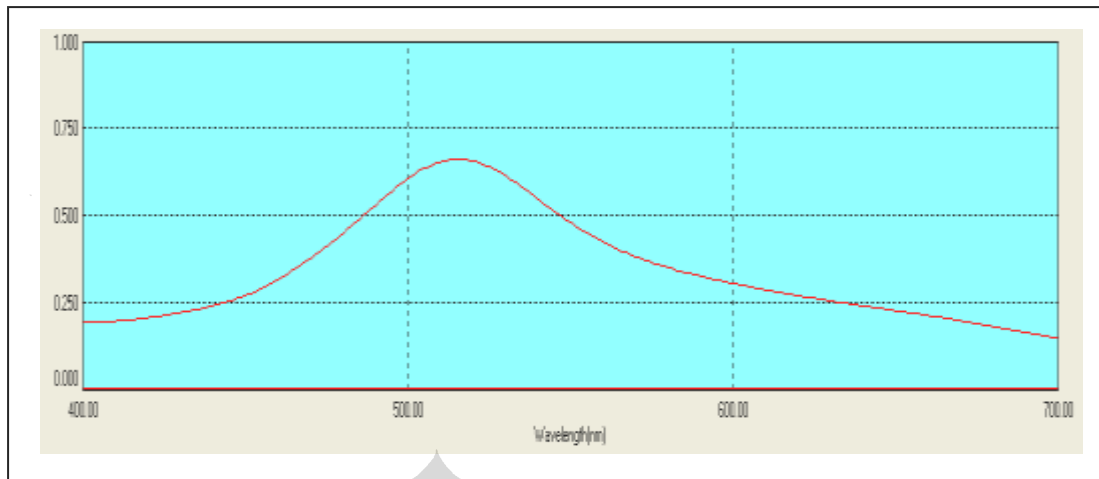
d : ekstrak *n*-butanol

e : ekstrak metanol

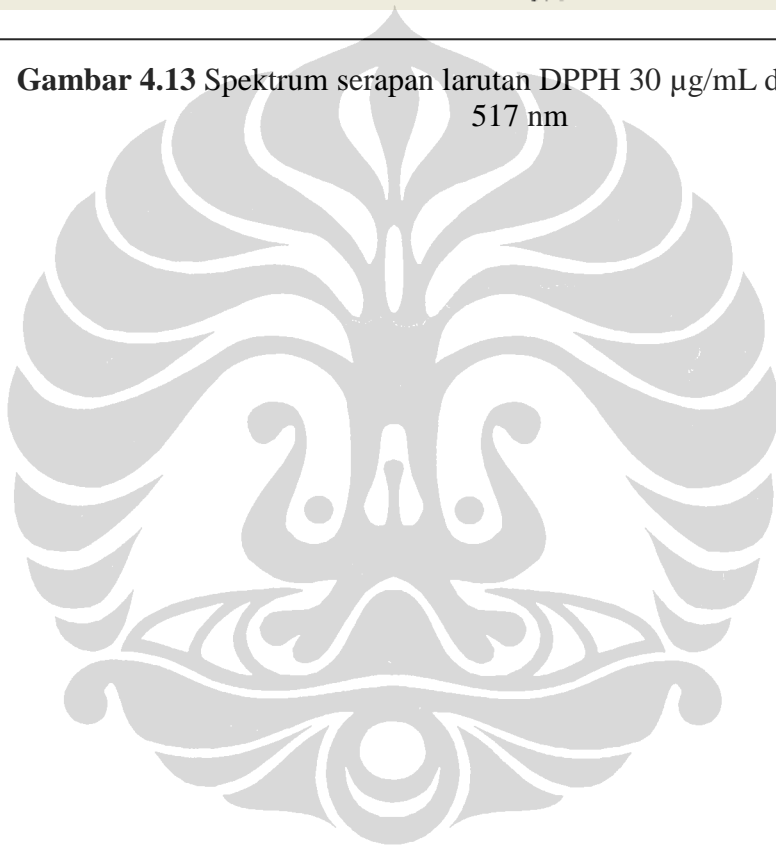
**Gambar 4.12** Hasil pemeriksaan aktivitas antioksidan dalam ekstrak secara KLT setelah disemprot dengan larutan DPPH

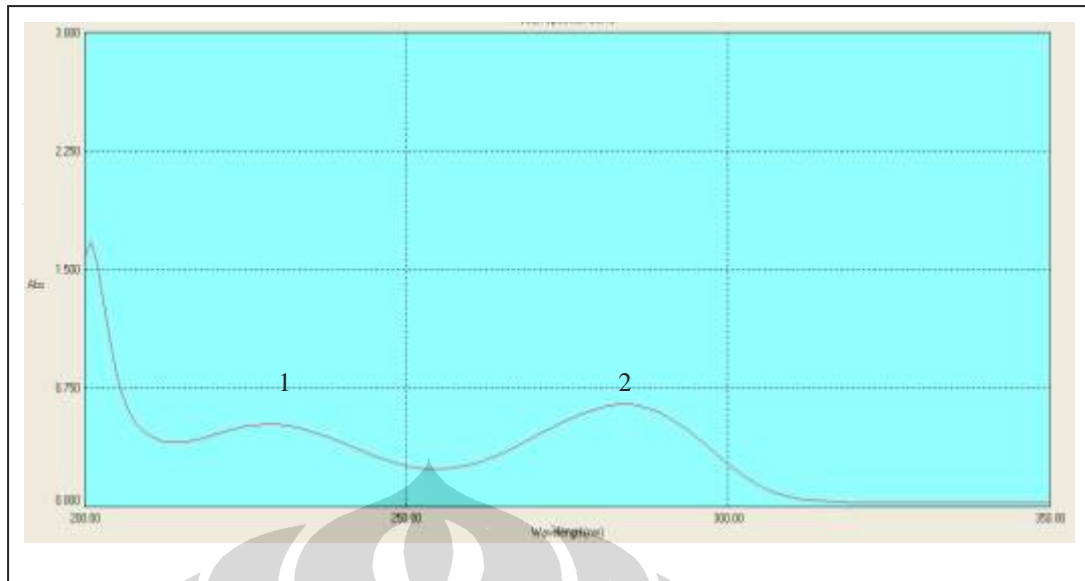






**Gambar 4.13** Spektrum serapan larutan DPPH 30 µg/mL dalam metanol pada 517 nm



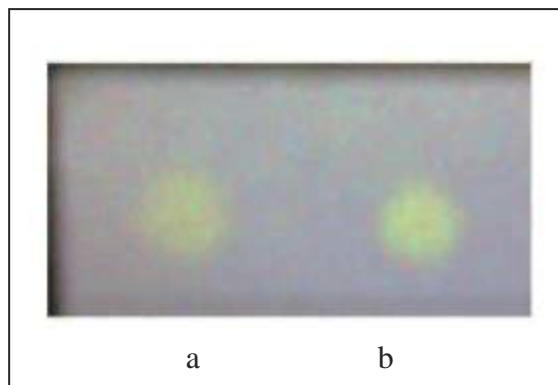


Keterangan:

Puncak 1 : serapan pada 230 nm

Puncak 2 : serapan pada 284 nm

**Gambar 4.14** Spektrum serapan larutan blanko pada uji penghambatan xantin oksidase

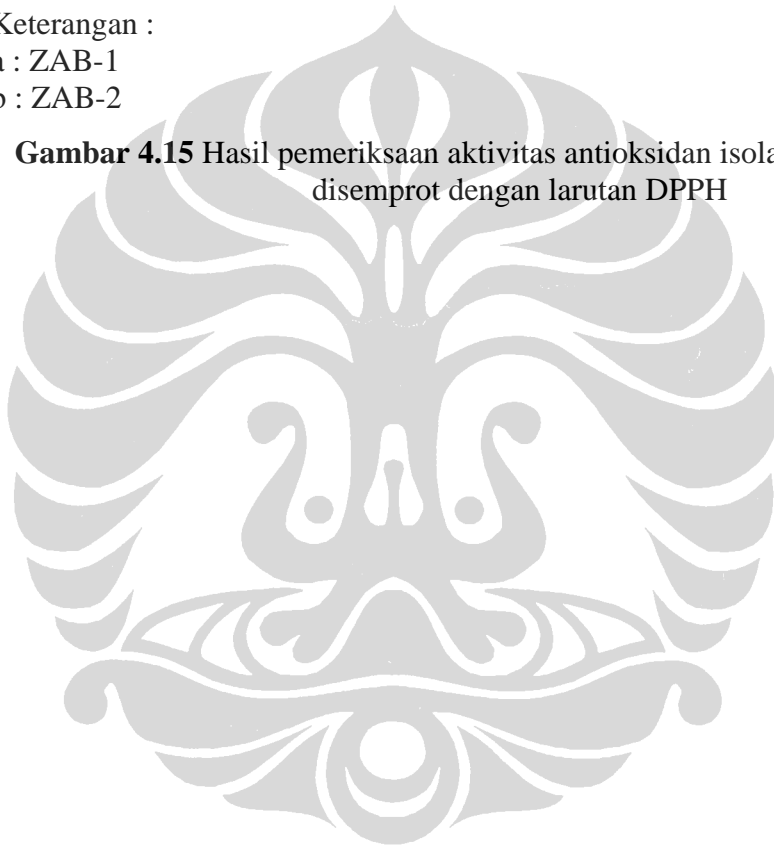


Keterangan :

a : ZAB-1

b : ZAB-2

**Gambar 4.15** Hasil pemeriksaan aktivitas antioksidan isolat pada KLT setelah disemprot dengan larutan DPPH





Keterangan :

a : dilihat di bawah sinar UV 366 nm

b : dengan pereaksi semprot  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% dan dipanaskan

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

**Gambar 4.16** Profil KLT ZAB-1 dengan fase gerak diklorometana-metanol 7:3 dan Rf 0,75



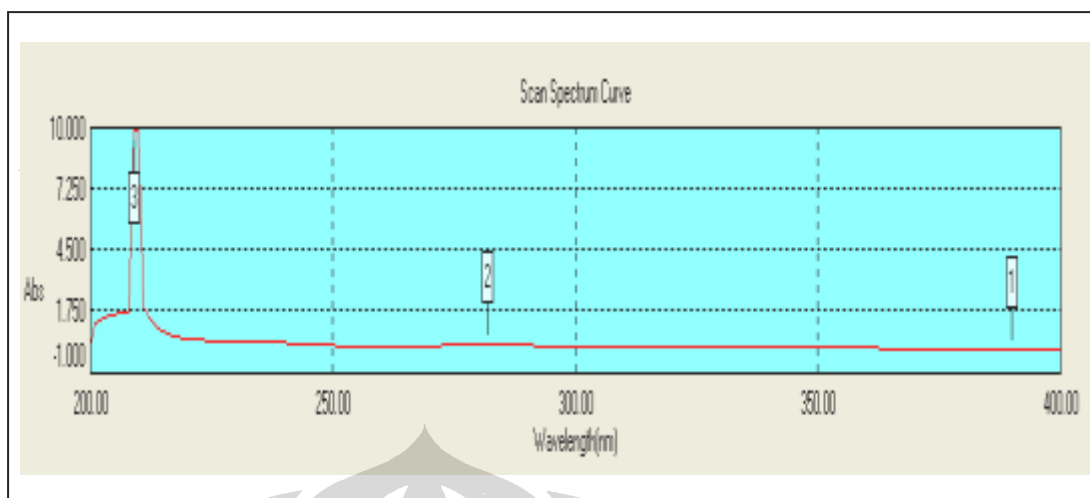
Keterangan :

a : dilihat di bawah sinar UV 366 nm

b : dengan pereaksi semprot  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% dan dipanaskan

Fase diam : silika gel GF<sub>254</sub>

**Gambar 4.17** Profil KLT ZAB-2 dengan fase gerak diklorometana-metanol 1:1 dan Rf 0,68



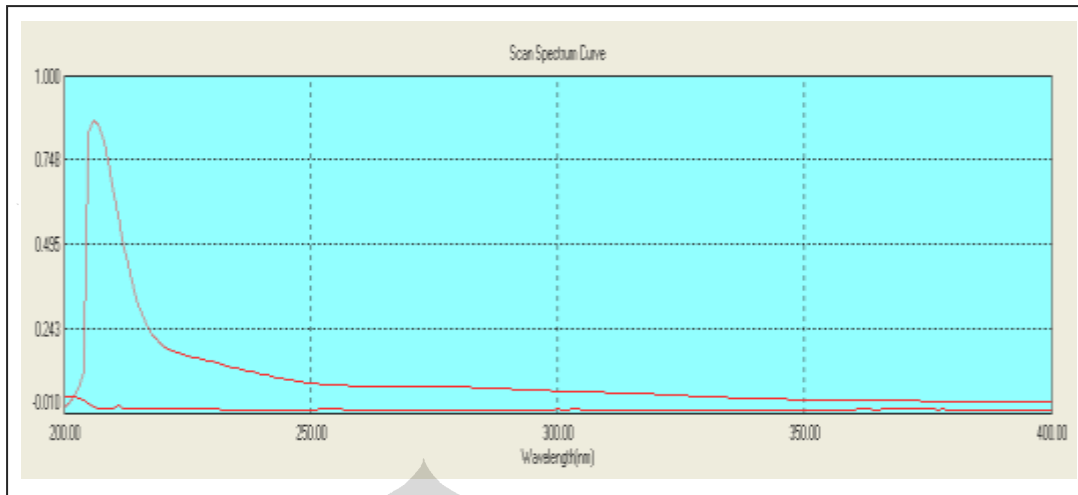
Keterangan:

Puncak 1 : serapan pada 390 nm

Puncak 2 : serapan pada 282 nm

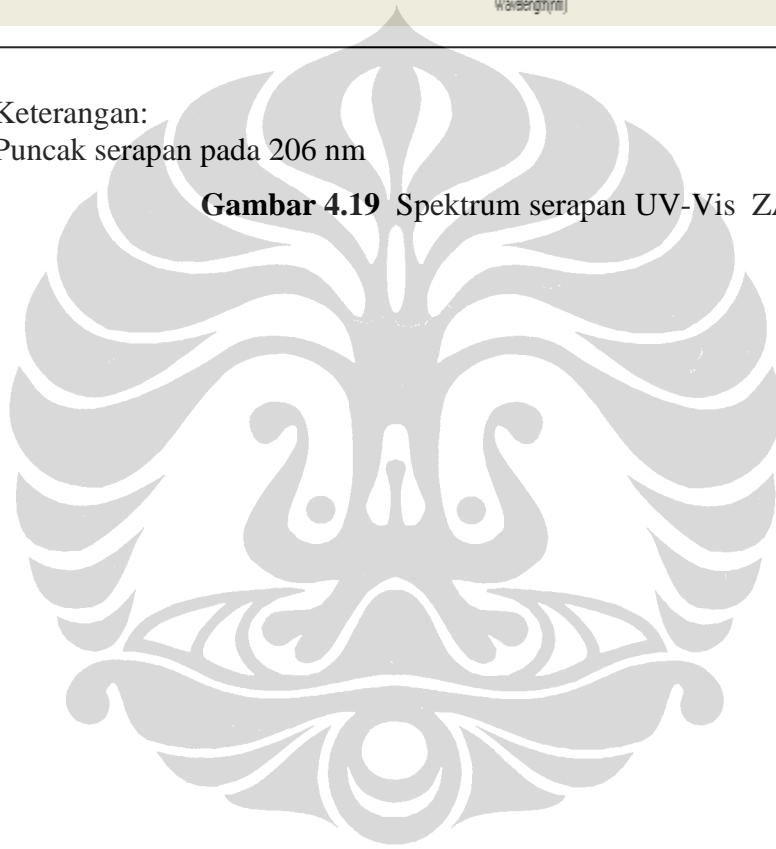
Puncak 3 : serapan pada 209 nm

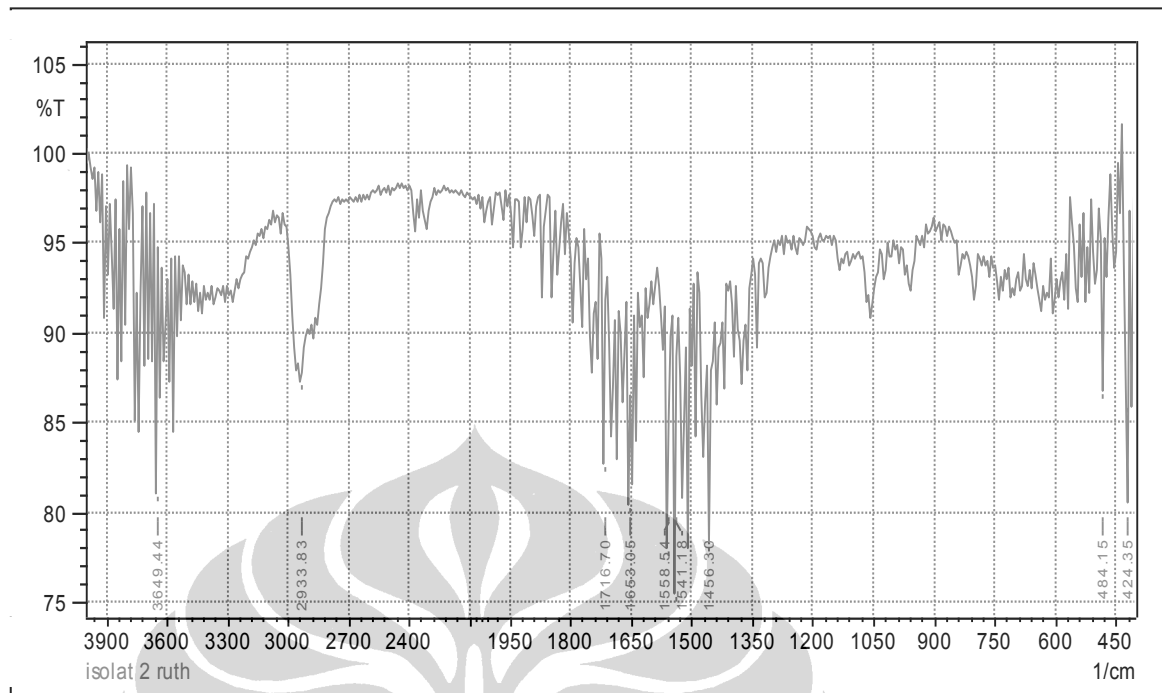
**Gambar 4.18** Spektrum serapan UV-Vis ZAB-1



Keterangan:  
Puncak serapan pada 206 nm

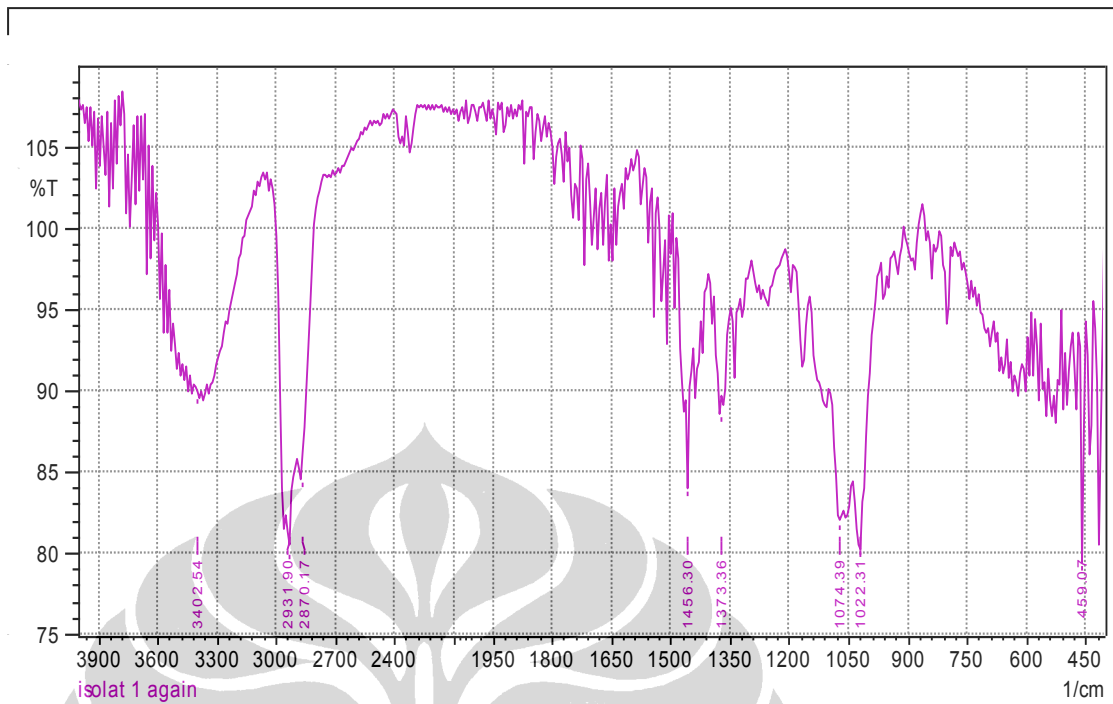
**Gambar 4.19** Spektrum serapan UV-Vis ZAB-2



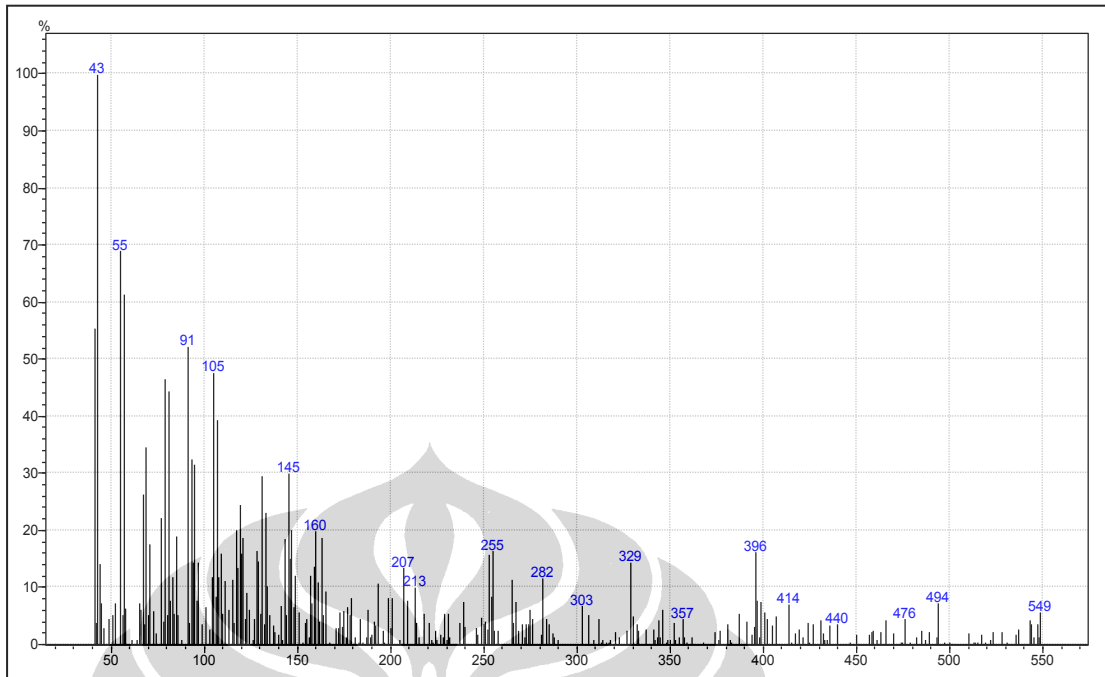


**Gambar 4.20** Hasil pengukuran spektrofotometri infra merah ZAB-1

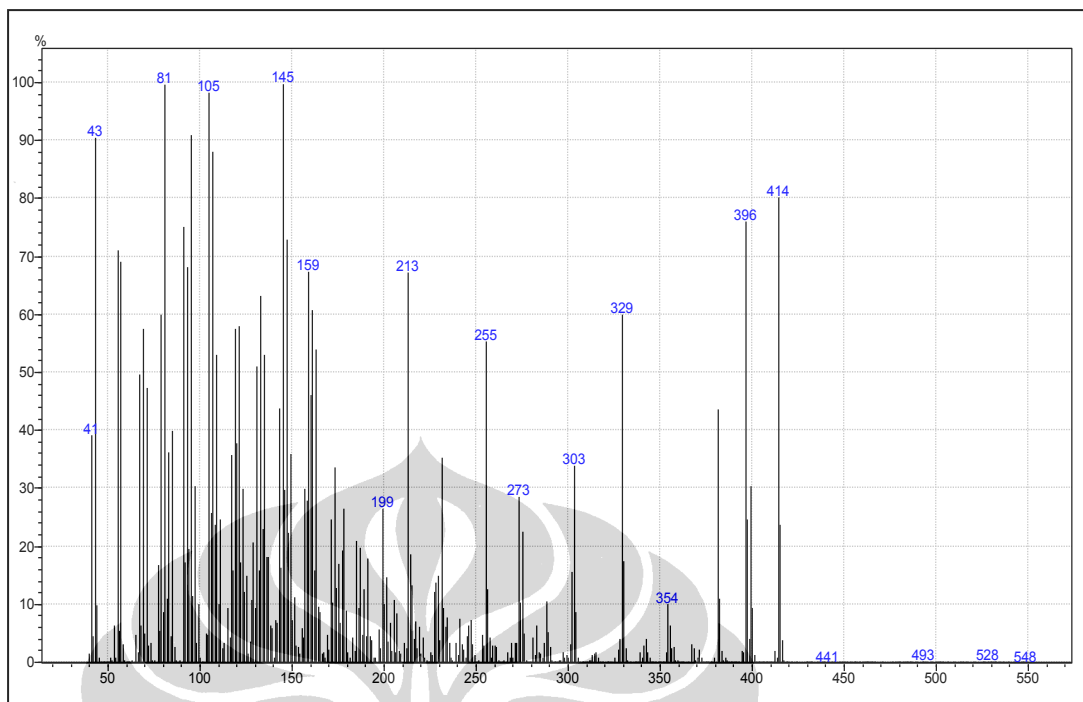




**Gambar 4.21** Hasil pengukuran spektrofotometri infra merah ZAB-2

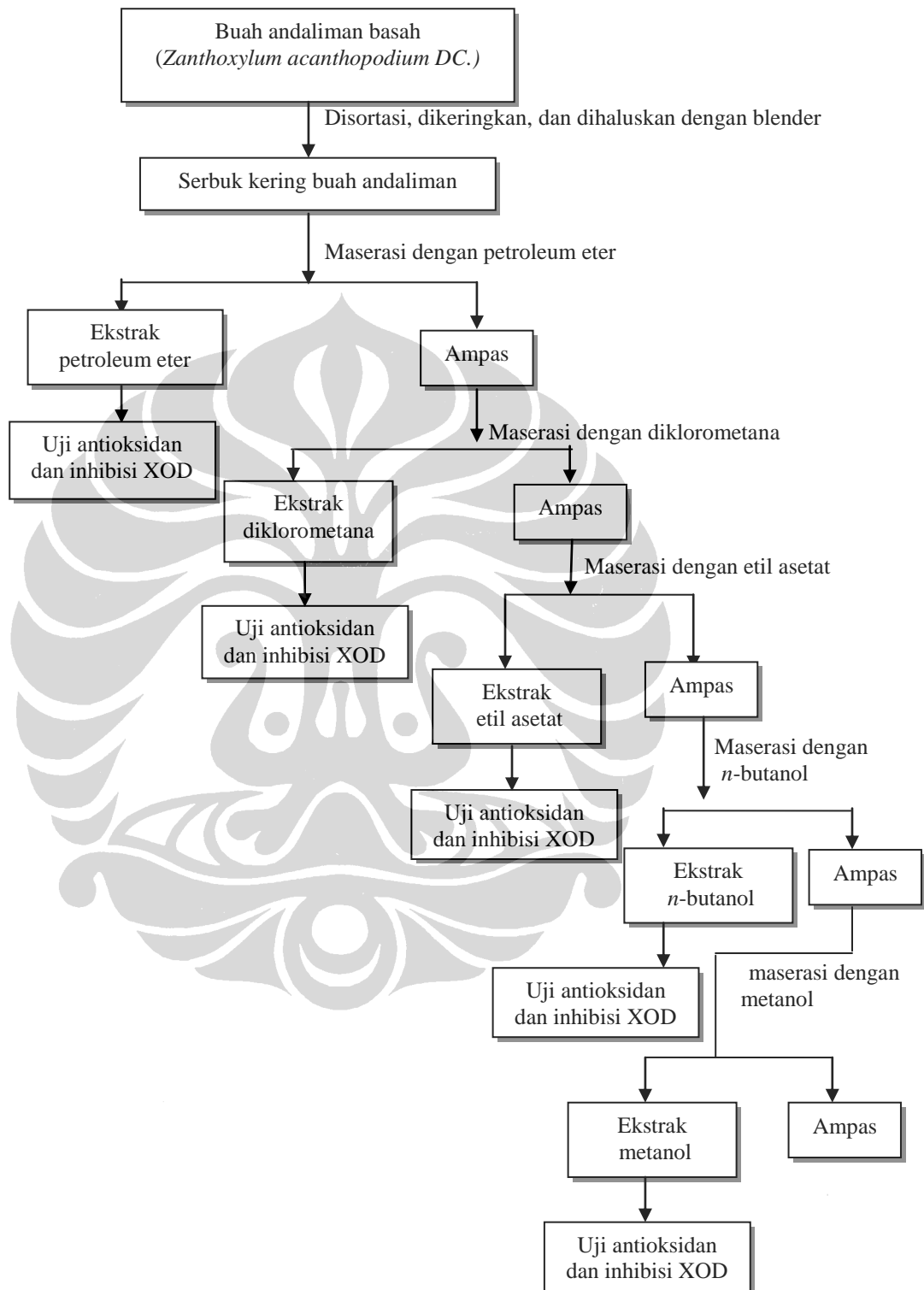


**Gambar 4.22** Hasil pengukuran GC-MS ZAB-1

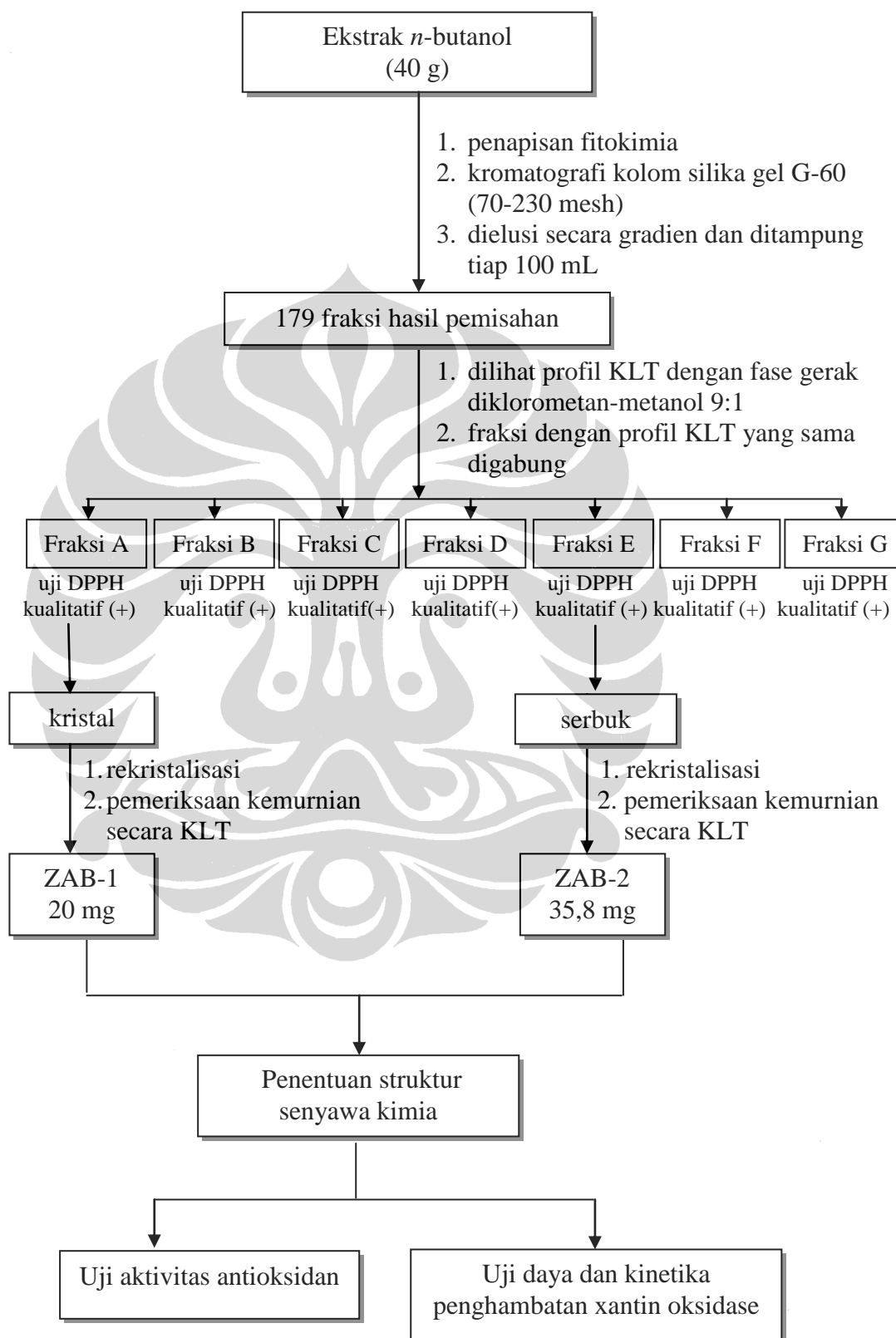


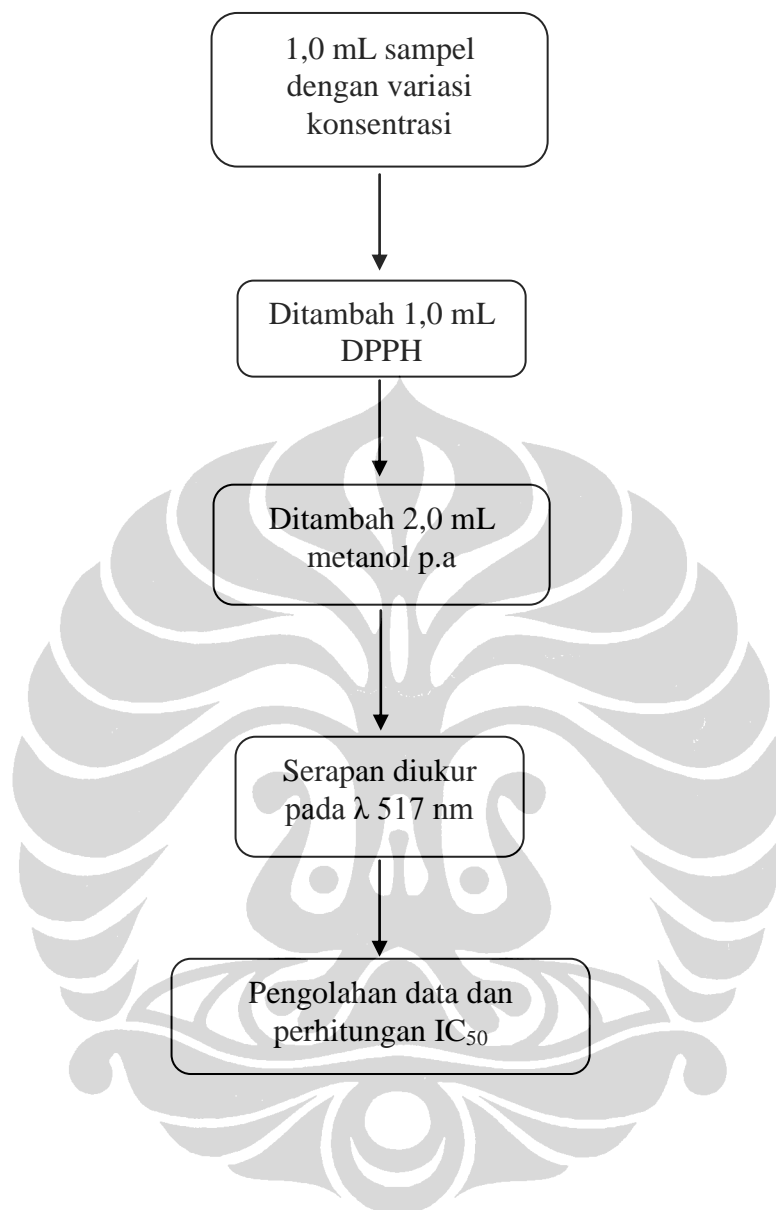
**Gambar 4.23** Hasil pengukuran GC-MS ZAB-2

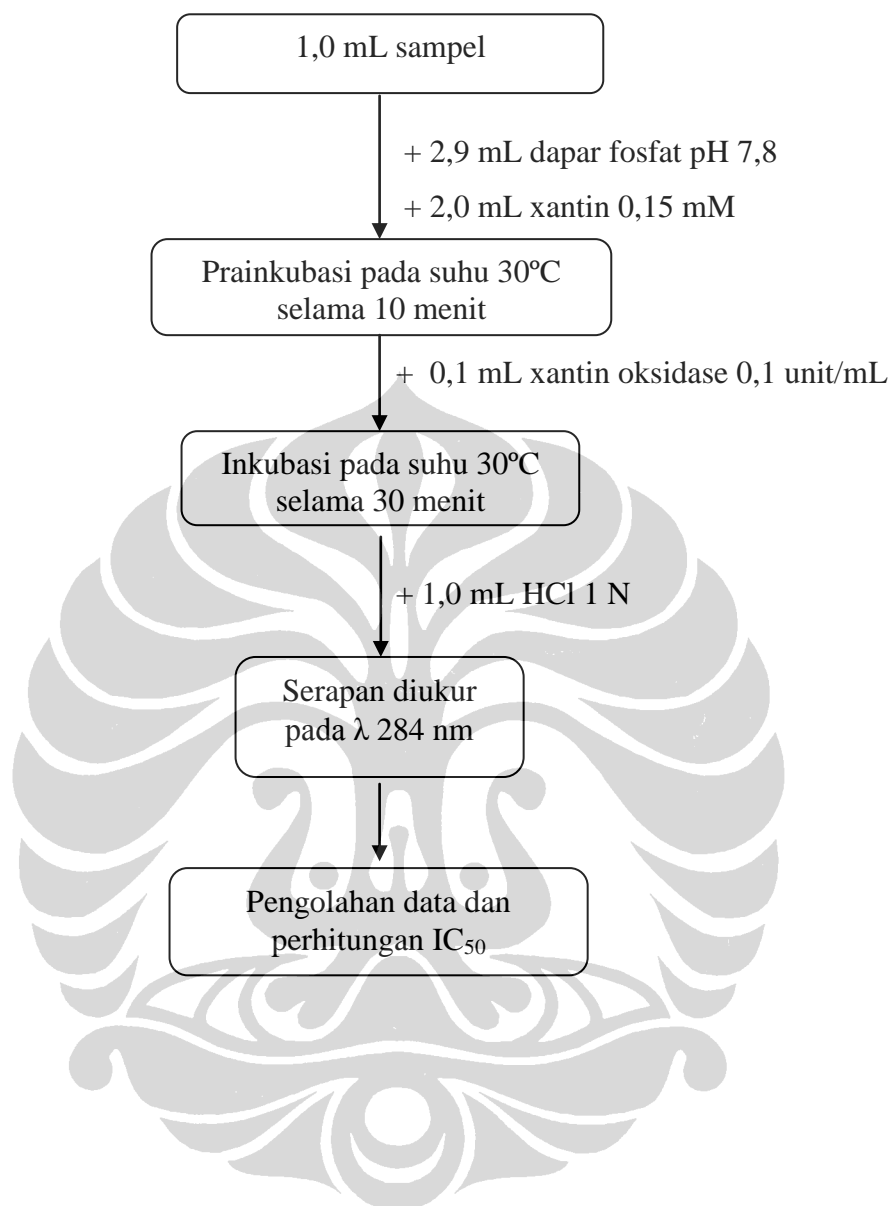
**Lampiran 1.** Skema kerja pembuatan ekstrak buah *Zanthoxylum acanthopodium* DC.



**Lampiran 2.** Skema kerja isolasi senyawa aktif dari ekstrak buah *Zanthoxylum acanthopodium* DC.



**Lampiran 3.** Skema kerja uji aktivitas antioksidan

**Lampiran 4.** Skema kerja uji penghambatan xantin oksidase

**Lampiran 5.** 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 unit xantin oksidase.

$$45,45 \text{ mg solid} \times 0,11 \text{ unit/mg solid} = 4,9995 \text{ unit}$$

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

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

$$1 \text{ mg protein} \approx 7,27 \text{ mg solid} \approx 0,8 \text{ unit}$$

- b. Pembuatan larutan enzim xantin oksidase 0,1 unit/ mL

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

$$\text{Dilarutkan dalam 10 mL} = 10 \text{ ml} \times 0,90875 \text{ mg} = 9,0875 \text{ mg} = 9,09 \text{ mg}$$

Ditimbang 9,09 mg enzim xantin oksidase kemudian dilarutkan dalam 10 mL dapar fosfat.



**Lampiran 6.** Perhitungan dan pembuatan larutan xantin

- a. Perhitungan larutan xantin

Xantin , BM = 152,1 (Sigma Aldrich)

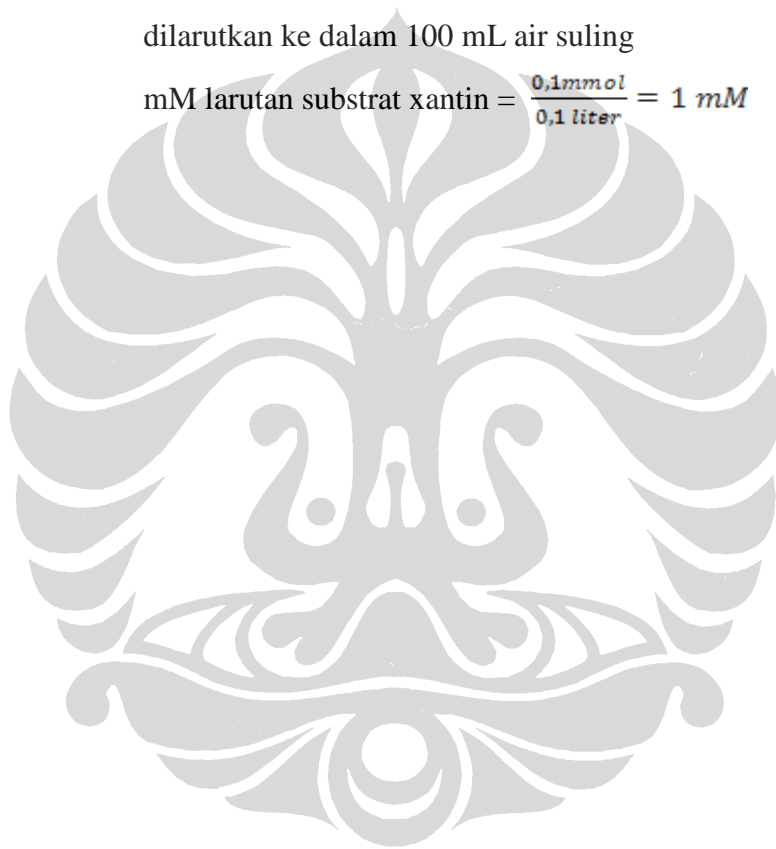
Substrat xantin yang ditimbang = 15,21 mg

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

- b. Pembuatan larutan xantin (larutan induk)

dilarutkan ke dalam 100 mL air suling

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



## Lampiran 7. 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

---

Nomor : **104/IPH.1.02/IL8/II/2011**  
 Lampiran :  
 Perihal : Hasil Identifikasi/determinasi Tumbuhan

Cibinong, 16 Februari 2011

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr(i), Ruth Elenora  
 Jl. Kayu Manis III Gg. K2 No. 4  
 Jakarta Timur  
 13130

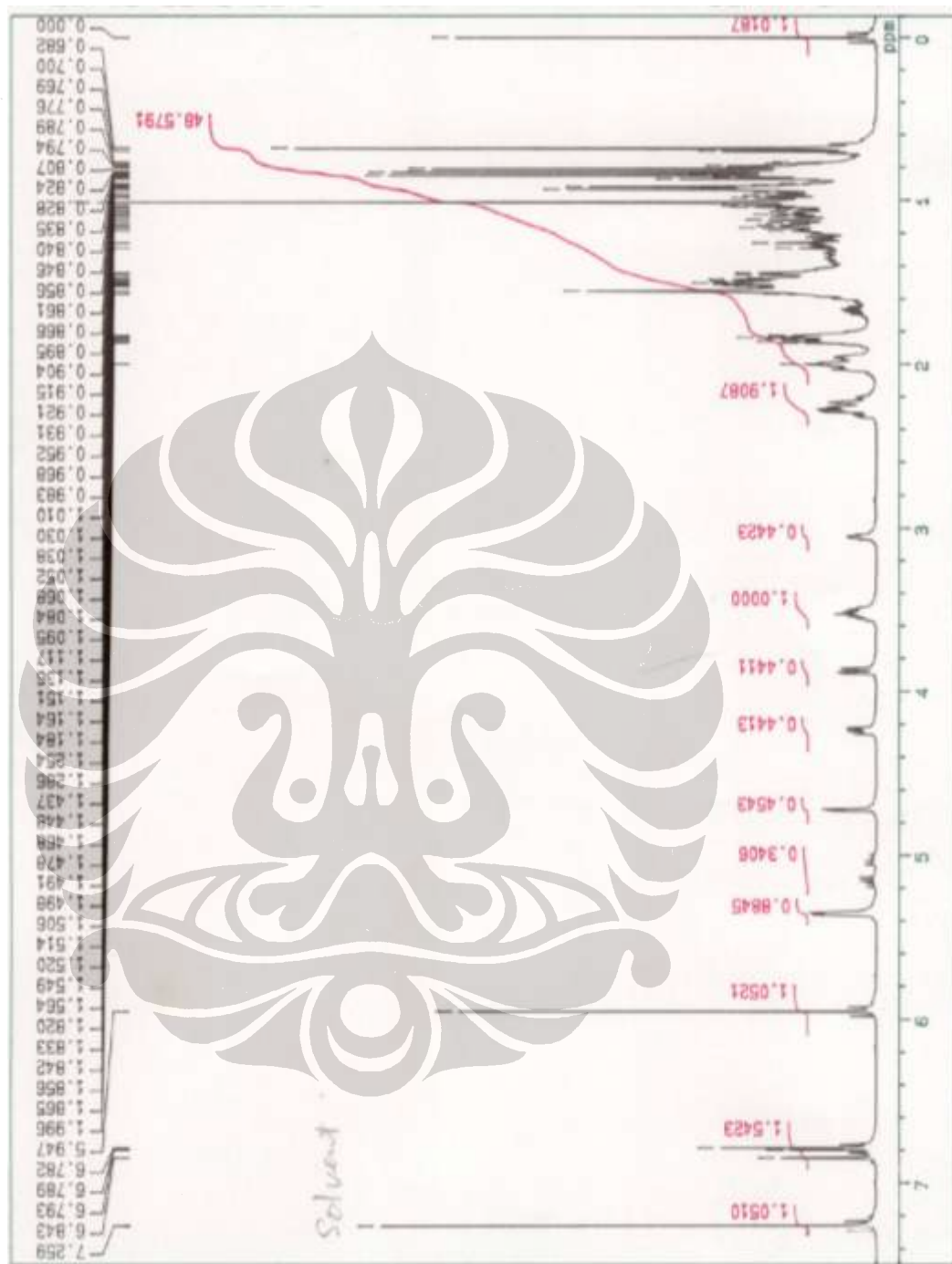
Dengan hormat,

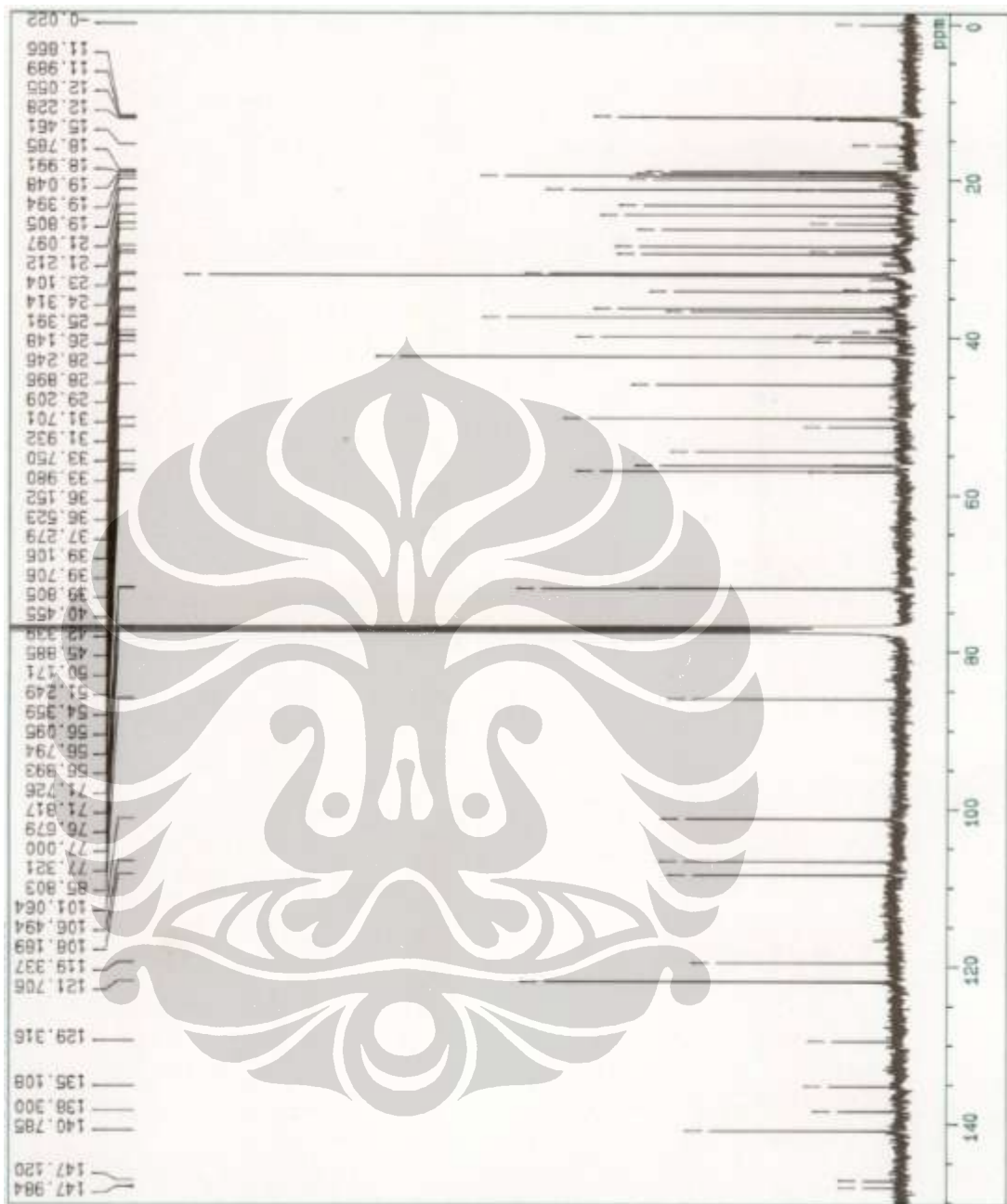
Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1.	Andaliman	<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC.	Rutaceae

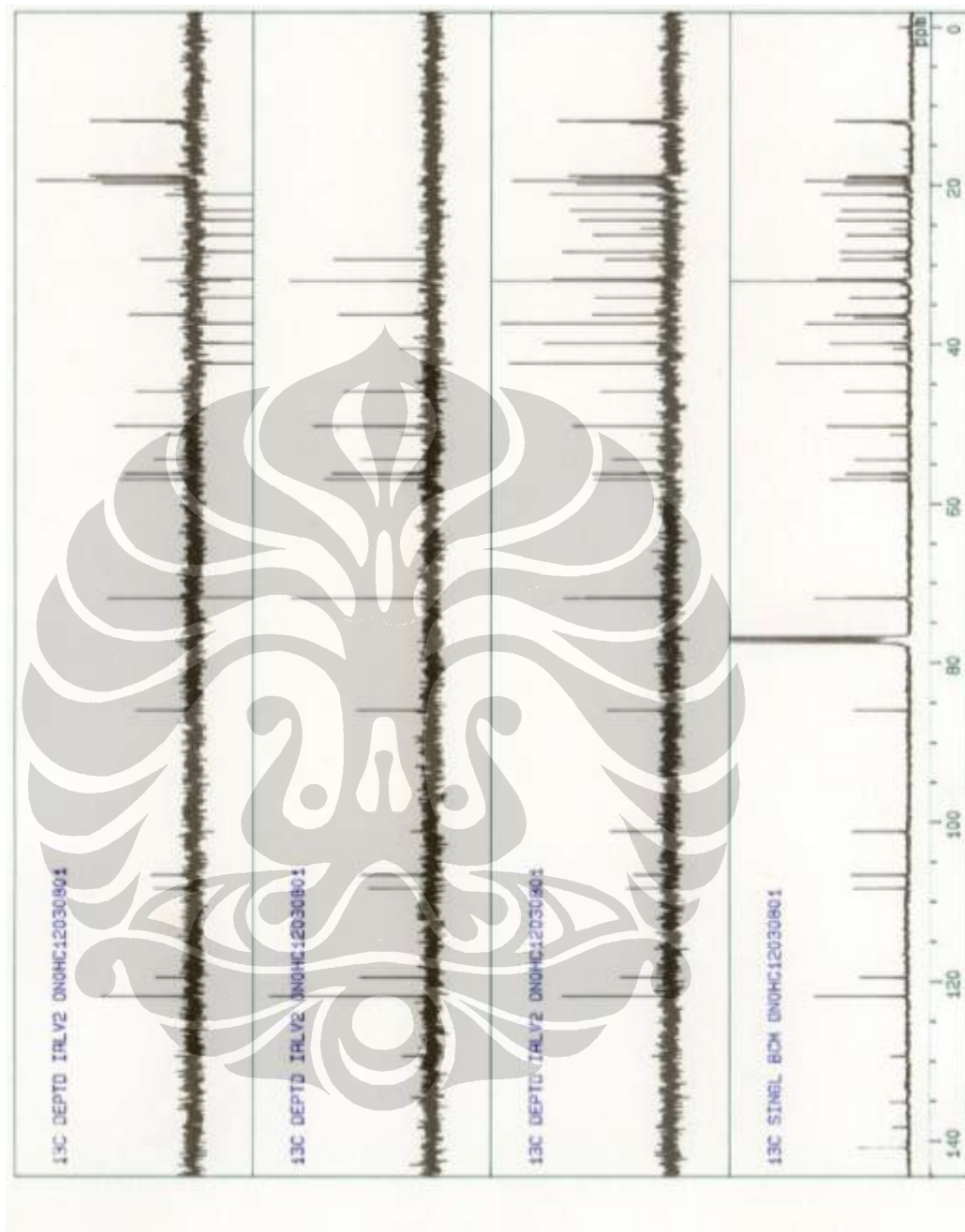
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

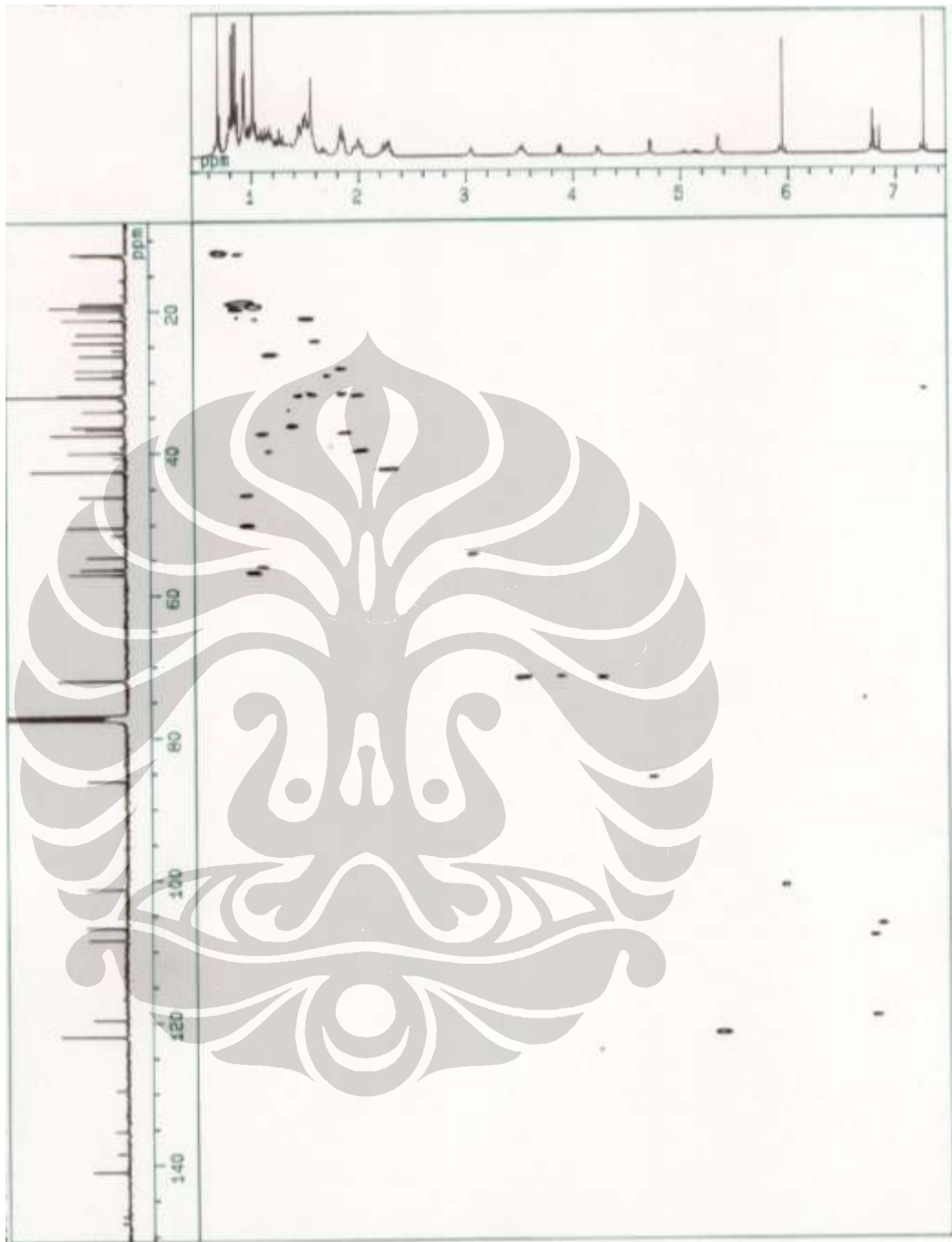
Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,  
  
 Prof. Dr. Eko Baroto Walujo  
 NIP. 195111041975011001

Lampiran 8. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  ZAB-1

Lampiran 9. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR ZAB-1

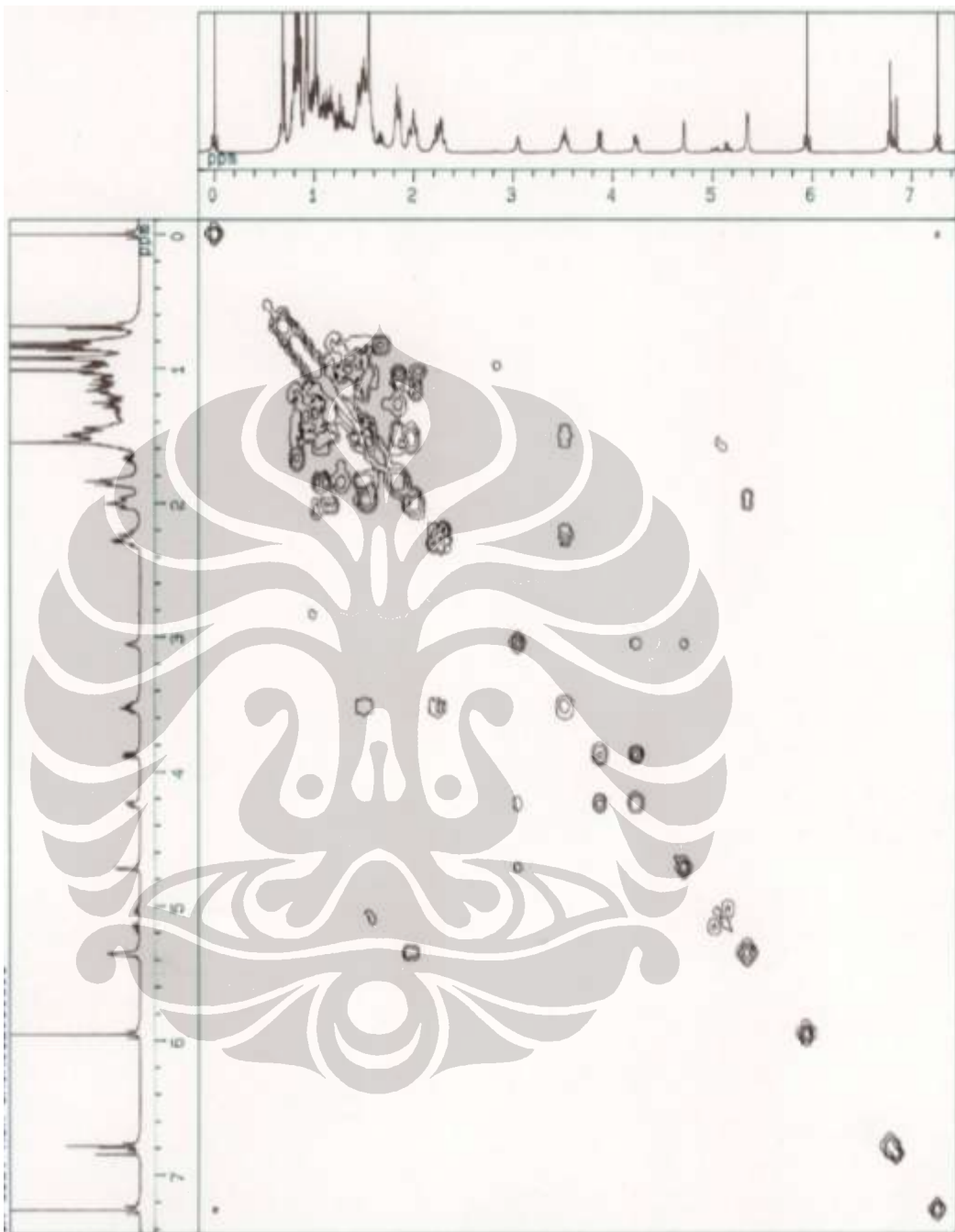
## Lampiran 10. Spektrum DEPT ZAB-1



**Lampiran 11. Spektrum CHSHF ZAB-1**



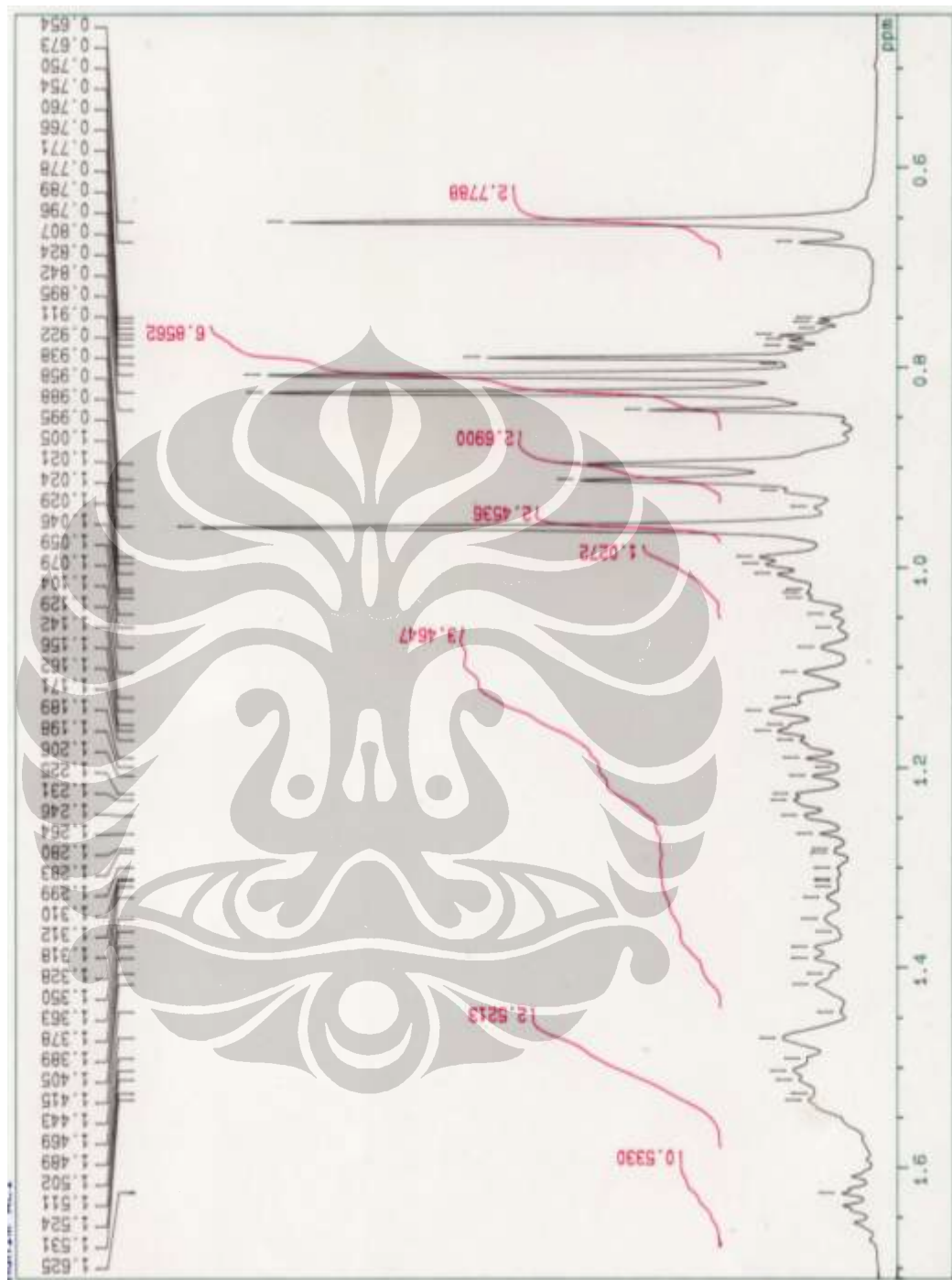
Lampiran 12. Spektrum  $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY ZAB-1

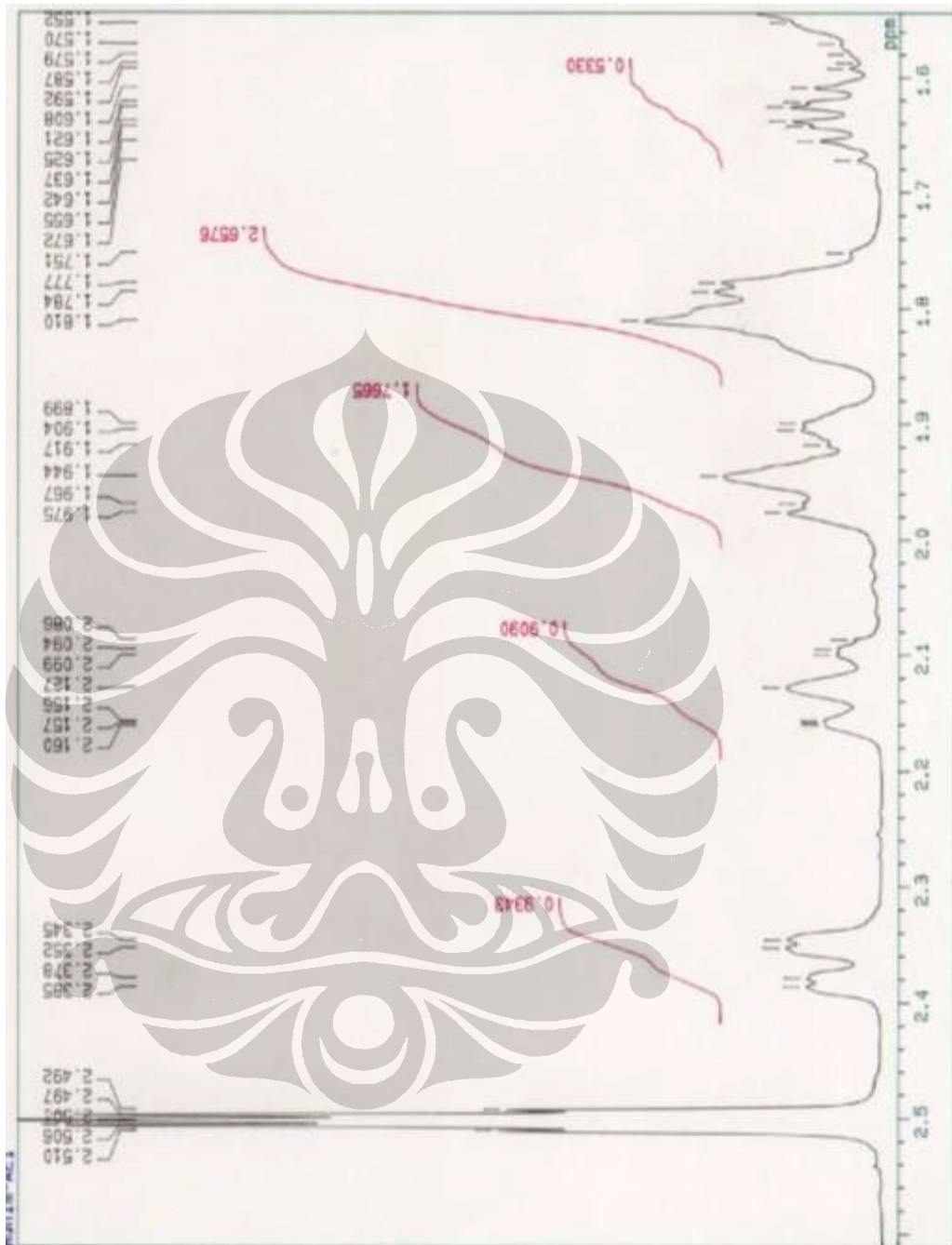


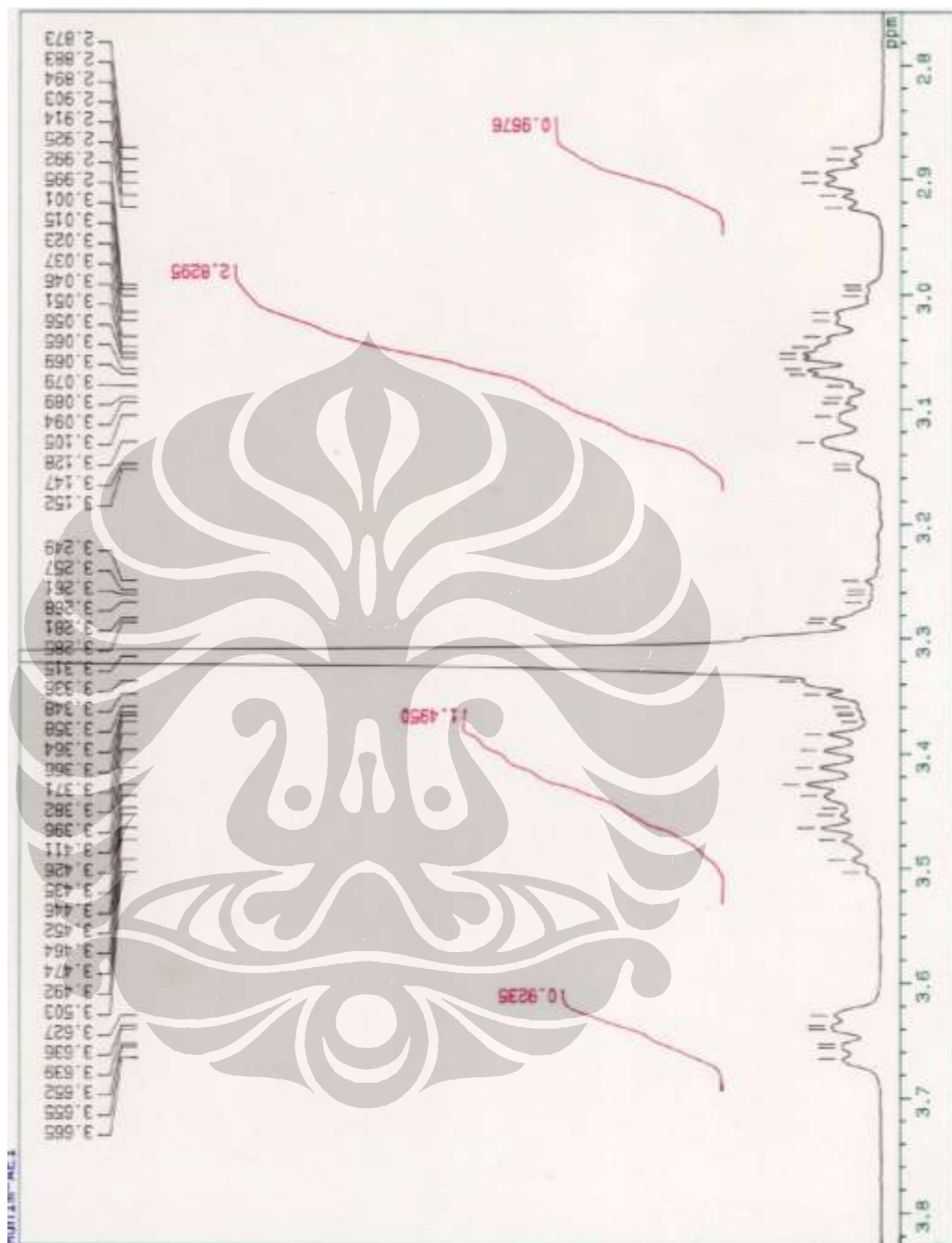
Lampiran 13. Spektrum HMBC ZAB-1

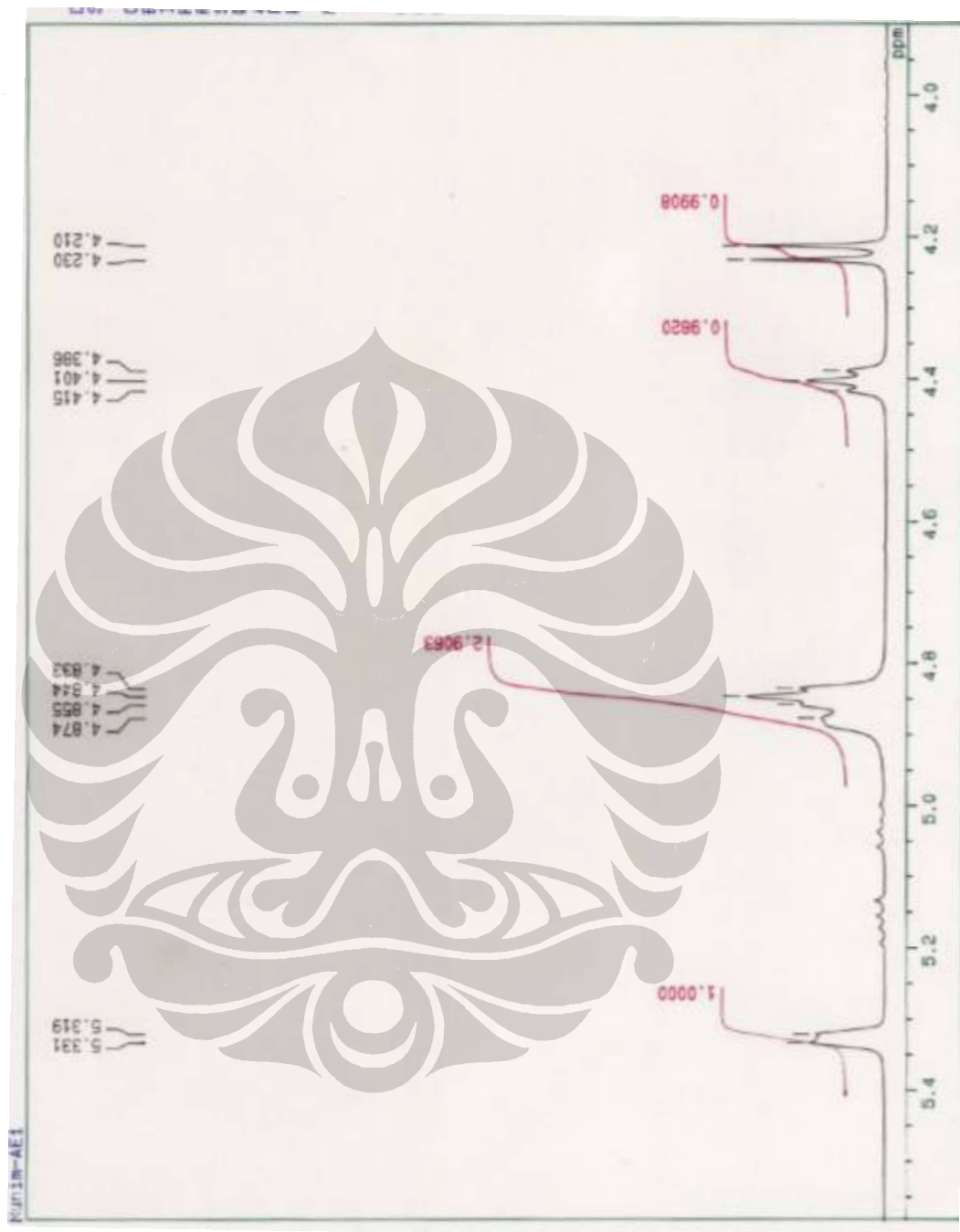


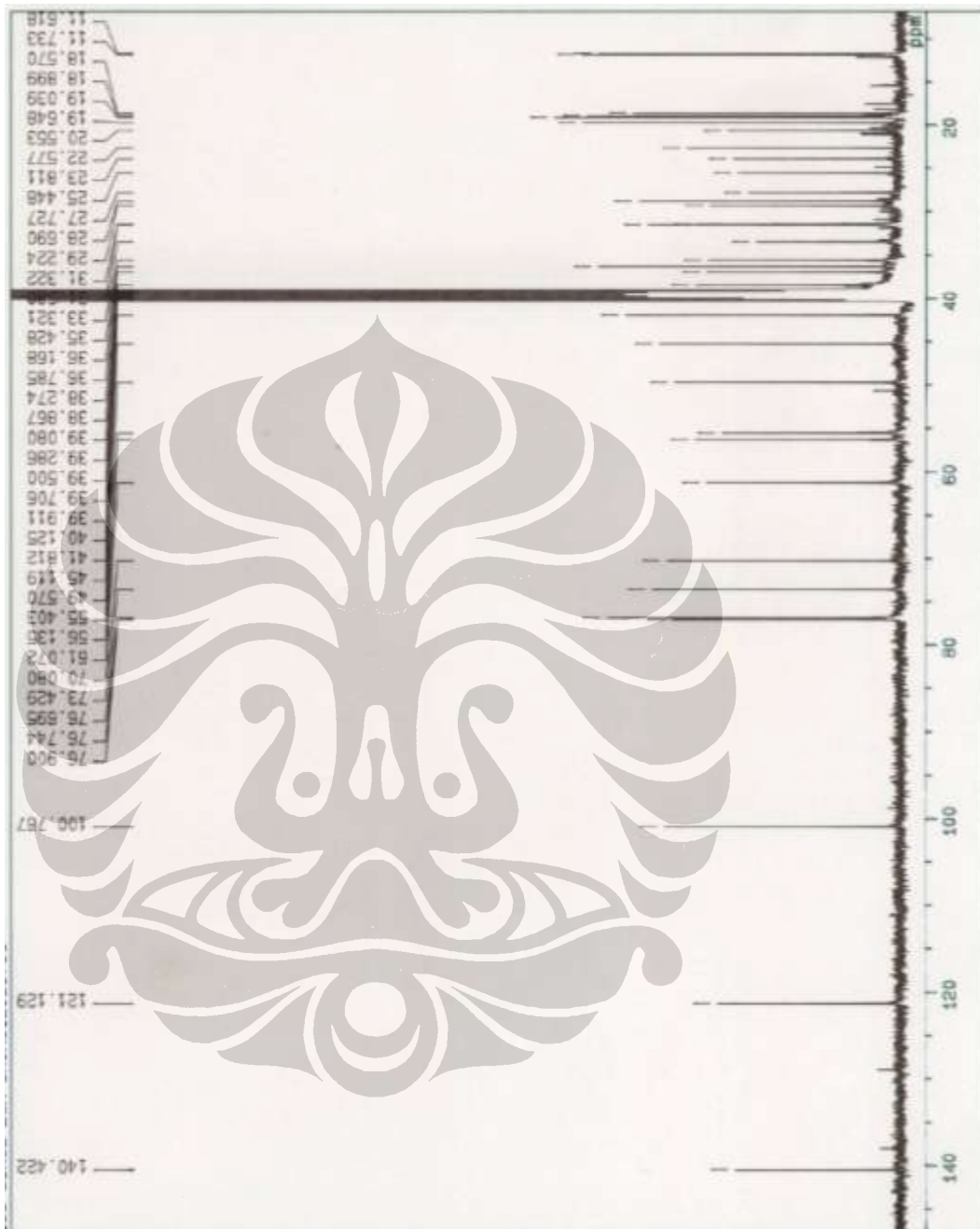


Lampiran 14. Spektrum Bagian Pertama  $^1\text{H-NMR}$  ZAB-2

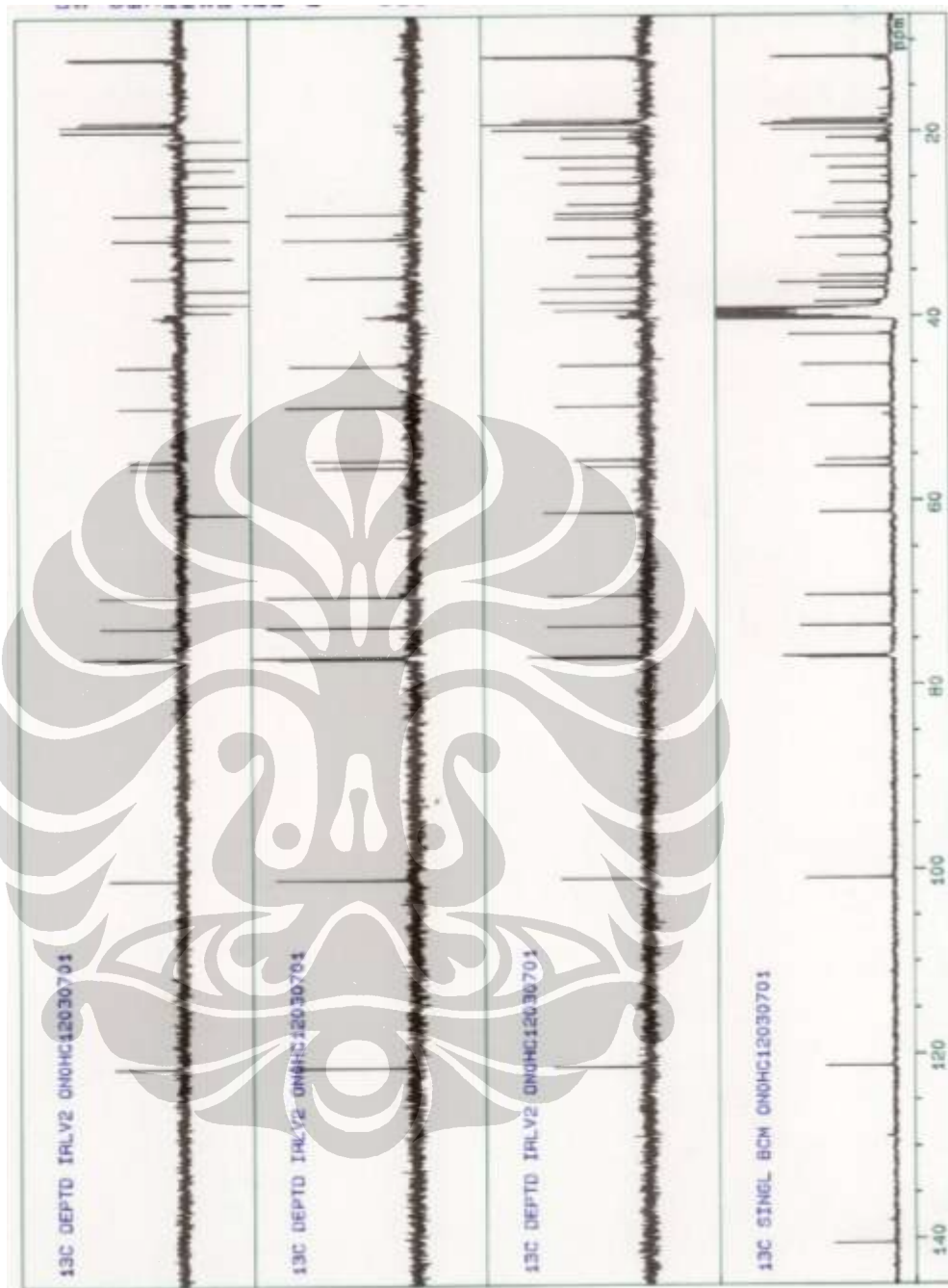
Lampiran 15. Spektrum bagian kedua  $^1\text{H-NMR}$  ZAB-2

Lampiran 16. Spektrum bagian ketiga  $^1\text{H-NMR}$  ZAB-2

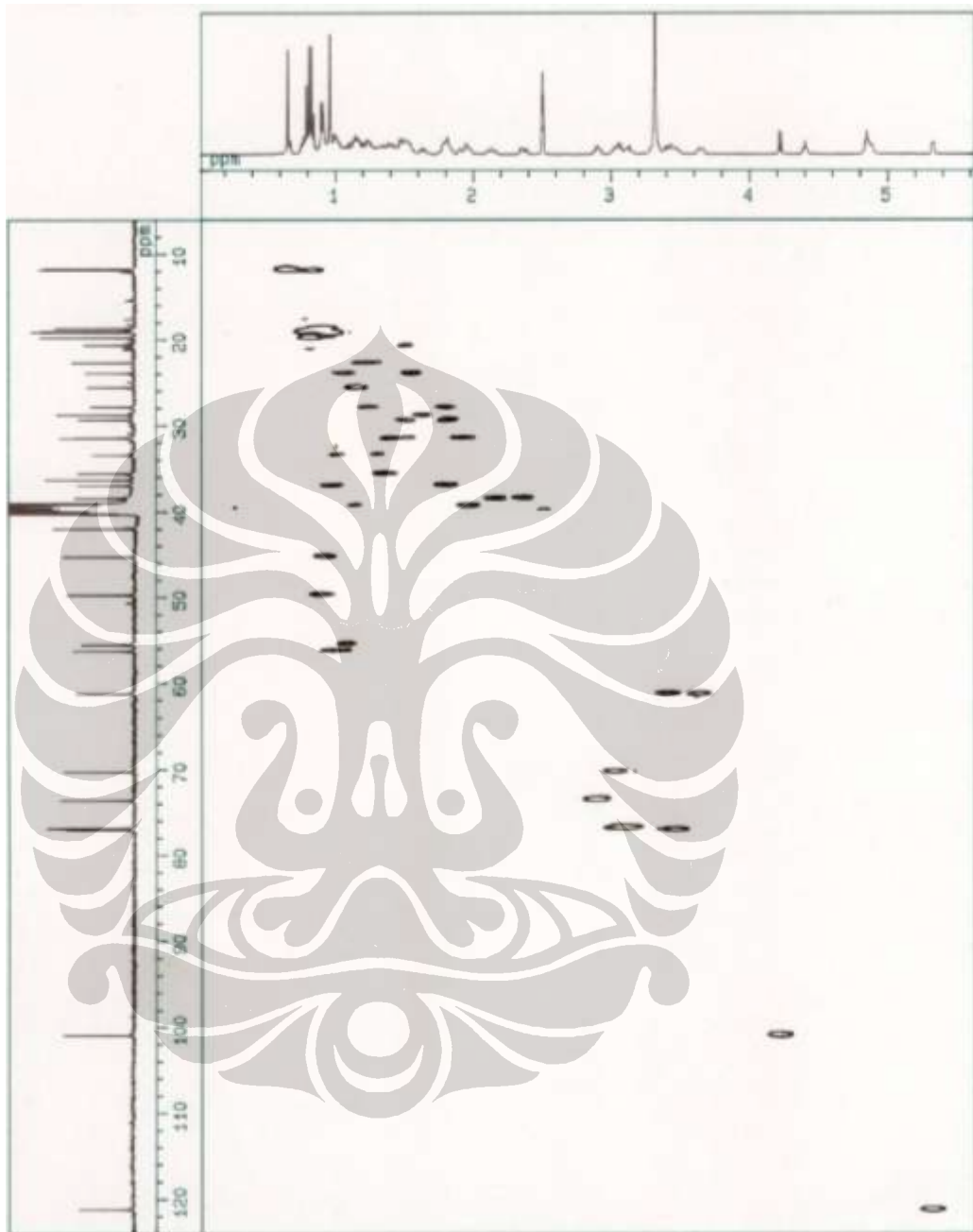
Lampiran 17. Spektrum bagian keempat  $^1\text{H-NMR}$  ZAB-2

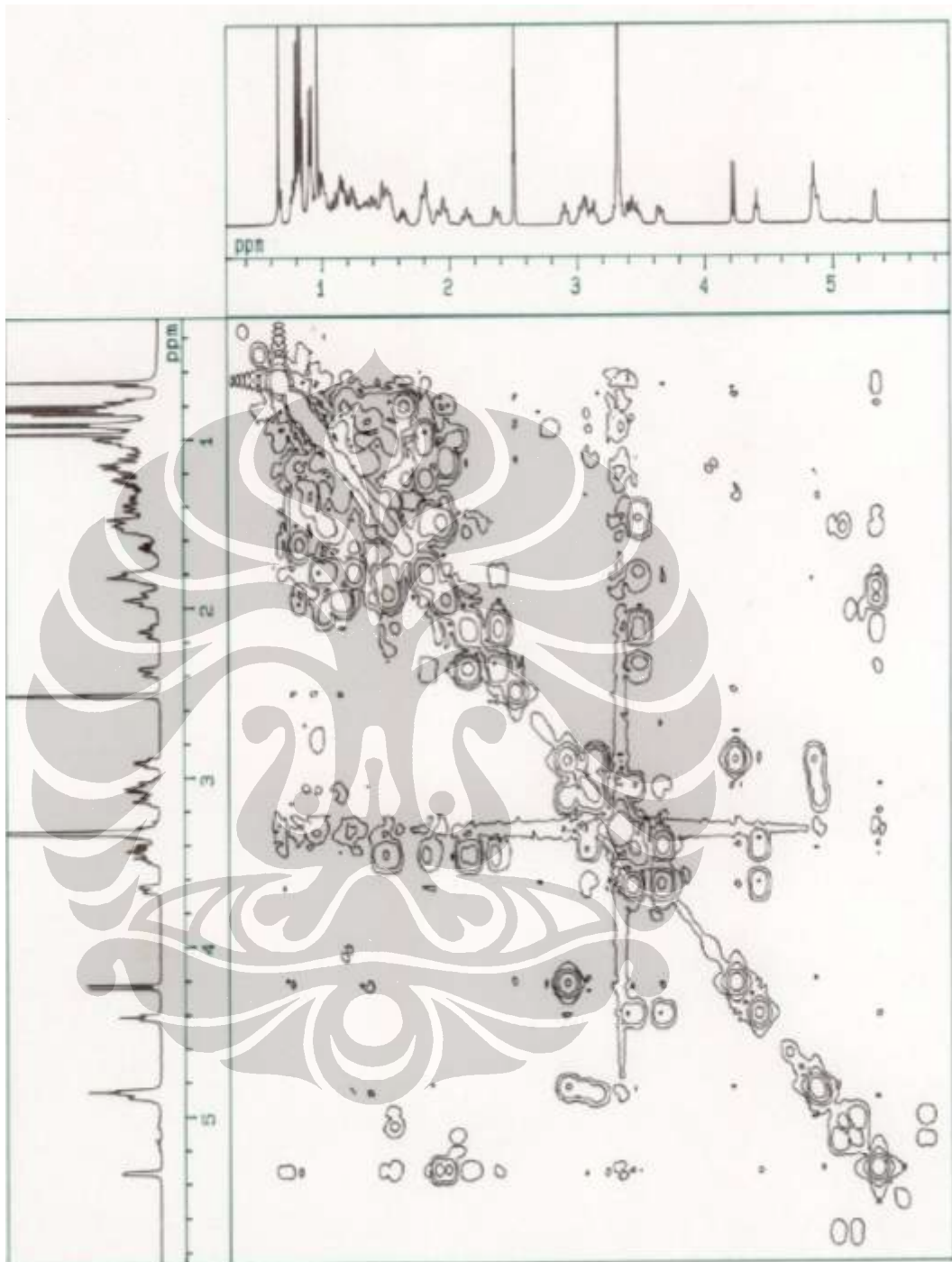
Lampiran 18. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR ZAB-2

Lampiran 19. Spektrum DEPT ZAB-2



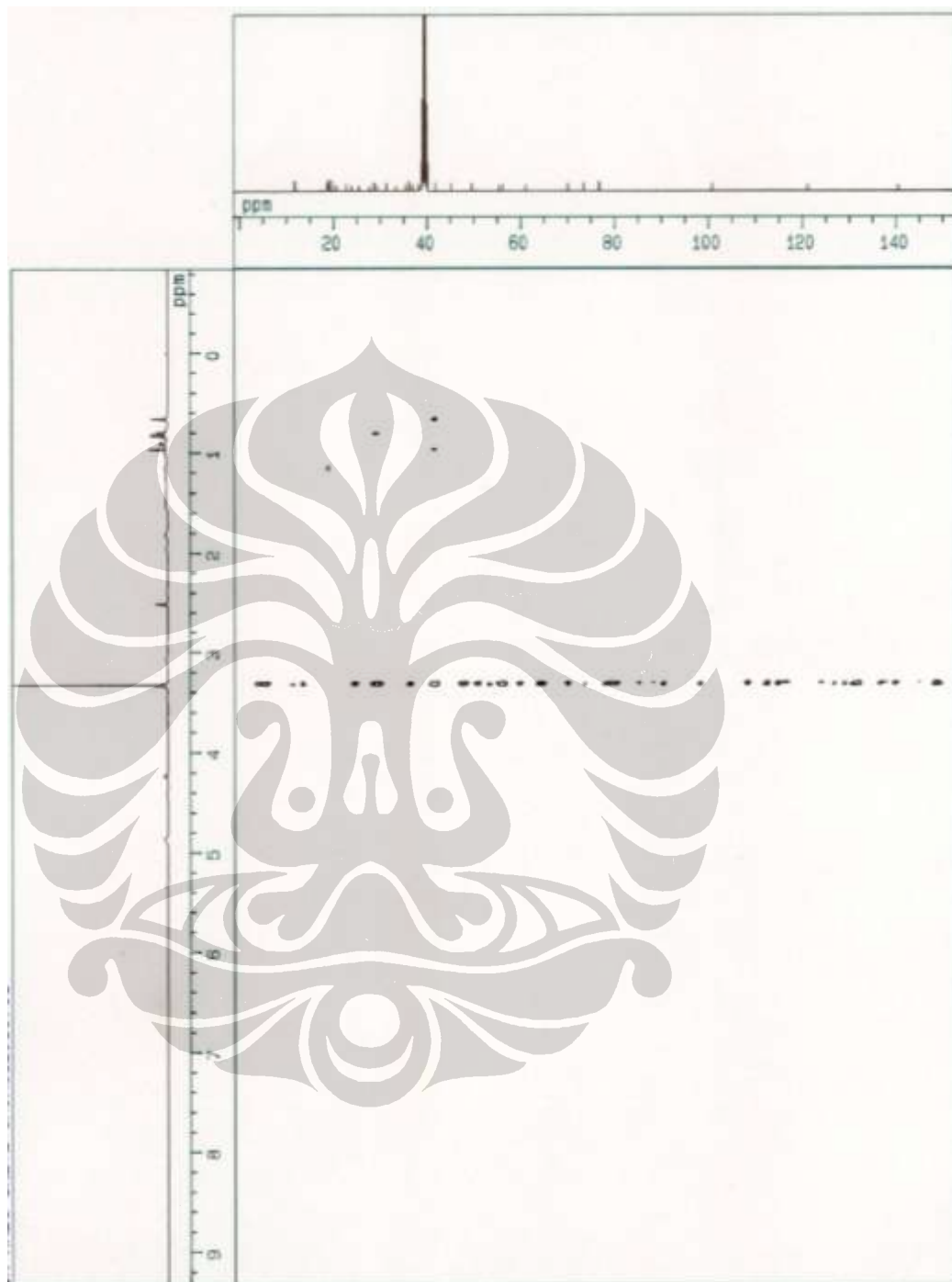


**Lampiran 20.** Spektrum CHSHF ZAB-2

Lampiran 21. Spektrum  $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY ZAB-2



## Lampiran 22. Spektrum HMBC ZAB-2



## Lampiran 23. Sertifikat analisis xantin oksidase

**SIGMA-ALDRICH**

sigmaaldrich.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 MILKProduct 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 Buret units/mg protein	10.0 - 25.0 % 0.4 - 1.0	14.1 % 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 Uricase	≤ 0.2 %	0.2 %
Recommended Retest Period 2 years		


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

## Lampiran 24. Sertifikat analisis xantin

**SIGMA-ALDRICH**

sigma-aldrich.co

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<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
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)	Clear	Clear
0.1 M solution in 1 M NaOH		
Residue on Ignition	Pass	Pass
< or = 0.1%		
Aluminum (Al)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Phosphorus (P)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Lead (Pb)	Pass	Pass
< or = 0.001%		
Calcium (Ca)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Magnesium (Mg)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Sodium (Na)	Pass	Pass
< or = 0.005%		
Iron (Fe)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		
Copper (Cu)	Pass	Pass
< or = 0.0005%		

(lanjutan)

**SIGMA-ALDRICH**

sigmaaldrich.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 Number: X4002  
 Lot Number: 077K53071V

Test	Specification	Result
Zinc (Zn) < or = 0.0005%	Pass	Pass
Potassium (K) < or = 0.005%	Pass	Pass
Ammonia Content < or = 0.05%	Pass	Pass
Purity (HPLC)	≥ 99 %	100 %
Insoluble Matter < or = 0.1%	Pass	Pass
Sulfate < or = 0.05%	Pass	Pass
Recommended Retest Period 4 years		



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

## Lampiran 25. Sertifikat analisis alopurinol

## 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 solution Y6 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	≥ 5% < 50 μm	Complies
12.0	DENSITY OF SLOP	0.3 +/- 0.05 g/ml	Complies
13.0	DENSITY OF STAMPED	0.40 +/- 0.05 g/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 conforms to USP28/BP2003 Specification with respect to above tests