

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian yang dilakukan oleh Iswantini *et al.*, (2012), melaporkan bahwa fraksi 4 dan fraksi 5 dari ekstrak etanol herba seledri merupakan golongan flavonoid yang mempunyai daya inhibisi tertinggi pada konsentrasi 200 ppm yaitu fraksi 4 (88,62%) diikuti oleh fraksi 5 (85,44%). Penelitian yang dilakukan oleh Septianingsih *et al.*, (2012) melaporkan bahwa ekstrak etanol akar sambiloto yang diduga mengandung flavonoid golongan flavon atau flavonol menghambat aktivitas xanthine oksidase dengan  $IC_{50}$  16,82  $\mu\text{g/ml}$  sedangkan  $IC_{50}$  allopurinol adalah 4,29  $\mu\text{g/ml}$ . Pada penelitian lain yang dilakukan Desmiaty *et al.*, (2015), melaporkan bahwa kandungan senyawa kuersetin pada daun beluntas (5,0686%) memiliki aktivitas sebagai penghambat enzim xantin oksidase dengan nilai  $IC_{50}$  15,8108 bpj dan kandungan senyawa kuersetin pada daun jambu biji (4,0798%) memiliki nilai  $IC_{50}$  17,9054 bpj. Dari penelitian-penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa flavonoid mempunyai aktivitas sebagai penghambat aktivitas xantin oksidase.

Penelitian mengenai aktivitas inhibitor xantin oksidase dari tanaman rambutan yang telah dilakukan oleh Putri *et al.*, (2016), melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit buah rambutan memiliki daya hambat terhadap enzim xantin oksidase dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 3,71 ppm dan allopurinol sebagai kontrol positif memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 0,15  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai  $IC_{50}$  yang kecil dapat disebabkan oleh senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid, tanin, dan fenol yang terkandung dalam ekstrak. Penapisan fitokimia pada ekstrak teraktif menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit buah rambutan mengandung flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa salah satu bagian dari tanaman rambutan yaitu kulit buah rambutan memiliki aktivitas sebagai inhibitor xantin oksidase yang memiliki nilai  $IC_{50}$  tidak jauh berbeda dengan nilai  $IC_{50}$  allopurinol.

Pada penelitian ini, peneliti menguji aktivitas inhibitor xantin oksidase ekstrak etanol, fraksi diklorometana, dan fraksi etil asetat dari daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) serta mengidentifikasi senyawa flavonoidnya. Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yaitu peneliti menggunakan ekstrak etanol, dan fraksi-fraksi dari daun rambutan untuk diuji aktivitasnya sebagai inhibitor xantin oksidase. Persamaannya adalah penelitian dilakukan secara in vitro dan pembuktian aktivitas inhibitor xantin oksidase pada daun rambutan yang diduga mengandung flavonoid.

## B. Landasan Teori

### 1. Rambutan

#### a. Klasifikasi

Klasifikasi dan tata nama Rambutan sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Subdivisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledone  
Ordo : Sapindales  
Famili : Sapindaceae  
Genus : *Nephelium*  
Spesies : *Nephelium lappaceum* L. (Rukmana *et al.*, 2002)

#### b. Nama Lokal

Rambutan mempunyai nama daerah antara lain rambot (Aceh); rambuteun (Gayo); rambutan dan jailan (Batak); rambutan dan rambut (Simalur); folui dan rambuta (Nias); bairabit (Mentawai); rambutan, rambutang, sêkapas, sokapas (Ind.); rambutan (Minangkabau); puru biancak (Kubu); hahujam, kakapas, likis, rambuta, takujung alu (Lampung); siban (Kalimantan Barat); banamon (Kalimantan Tenggara); rambutan, corogol, dan tundun (Sunda); rambutan (Jawa); rambuta (Bima); rambuta (Gorontalo); rambusa (Buol); walatu,

wayatu, wilatu (Toraja); balatu dan balatung (Makassar); rambuta (Ternate) (Heyne, 1987).

c. Morfologi Rambutan

Pohon berkayu, batang silindris, permukaan batang kasar, bewarna coklat dengan bercak-bercak putih. Daun majemuk menyirip ganda sempurna sampai enam pasang anak daun, anak daun berbentuk bulat telur sampai bulat telur sungsang, panjang 5-28 cm dan lebar 2-10 cm, permukaan atas halus sedangkan permukaan bawah berambut, ujung daun meruncing. Perbungaan majemuk terminal, tersusun dalam karangan, diameter bunga mencapai 5 mm. Buah terbungkus kulit yang memiliki rambut di bagian luarnya, warnanya hijau ketika masih muda, berubah menjadi kuning hingga merah ketika masak. Endokarp berwarna putih, menutupi daging yang sebenarnya merupakan aril, yang melekat pada kulit terluar biji (Hidayat & Napitupulu, 2015).

d. Kandungan Kimia

Daun rambutan mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin (Ulfah, 2016). Kulit rambutan mengandung flavonoid, tanin, saponin, terpenoid (Putri *et al.*, 2016). Biji rambutan mempunyai senyawa metabolit sekunder fenol, flavonoid dan tanin (Yuda *et al.*, 2015). Kulit batang rambutan mengandung terpenoid, flavonoid dan saponin (Rasyidi *et al.*, 2015).

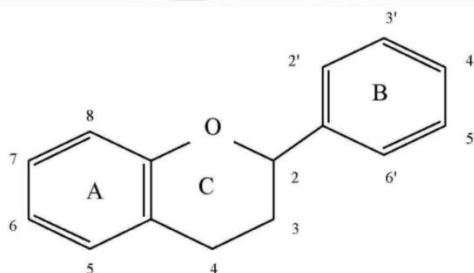
e. Manfaat

Rambutan selain menjadi tanaman konsumsi mempunyai manfaat lain yaitu sebagai tanaman obat. Bagian dari rambutan yang dapat digunakan yaitu kulit kayu, daun, kulit buah dan biji. Manfaat dari bagian-bagian rambutan yaitu kulit kayu sebagai obat sariawan, daun sebagai perawatan rambut dan untuk tapal sebagai obat pusing kepala, buah sebagai obat sakit perut dan cacingan, akarnya diseduh untuk obat demam (Verheij, 1997).

## 2. Flavonoid

Flavonoid, turunan 1,3-difenilpropan, merupakan sekelompok produk alami yang luas dan tersebar dalam tanaman tingkat tinggi. Kelompok senyawa ini juga ditemukan dalam tanaman tingkat rendah seperti algae. Kebanyakan flavonoid merupakan senyawa berwarna kuning, dan berperan pada warna kuning bunga dan buah, yang mana flavonoid ini berada sebagai glikosid (Satyajit, 2009). Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mana pun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida (Harborne, 1987).

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6 yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Aglikon flavonoid merupakan polifenol yang mempunyai sifat kimia yang sama seperti senyawa fenol yaitu memiliki sifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Tetapi harus diingat bila dibiarkan dalam larutan basa dan disamping itu terdapat oksigen maka banyak zat yang akan terurai, karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, flavonoid merupakan senyawa polar maka larut dalam pelarut polar seperti etanol (EtOH), metanol (MeOH), butanol (BuOH), aseton, air, dimetilsulfonamida (DMF), dimetilsulfoksida (DMSO), dan lain-lain (Markham, 1988).



Gambar 2. 1. Struktur flavonoid (Markham, 1988)

Kebanyakan flavonoid merupakan senyawa antioksidan yang poten. Beberapa flavonoid mempunyai sifat anti-inflamasi, anti-hepatotoksik, anti-tumor, anti-mikrobia, dan anti-virus. Beberapa obat tradisional dan tanaman obat mengandung flavonoid sebagai senyawa bioaktif. Sifat antioksidan flavonoid yang ada pada buah-buahan dan sayuran segar diduga berkontribusi pada kemampuannya untuk melindungi tubuh terhadap penyakit jantung dan penyakit kanker (Satyajit, 2009).

### **3. Simplisia**

Simplisia yaitu bahan alam yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga, kecuali dinyatakan lain, berupa bahan alam yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman. Eksudat tanaman adalah isi yang spontan keluar dari tanaman atau isi sel yang dikeluarkan dari selnya dengan cara tertentu atau zat yang dipisahkan dari tanamannya dengan cara tertentu yang masih belum berupa zat murni. (Depkes RI, 1979).

### **4. Ekstraksi dan Ekstrak**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut (Agoes, 2009). Salah satu metode ekstraksi yaitu maserasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia yang paling sederhana, menggunakan pelarut yang cocok dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Prinsip metode maserasi yaitu pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan (Depkes RI, 2000). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut

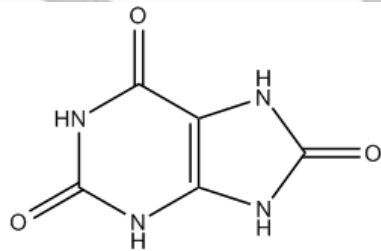
berulang sehingga terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Depkes RI, 1986).

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Syamsuni, 2006).

Ekstrak kental adalah ekstrak yang telah mengalami proses penguapan, dan tidak mengandung cairan penyari lagi, tetapi konsistensinya tetap cair pada suhu kamar (Depkes RI, 1979).

## 5. Asam Urat

Asam urat merupakan produk akhir metabolisme purin yang terdiri dari komponen karbon, nitrogen, oksigen dan hidrogen dengan rumus molekul  $C_5H_4N_4O_3$ . Pada pH alkali kuat, asam urat membentuk ion urat dua kali lebih banyak daripada pH asam (Dianati, 2015). Diduga metabolit purin diangkut ke hati, lalu mengalami oksidasi menjadi asam urat. Kelebihan asam urat dibuang melalui ginjal dan usus (Misnadiarly, 2007).



**Gambar 2. 2. Struktur asam urat (Kostić *et al.*, 2015)**

Ada dua sumber utama purin, yaitu purin yang diproduksi sendiri oleh tubuh dan purin yang didapatkan dari asupan makanan, atau makanan dari sel hidup, seperti tanaman (sayur, buah, dan kacang-kacangan) atau hewan (daging, jeroan, dan ikan sarden). Purin yang berasal dari makanan merupakan hasil pemecahan nukleoprotein makanan yang

dilakukan oleh dinding saluran cerna, sehingga mengonsumsi makanan tinggi purin, akan meningkatkan kadar asam urat darah (Noviyanti, 2015).

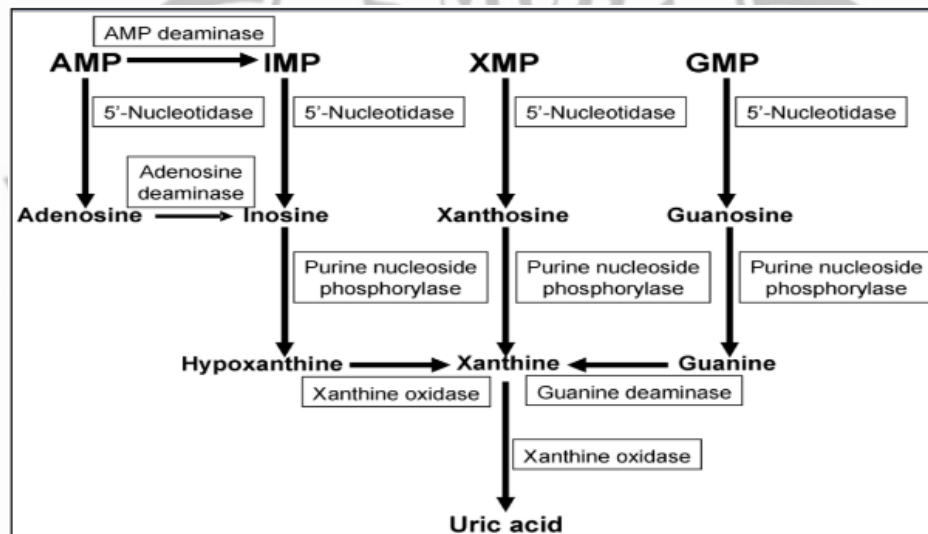
Kadar normal asam urat pada wanita adalah 6,0 mg/dl dan pria 7,0 mg/dl. Setelah pubertas, pada pria kadarnya meningkat secara bertahap dan dapat mencapai 5,2 mg/dl. Pada perempuan, kadar asam urat biasanya tetap rendah, baru pada usia pramenopause kadarnya meningkat mendekati kadar pada laki-laki, bisa mencapai 4,7 mg/dl (Misnadiarly, 2007).

Dalam tubuh manusia terdapat enzim asam urat oksidase atau urikase yang akan mengoksidasi asam urat menjadi allantoin. Defisiensi urikase pada manusia akan mengakibatkan tingginya kadar asam urat dalam serum. Urat dikeluarkan di ginjal (70%) dan traktus gastrointestinal (30%). Kadar asam urat di darah tergantung pada keseimbangan produksi dan ekskresinya. Sintesis asam urat dimulai dari terbentuknya basa purin dari gugus ribosa, yaitu 5-phosphoribosyl-1-pirophosphat (PRPP) yang didapat dari ribose 5-fosfat yang disintesis dengan ATP (Adenosinetriphosphate) dan merupakan sumber gugus ribosa. Reaksi pertama, PRPP bereaksi dengan glutamin membentuk fosforibosilamin yang mempunyai sembilan cincin purin. Reaksi ini dikatalisis oleh PRPP glutamil amidotranferase, suatu enzim yang dihambat oleh produk nukleotida inosinemonophosphat (IMP), adenine monophosphat (AMP) dan guanine monophosphat (GMP). Ketiga nukleotida ini juga menghambat sintesis PRPP sehingga memperlambat produksi nukleotida purin dengan menurunkan kadar substrat PRPP (Dianati, 2015).

Inosine monophosphat (IMP) merupakan nukleotida purin pertama yang dibentuk dari gugus glisin dan mengandung basa hipoxanthine. Inosinemonophosphat berfungsi sebagai titik cabang dari nukleotida adenin dan guanin. Adenosinemonophosphat (AMP) berasal dari IMP melalui penambahan sebuah gugus amino aspartat ke karbon enam cincin purin dalam reaksi yang memerlukan GTP (Guanosine triphosphate).

Guanosinemonophosphat (GMP) berasal dari IMP melalui pemindahan satu gugus amino dari amino glutamin ke karbon dua cincin purin, reaksi ini membutuhkan ATP (Dianati, 2015).

Adenosine monophosphate mengalami deaminasi menjadi inosin, kemudian IMP dan GMP mengalami defosforilasi menjadi inosin dan guanosisin. Basa hipoxantin terbentuk dari IMP yang mengalami defosforilasi dan diubah oleh xantin oksidase menjadi xantin serta guanin akan mengalami deaminasi untuk menghasilkan xantin juga. Xantin akan diubah oleh xantin oksidase menjadi asam urat (Dianati, 2015).



Gambar 2. 3. Pembentukan asam urat (Ishikawa T, *et al.*,2013)

Asam urat sebenarnya memiliki fungsi dalam tubuh, yaitu sebagai antioksidan dan bermanfaat dalam regenerasi sel. Setiap peremajaan sel, tubuh memerlukan asam urat. Jika tubuh kekurangan asam urat sebagai antioksidan maka akan banyak oksidan atau radikal bebas yang dapat bisa membunuh sel-sel (Noviyanti, 2015).

## 6. Hiperurisemia

Hiperurisemia yaitu peningkatan kadar asam urat serum diatas nilai normal, pada pria lebih dari 7 mg/dl dan pada wanita lebih dari 6 mg/dl. Hiperurisemia disebabkan oleh dua faktor utama yaitu meningkatnya produksi asam urat dalam tubuh, hal ini disebabkan karena sintesis atau

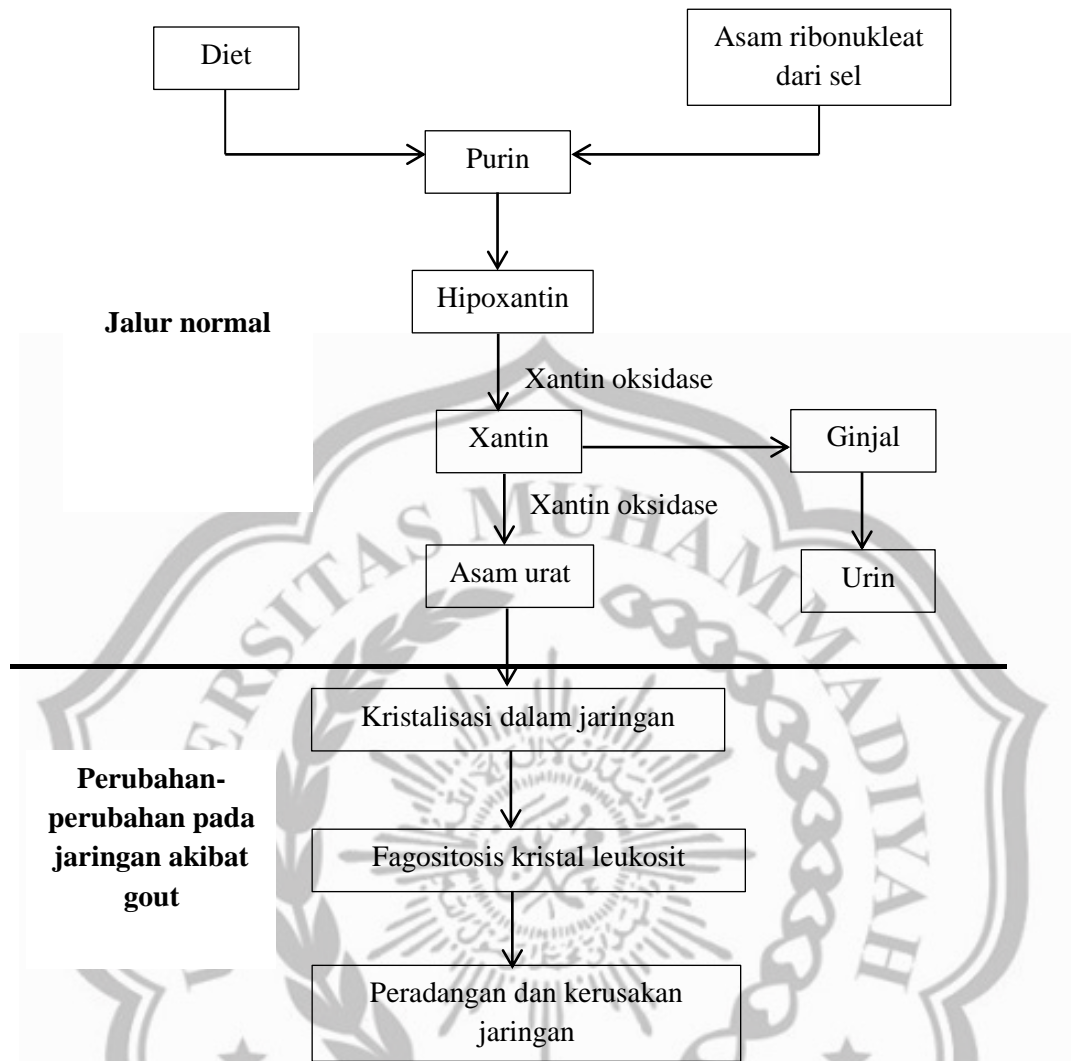
pembentukan asam urat yang berlebihan. Faktor yang kedua adalah pengeluaran asam urat melalui ginjal kurang (gout renal), gout renal primer disebabkan karena ekskresi asam urat di tubuli distal ginjal yang sehat, dan gout renal sekunder disebabkan ginjal yang rusak, misalnya pada glomerulonefritis kronis, kerusakan ginjal kronis (Dianati, 2015).

Terjadinya hiperurisemia disebabkan oleh :

- a. Adanya defek (kelainan) metabolik sehingga sintesis asam urat menjadi berlebihan dan bersifat abnormal. Peningkatan biosintesis asam urat tersebut terjadi karena adanya perubahan genetik sehingga mekanisme kontrol sintesis purin menjadi terganggu.
- b. Selain faktor genetik, proses biokimiawi juga ikut berperan pada penyakit hiperurisemia yang berhubungan dengan metabolisme purin ini. Karena itu hiperurisemia digolongkan sebagai penyakit gangguan metabolisme purin bawaan, sebagai akibat kekurangan enzim Hipoxantin-Guanin Phosfo Ribosil-Transferase (HGPRT) (Misnadiarly, 2007).

Secara umum darah manusia mampu menampung asam urat sampai tingkatan tertentu. Tetapi bila kadar asam urat plasma melebihi daya larutnya misal kadarnya lebih dari 7 mg/dl, maka plasma darah menjadi amat jenuh (hiperurisemia). Pada keadaan hiperurisemia ini, darah tidak mampu lagi menampung asam urat sehingga terjadi pengendapan kristal urat di berbagai organ seperti sendi dan ginjal (Misnadiarly, 2007).

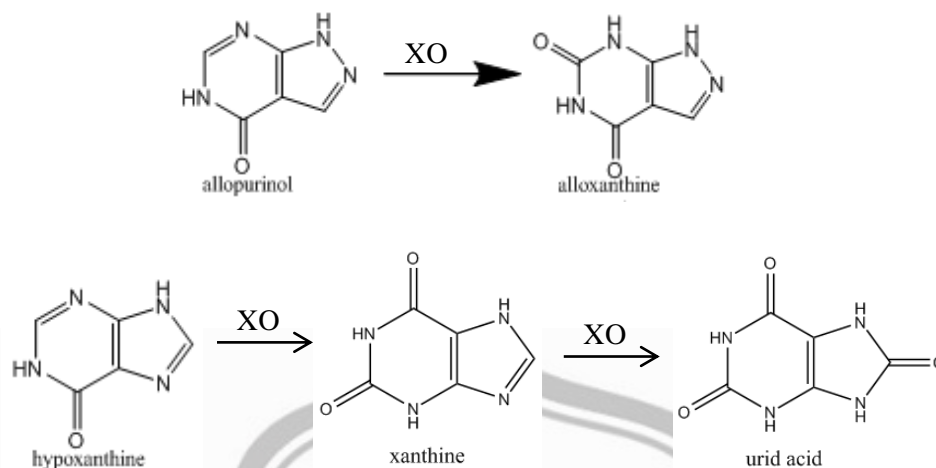
Tingginya kadar asam urat serum atau hiperurisemia bisa menimbulkan penyakit gout (penyakit akibat pengendapan kristal Mono Sodium Urat/MSU) di jaringan (Misnadiarly, 2007).



Gambar 2. 4. Patofisiologi gout (Price & Wilson, 2006)

## 7. Allopurinol

Terapi perawatan yang standar dan yang dianjurkan untuk gout adalah allopurinol, yang menurunkan kadar asam urat total dalam tubuh dengan menghambat xantin oksidase (Katzung, 2009).



**Gambar 2. 5. Penghambatan sintesis asam urat oleh allopurinol (Katzung, 2009)**

Sekitar 80% allopurinol diabsorpsi setelah pemberian per oral dan memiliki waktu paruh dalam serum sebesar 1-2 jam. Seperti asam urat, allopurinol sendiri dimetabolisme oleh xantin oksidase, tetapi senyawa hasilnya, yakni alloxantin, tetap memiliki kemampuan untuk menghambat xantin oksidase dan mempunyai durasi kerja yang cukup lama sehingga allopurinol cukup diberikan hanya sekali sehari (Katzung, 2009).

Purin dalam diet bukanlah sumber asam urat yang penting. Purin dalam jumlah yang penting secara kuantitatif dibentuk dari asam amino, format, dan karbondioksida dalam tubuh. Purin ribonukleotida tersebut, yang tidak bergabung ke dalam asam nukleat dan yang berasal dari degradasi asam nukleat, dikonversi menjadi xantin atau hipoxantin dan dioksidasi menjadi asam urat. Allopurinol menghambat langkah terakhir ini sehingga menyebabkan penurunan kadar urat dalam plasma dan penurunan kadar asam urat disertai dengan peningkatan xantin dan hipoxantin yang lebih larut (Katzung, 2009).

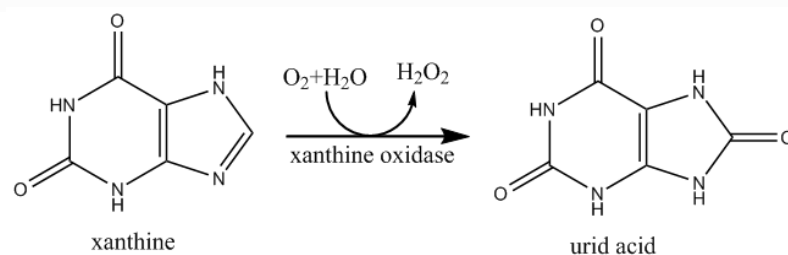
Tujuan pengobatan gout biasanya untuk meredakan nyeri dan inflamasi seragan akut, menghentikan serangan akut secepat mungkin, mencegah memburuknya serangan dan mencegah efek jangka panjang seperti kerusakan sendi dan kerusakan organ terkait misalnya ginjal, menurunkan kadar urat serum pada pasien simptomatis, menurunkan resiko batu asam urat, menurunkan pembentukan tophi (Lyrawati, 2008).

Obat yang menurunkan kadar asam urat serum (allopurinol dan obat urikosurik seperti probenesid dan sulfinpirazon) tidak boleh digunakan pada serangan akut. Pasien biasanya sudah mengalami hiperurisemia selama bertahun-tahun sehingga tidak perlu memberikan terapi segera untuk hiperurisemianya. Lagipula, obat-obat tersebut dapat menyebabkan mobilisasi simpanan asam urat ketika kadar asam urat dalam serum berkurang. Mobilisasi asam urat ini akan memperpanjang durasi serangan akut atau menyebabkan serangan arthritis lainnya. Namun, jika pasien sudah terstabilkan atau menggunakan allopurinol pada saat terjadi serangan akut, allopurinol tetap harus diberikan (Lyrawati, 2008).

## 8. Xantin oksidase

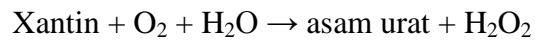
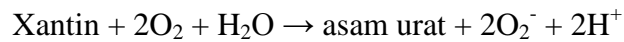
Xantin oksidase adalah enzim flavoprotein yang sangat serbaguna. Hidroksilasi purin dikatalisis oleh xantin oksidase dan terutama konversi xantin menjadi asam urat yang pada tingkat lebih banyak bertanggungjawab atas beberapa penyakit seperti asam urat, penyakit ginjal dan pembentukan batu dalam sistem saluran kemih (Mehta & Nayeem, 2014).

Di dalam tubuh, xantin oksidase ditemukan di sel hati dan otot. Xantin oksidase mengkatalisis oksidasi hipoxantin menjadi xantin dan xantin menjadi asam urat yang berperan penting pada penyakit gout. Pada saat bereaksi dengan xantin untuk membentuk asam urat, atom oksigen ditransfer dari molibdenum ke xantina (Yulian, 2014). Enzim ini mampu mengubah xantin menjadi asam urat melalui reaksi oksidasi seperti ditunjukkan oleh gambar 2.6.



Gambar 2. 6. Perubahan xantin menjadi asam urat (Yulian, 2014)

Selama reoksidasi xantin oksidase, molekul oksigen bertindak sebagai elektron aseptor, memproduksi superoksida radikal dan hidrogen peroksida. Reaksi ini dapat ditulis sebagai berikut (Mehta and Nayeem, 2014) :



## 9. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*). Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun (*descending*) (Gandjar & Rohman, 2007).

Fase diam pada KLT adalah penjerap yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya. Fase diam yang paling sering digunakan adalah silika dan serbuk selulosa (Gandjar & Rohman, 2007).

Pada saat pengembangan perlu diperhatikan bahwa bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin (tetapi harus cukup untuk mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang ditentukan). Jika fase gerak telah mencapai ujung atau batas atas pada lempeng maka KLT fase gerak telah jenuh. Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk

menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet (Gandjar & Rohman, 2007).

Menguapi kromatogram yang sudah betul-betul kering dengan uap  $\text{NH}_3$  (dari botol yang berisi  $\text{NH}_4\text{OH}$  0,88: $\text{H}_2\text{O}$ , 1;1) umumnya akan meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawa yang bersangkutan. Kenyataan bahwa bercak terlihat juga pada kondisi ini merupakan petunjuk bahwa senyawa tersebut senyawa fenol. Sering kali bercak yang terlihat (dengan sinar UV) kebanyakan disebabkan oleh flavonoid walaupun bercak berfluoresensi biru, merah jambu, keputihan, jingga, dan kecoklatan harus dianggap bukan flavonoid sebelum diperiksa lebih lanjut (dengan spektroskopi UV-tampak). Bercak glikosida flavon dan glikosida flavonoid yang khas tampak berwarna ijas (lembayung tua) dengan sinar UV dan menjadi kuning atau hijau kuning bila diuap  $\text{NH}_3$ , tetapi dijumpai juga sejumlah warna kombinasi warna lain (Markham, 1988). Rentang warna bercak yang dapat dihubungkan dengan flavonoid dirinci pada tabel bersama-sama dengan hubungannya dengan struktur flavonoid yang mungkin.

**Tabel 2. 1. Penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid**

Warna bercak dengan sinar UV		Jenis flavonoid yang mungkin
Sinar UV tanpa NH <sub>3</sub>	Sinar UV dengan NH <sub>3</sub>	
Lembayung gelap	Kuning, hijau-kuning atau hijau	a. Biasanya 5-OH flavon atau flavonol (tersulih pada 3-O dan mempunyai 4'-OH) b. Kadang-kadang 5-OH flavanon dan 4'-OH khalkon tanpa OH pada cincin B
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan warna	a. Biasanya flavon atau flavonol tersulih pada 3-O mempunyai 5-OH tetapi tanpa 4'-OH bebas b. Beberapa 6- atau 8-OH flavon dan flavonol tersulih pada 3-O serta mengandung 5-OH c. Isoflavon, dihidroflavonol, biflavonil dan beberapa flavanon yang mengandung 5-OH d. Khalkon yang mengandung 2'-atau 6'-OH tetapi tidak mengandung 2- atau 4-OH bebas
	Biru muda Merah atau jingga	Berapa 5-OH flavanon Khalkon yang mengandung 2- dan/atau 4-OH bebas
Fluoresensi biru muda	Fluoresensi hijau-kuning atau hujau-biru	a. Flavon dan flavanon yang tak mengandung 5-OH, misalnya 5-OH glikosida b. Flavonol tanpa 5-OH bebas tetapi tersulih pada 3-OH
	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
	Fluoresensi murup biru muda	Isoflavon yang tak mengandung 5-OH bebas
Tak nampak	Fluoresensi biru muda	Isoflavon tanpa 5-OH bebas
Kuning redup dan kuning, atau fluoresensi jingga	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan mempunyai atau tak mempunyai 5-OH bebas (kadang-kadang berasal dari dihidroflavonol)
Fluoresensi kuning	Jingga atau merah	Auron yang menandung 4'-OH bebas dan beberapa 2- atau 4-OH khalkon
Hijau-kuning, hijau biru, atau hijau	Perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan	a. Auron yang tak mengandung 4'-OH bebas dan flavanon tanpa 5-OH bebas b. Flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas
Merah atau jingga redup atau merah senduduk	Biru	Antosianidin 3-glikosida
Merah jmbabu atau fluoresensi kuning	Biru	Sebagian besar antosianidin 3,5-diglikosida

Sumber : Markham, 1988

Nilai utama kromatografi lapis tipis pada penelitian senyawa flavonoida ialah sebagai cara analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit. Menurut Markham, kromatografi lapis tipis terutama berguna untuk tujuan berikut:

- a. Mencari pelarut untuk kromatografi kolom.

- b. Analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom.
- c. Identifikasi flavonoida secara ko-kromatografi.
- d. Isolasi flavonoida murni skala kecil.
- e. Penyerap dan pengembang yang digunakan umumnya sama dengan penyerap dan pengembang pada kromatografi kolom dan kromatografi kertas (Markham,1988).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang telah dipisahkan pada lapisan tipis lebih baik dikerjakan dengan pereaksi kimia dan reaksi-reaksi warna. Namun lazimnya untuk identifikasi menggunakan nilai RF. Definisi nilai RF adalah jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal.

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh komponen}}{\text{jarak tempuh eluen}}$$

Nilai RF untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai senyawa standar. Senyawa standar biasanya memiliki sifat-sifat kimia yang mirip dengan senyawa yang dipisahkan pada kromatogram (Sastrohamidjojo, 1985).

#### 10. Spektrofotometri UV-Visible

Analisis suatu senyawa dapat dilakukan dengan uji warna, penentuan kelarutan, bilangan Rf, dan ciri spektrum. Spektrofotometri adalah metode untuk analisis baik kuantitatif maupun kualitatif. Prinsip dari pembacaan spektrofotometri adalah jika suatu molekul sederhana dikenakan radiasi elektromagnetik maka molekul tersebut akan menyerap radiasi elektromagnetik yang energinya sesuai. Interaksi antara molekul dengan radiasi elektromagnetik ini akan meningkatkan energi potensial elektron pada tingkat keadaan tereksitasi. Apabila pada molekul yang sederhana tadi hanya terjadi transisi elektronik pada satu macam gugus yang terdapat pada molekul, maka hanya akan terjadi satu absorpsi yang merupakan garis spektrum. Setiap warna akan mempunyai spektrum serapan yang berbeda-beda dari senyawa yang lainnya dan dasar inilah

yang digunakan untuk analisis kualitatif pada suatu senyawa, banyaknya sinar yang diabsorpsi pada panjang gelombang tertentu sebanding dengan banyaknya molekul yang menyerap radiasi sehingga spektra absorpsi juga dapat digunakan untuk analisis kualitatif (Gandjar & Rohman, 2007).

Suatu senyawa dapat dideteksi dengan spektrofotometri adalah jika mempunyai gugus kromofor. Kromofor merupakan semua gugus atau atom dalam suatu senyawa organik yang mampu menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak. Pada senyawa kompleks akan mempunyai serapan pada panjang gelombang yang lebih panjang karena energi radiasi yang dibutuhkan oleh senyawa tersebut lebih besar dan akan terbaca pada panjang gelombang yang lebih panjang. Maka senyawa kompleks terbaca pada panjang gelombang sinar tampak (Gandjar & Rohman, 2007).

Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Spektrofotometri digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorpsi atau diteruskan. Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linearitas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmitan. Pada spektrofotometri berlaku hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Secara matematis dapat ditulis sebagai berikut :

$$A = a.b.c$$

Dengan :

A = absorban

a = absorptivitas

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

(Gandjar & Rohman, 2007).

Absorptivitas molar (a) merupakan suatu konstanta yang tidak tergantung konsentrasi, tebal kuvet dan intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi. Dalam hukum Lambert-Beer berlaku syarat sebagai berikut tersebut ada beberapa pembatasan yaitu:

- a. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis.
- b. Penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang yang sama.
- c. Senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung terhadap yang lain dalam larutan tersebut.
- d. Tidak terjadi fluoresensi atau fosforisensi.
- e. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan.

(Gandjar & Rohman, 2007).

Spektrum Flavonoida biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut Metanol (MeOH) atau Etanol (EtOH). Spektrum khas terdiri atas dua maksima pada rentang 240-285 nm (pita II) dan 300-550 nm (pita I). Kedudukan yang tepat dan kekuatan nisbi maksima tersebut memberikan informasi yang berharga mengenai sifat flavonoida dan pola oksigenasinya. Ciri khas spektrum tersebut ialah kekuatan nisbi yang rendah pada pita I dalam dihidroflavon, dihidroflavonol, dan isoflavon serta kedudukan pita I pada spektrum khalkon, auron dan antosianinyang terdapat pada panjang gelombang yang tinggi (Markham, 1988). Ciri spektrum golongan flavonoida utama dapat ditunjukkan sebagai berikut :

**Tabel 2. 2 Rentangan serapan spektrum UV-Vis flavonoid**

<b>Pita II</b>	<b>Pita I</b>	<b>Jenis flavonoid</b>
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OH bebas)
245-275	310-330 bahu Kira-kira 320 puncak	Isoflavon Isoflavon (5-deoksi-6,7- dioksidasi)
275-295	300-330 bahu	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270 (kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
230-270 (kekuatan rendah)	380-430	Auron
270-280	465-560	Antosianidin dan antosianin

Sumber : Markham, 1988

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam analisis Spektrofotometri Uv-Vis menurut Gandjar & Rohman (2007):

a. Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar UV-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu.

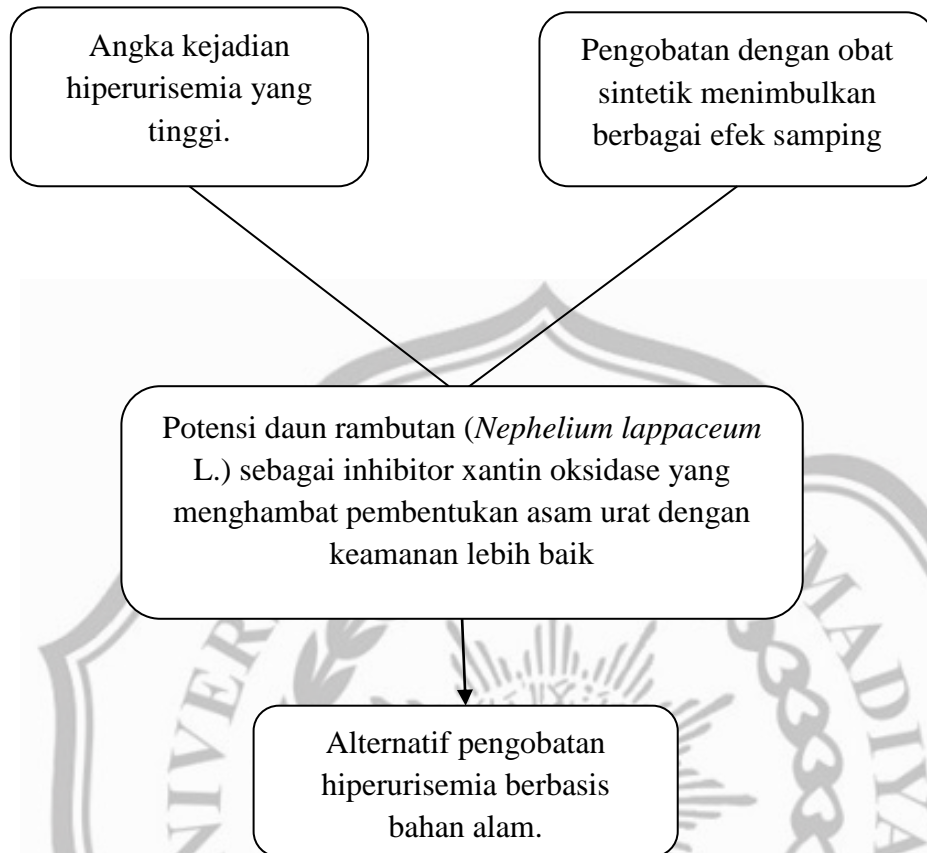
b. Waktu Operasional (operating time)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

c. Pemilihan Panjang Gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu.

### C. Kerangka Konsep



Gambar 2. 7. Kerangka konsep

### D. Hipotesis

Ekstrak etanol, fraksi diklorometana, dan fraksi etil asetat dari daun rambutan (*Nephelium lappaceum* L) mengandung senyawa flavonoid yang mempunyai aktivitas sebagai penghambat enzim xantin oksidase.