

Anthocyanin Identification of Methanol-HCl Extract Active Fraction in Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*. L) and Its Potential as Xanthine Oxidase Inhibitor

Pratiwi Puji Lestari¹, Dewi Kusri¹, Khairul Anam^{1,*}

¹Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Diponegoro University, Jl. Prof. Sudharto SH, Kampus Tembalang, Semarang 50275 (Telp/fax 024-76480824)

*corresponding author's email: k_anam@undip.ac.id

ABSTRACT

The active fraction of methanol-HCl extract of Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa*. L) has been identified and its inhibitor xanthine oxidase potential tested. The aim of this study was to compare the inhibitory activity of xanthine oxidase from methanol-HCl extract and its fractionation results and to identify the chemical component of Roselle flower's methanol-water active fraction which had xanthine oxidase inhibition activity. The chemical component identification of Roselle flower was preceded by extraction and fractionation. The types of chemical compound contents were identified by the spotting appearance, UV-Vis and IR spectroscopy. The quantification of chemical compound was carried out by TLC Scanner and xanthine oxidase inhibitory activity was tested in vitro. From this research, it was obtained the methanol-HCl extract yield of 4%. The Roselle methanol-HCl extract has the ability to inhibit activity of xanthine oxidase (IC₅₀) was 0.64 ppm which was preponderant than the fractionation result. The 2nd fraction was the most active to inhibit the xanthine oxidase activity compared to the 1st and 3rd fraction. The main components of 2nd fraction were isolates A (R_f 0.9) and isolates D (R_f=0.64) which were expected as the group of anthocyanin. The relative level of isolate A and D were 4.67% and 24.24% respectively.

Keywords: Rosella (Hibiscus sabdariffa), Anthocyanins, Xanthine Oxidase Inhibitors, Spectroscopy UV-Vis and IR, TLC

ABSTRAK

Telah diidentifikasi kandungan kimia fraksi metanol-air dari bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan dilakukan uji potensi inhibitor xantin oksidase. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas inhibisi xantin oksidase ekstrak metanol-HCl dan hasil fraksinasinya, serta mengidentifikasi kandungan kimia dari fraksi aktif metanol-air bunga rosella yang memiliki aktivitas inhibisi xantin oksidase. Identifikasi kandungan kimia dari bunga rosella didahului dengan ekstraksi dan fraksinasi. Jenis kandungan senyawa kimia diidentifikasi dengan penampak bercak dan secara spektroskopi UV-Vis dan IR. Kuantifikasi kandungan kimia dilakukan menggunakan TLC Scanner. Aktivitas inhibisi xantin oksidase dilakukan secara in-vitro. Dari penelitian diperoleh ekstrak metanol-HCl dengan rendemen 4%. Ekstrak metanol-HCl rosella memiliki kemampuan menghambat aktivitas xantin oksidase (IC₅₀) sebesar 0,64 ppm) yang lebih kuat dibandingkan hasil fraksinasinya. Fraksi 2 merupakan fraksi teraktif dalam menghambat aktivitas xantin oksidase dibandingkan dengan fraksi 1 dan fraksi 3. Komponen utama fraksi 2 adalah isolat A (R_f 0,9) dan D (R_f 0,64) yang diduga merupakan senyawa golongan antosianin. Kadar relatif isolat A dan D adalah 4,67% dan 24,24%.

Kata kunci: Rosella (Hibiscus sabdariffa), Antosianin, Inhibitor Xantin Oksidase, Spektroskopi UV-Vis dan IR, TLC Scanner.

Pendahuluan

Asam urat atau lebih tepatnya radang sendi dapat didefinisikan sebagai radang yang diakibatkan karena adanya penumpukan asam urat di dalam tubuh. Kadar asam urat dalam darah yang tinggi membuat sebagian asam urat tersebut tidak dapat tersaring oleh ginjal dan tetap berada dalam tubuh. Karena kadarnya dalam tubuh tinggi maka akan terbentuk kristal dan menumpuk dipersendian. Hal ini akan menyebabkan bengkak, radang, kekakuan dan rasa nyeri [1]. Penyakit asam urat sangat berhubungan dengan hiperurisemia akibat kelebihan produksi asam urat yang disebabkan oleh tingginya asupan makanan yang kaya asam nukleat seperti jeroan, kacang-kacangan, makanan hasil laut dan makanan hasil fermentasi [2]. Penyakit asam urat disebabkan karena adanya katabolisme purin menjadi xantin lalu menjadi asam urat oleh aktivitas enzim xantin oksidase.

Enzim xantin oksidase (XO) berperan penting dalam katabolisme purin dan mempunyai 2 bentuk, yaitu XO dan Xantin Dehidrogenase (XDH). Enzim XDH dapat dikonversikan menjadi XO dan dapat mengkatalis oksidasi hipoxantin menjadi xantin lalu menjadi asam urat yang berperan penting pada penyakit gout [3]. Penyakit asam urat dapat dicegah dengan menghambat aktivitas xantin oksidase melalui pengobatan secara sintetik ataupun secara tradisional dengan menggunakan bahan-bahan alternatif yang terdapat dari tanaman.

Penggunaan obat sintetik dalam upaya penyembuhan asam urat dilakukan dengan mengkonsumsi alopurinol, yang digunakan untuk menghambat aktivitas enzim xantin oksidase. Penggunaan obat sintetik ini memberikan banyak efek samping dan reaksi alergi. Oleh sebab itu diperlukan pengobatan alternatif yang lebih aman dengan efek samping yang lebih rendah. Menurut Cos [3] beberapa senyawa flavonoid dan alkaloid pada tanaman dapat berperan sebagai obat untuk penyakit asam urat karena mampu menghambat aktivitas xantin oksidase.

Salah satu turunan flavonoid adalah antosianin, merupakan suatu zat warna alami dalam tumbuhan yang memiliki sifat sebagai antioksidan yang tinggi. Salah satu tanaman yang memiliki kadar antosianin yang tinggi adalah rosella. Dalam ekstrak kering

rosella mengandung 1,7-2,5% antosianin [4]. Yulianto [5] menjelaskan bahwa ekstrak kasar kelopak rosella mampu menghambat aktivitas xantin oksidase.

Penelitian ini telah dilakukan fraksinasi ekstrak metanol-HCl dari bunga rosella yang mampu menghambat aktivitas xantin oksidase, serta mengidentifikasi antosianin dalam fraksi aktif yang mampu menghambat aktivitas xantin oksidase tersebut.

Metodologi Penelitian

Bahan. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah kelopak bunga rosella, metanol (teknis), HCl pekat, akuades, Sephadex LH-20, metanol p.a (Merck), butanol p.a (Merck), asam asetat p.a (Merck), aqua demineralisasi, ammonia p.a (Merck), natrium hidroksida, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, plat Silika gel GF₂₅₄ (Merck), substrat xantin (Sigma/X0626), *xanthine oxidase from bovine milk lyophilized powder* (Sigma/X4376) dan kalium dehidrogenphosphat (Merck).

Alat. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary vacuum evaporator* (Buchi R-124), kolom kromatografi, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), spektrofotometer FTIR (Shimadzu), *TLC Scanner 3* Camag, *Freeze dryer* (Eyela), gelas ukur 100 mL, gelas beker 250 mL, toples kaca, botol vial, kertas saring, corong, chamber, pipet mikro, corong pisah, labu ukur 25 mL dan neraca analitik digital.

Preparasi Sampel. Bunga rosella segar yang diperoleh dari petani di daerah Wonosobo diambil bagian kelopaknya, kemudian diiris tipis-tipis dan ditimbang yang selanjutnya digunakan sebagai bahan baku ekstraksi.

Ekstraksi Bungan Rosella. Sebanyak 1,5 kg kelopak bunga rosella dimaserasi menggunakan pelarut HCl 0,1% dalam 4,5 L pelarut metanol. Perendaman dilakukan selama 3x24 jam. Hasil maserasi dipisahkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat metanol-HCl bunga rosella.

Uji Skrining. Uji skrining dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder

pada ekstrak metanol-HCl bunga rosela dengan menggunakan metode Harborne [6]. Uji yang dilakukan antara lain uji alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan steroid, saponin dan tanin.

Uji Saponin. Sebanyak 0,5 gram sampel diberi 10 mL air panas dan kemudian dididihkan selama 10 menit. Saring ekstrak, ambil 10 mL filtrat kemudian dikocok selama 10 menit. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya buih busa yang tidak mudah hilang.

Uji Flavonoid. sebanyak 0,5 gram sampel yang sudah dididihkan dengan 10 mL aquades diambil 5 mL kemudian ditambahkan potongan Mg. Kemudian ditambahkan 1 ml HCl pekat dan 2 mL amil alkohol, dan dilakukan pengocokan. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

Uji Alkaloid. Sampel sebanyak 1 gram ditambahkan kloroform 10 mL kloroform dan 5 tetes NH_4OH . Kemudian dikocok dan disaring. Filtrat yang didapat dikocok dengan penambahan 10 tetes H_2SO_4 2M dan akan terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam diteteskan pada druple plat dan masing-masing diberi pereaksi meyer dan dragendorf. Hasil positif jika terbentuk endapan merah bata dengan pereaksi dragendorf. Sedangkan dengan peraksi meyer akan terbentuk endapan putih.

Uji Steroid/Triterpenoid. 2 gram sampel diberi penambahan 5mL etanol panas selama 1 jam, kemudian disaring. Residu yang didapat ditambah eter, ekstrak eter ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau pada senyawa triterpenoid dan warna biru pada steroid.

Uji Tanin. 1 gram sampel diberi penambahan 10mL air panas dan dididihkan selama 10 menit. Kemudian saring ekstrak, filtrat ditambahkan 10 mL FeCl_3 1%. Hasil positif menunjukkan warna biru-hijau kehitaman.

Fraksinasi Ekstrak Metanol-HCl. Sebanyak 20 gram ekstrak pekat metanol-HCl bunga rosella difraksinasi menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam yang digunakan Sephadex LH-20 dan fasa gerak yang digunakan campuran pelarut air-metanol (fraksi 1 (100:0); fraksi 2 (75:25); fraksi 3

(50:50); fraksi 4 (25:75) dan fraksi 5 (0:100)). Hasil fraksi yang didapat, pelarut metanolnya dihilangkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Sedangkan sisa airnya dihilangkan dengan *freeze dryer* sehingga akan didapatkan serbuk dari setiap fraksi.

Uji Aktivitas Inhibisi Xantin Oksidase. serbuk yang didapat dari hasil *freeze dryer* pada setiap fraksi diujikan terhadap xantin oksidase dengan menggunakan alupurinol sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri berdasarkan prosedur Owen dan Johns [2] serta prosedur Ummaheswari dkk [7].

Pembuatan Larutan Uji. Sebanyak 0,0125 gram serbuk (ekstrak, fraksi 1,2,3 dan alopurinol) dilarutkan dengan buffer fosfat ke dalam labu takar 25 mL hingga diperoleh larutan induk 500 ppm. Larutan induk diencerkan menjadi konsentrasi 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm.

Pengujian Sampel. Sebanyak 1 mL larutan uji diberi 2,9 mL larutan buffer kalium fosfat 0,05M (pH 7,5) dan 0,1 mL xantin oksidase 0,1 unit/mL kemudian diprainskubasi pada 25°C selama 30 menit. Larutan campuran ditambahkan 1 mL xantin 0,15mM dan diinkubasi pada 25°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Pengujian Kontrol Sampel. Sebanyak 1 mL larutan uji ditambah 3 mL buffer kalium fosfat 0,05 M dan 1 mL xantin 0,15 mM (pH 7,5) dan dilakukan prainkubasi pada 25°C selama 30 menit. Setelah inkubasi, campuran diberi 1 mL HCl 1 N dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 290 nm.

Pengujian Blanko. Sebanyak 3,9 mL buffer kalium fosfat 0,05 M (pH 7,5) ditambah 0,1 mL xantin oksidase 0,1 unit/mL serta dilakukan prainkubasi selama 30 menit pada 25°C. Kemudian larutan campuran diberi 1 mL xantin 0,15 mM dan diinkubasi selama 30 menit pada 25°C. Setelah inkubasi, tambahkan 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 290 nm menggunakan spektrofotometer UV.

Pengujian Kontrol Blanko. Sebanyak 3,1 mL larutan buffer kalium fosfat 0,05 M (pH 7,5) diberi 1 mL xantin 0,15mM dan diinkubasi selama 30 menit pada 25°C. Setelah diinkubasi, campuran diberi 1 mL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 290 nm menggunakan spektrofotometer UV. Satu unit aktivitas xantin oksidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk menghasilkan 1 mmol asam urat per menit pada suhu 25°C. Aktivitas inhibisi xantin oksidase dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \left(\frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

A: absorbansi blanko (tanpa penambahan sampel)

B: absorbansi kontrol blanko (tanpa penambahan sampel dan enzim)

C: absorbansi sampel

D: absorbansi kontrol sampel (tanpa penambahan enzim).

Identifikasi Pada Fraksi Aktif. Identifikasi antosianin dalam fraksi aktif dilakukan menggunakan metode KLT dengan fasa diam silika gel GF₂₅₄ dan pengembangnya campuran n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Noda-noda yang terbentuk dianalisis menggunakan uji penampak bercak seperti AlCl₃ dan uap amonia. Pemisahan senyawa antosianin dari fraksi aktif dilakukan dengan menggunakan KLT preparatif yang dielusi dengan pengembang n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Komponen utama pada noda yang memberikan intensitas warna paling besar dikerok dan diuji kemurniannya menggunakan KLT berbagai macam pelarut.

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Senyawa Antosianin Dalam Fraksi Aktif. Analisis kualitatif isolat yang telah murni dilakukan dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis dan FTIR. Sedangkan analisis kuantitatif fraksi aktif dilakukan dengan menggunakan *TLC Scanner*.

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi Bunga Rosella dan Uji Skinning Fitokimia

Sampel kelopak bungan rosella sebanyak 1,5 kg dimaserasi menggunakan HCl 0,1% dalam 4,5 L metanol. Pemilihan pelarut ini dikarenakan metanol

merupakan pelarut umum untuk melarutkan senyawa bersifat polar seperti flavonoid, fenolat dan antosianin. Penambahan HCl dilakukan secara khusus untuk mengambil pigmen antosianin dari bunga rosella serta untuk menstabilkan antosianin agar tidak mudah teroksidasi. Ekstraksi bunga rosella dilakukan dengan menggunakan metode maserasi pada temperatur ruang (25°C) selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan. Metode ini merupakan metode terbaik yang telah dilaporkan oleh Suzery dkk [8] untuk menghasilkan rendemen paling tinggi jika dibandingkan dengan metode soxhletasi pada suhu 75°C. Ekstrak metanol-HCl yang didapat adalah 61,18 gram dengan rendemennya 4%.

Hasil penapisan fitokimia terhadap bunga rosella menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, steroid, tanin dan antosianin. Sedangkan pada ekstrak metanol-HCl mengandung flavonoid, tanin, antosianin, dan saponin. Hal ini menandakan bahwa pada ekstrak metanol-HCl sudah tidak mengandung alkaloid dan steroid. Penambahan asam pada pelarut maserasi dilakukan secara khusus untuk mengambil senyawa golongan flavonoid dan pigmen antosianin dalam bunga rosella. Hal ini disebabkan karena antosianin stabil pada pH asam sehingga antosianin tidak mudah teroksidasi dan rusak akibat terdegradasi oleh cahaya. Sedangkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid tidak dapat terekstrak disebabkan karena alkaloid terdapat dalam bentuk garamnya apabila diekstraksi dengan menggunakan asam.

Fraksinasi Ekstrak Metanol-HCl Bunga Rosella

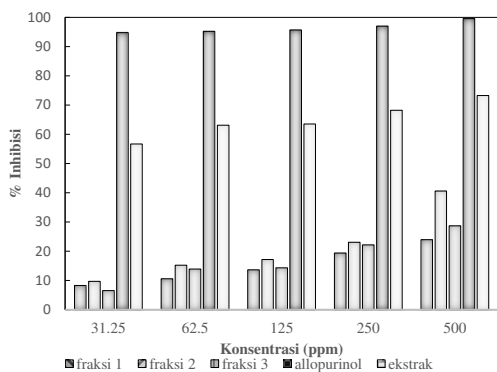
Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam yang digunakan adalah Sephadex LH-20 dan fasa gerak yang digunakan campuran pelarut metanol dan air. Perbandingan campuran pelarut air : metanol untuk fraksi 1 (100:0), fraksi 2 (75:25), fraksi 3 (50:50) fraksi 4 (25:75) dan fraksi 5 (0:100). Tujuan fraksinasi menggunakan sephadex pada kromatografi kolom ini adalah untuk mengelompokkan senyawa dari ekstrak berdasarkan ukuran molekulnya. Penggunaan perbandingan campuran air : metanol dilakukan untuk mengubah permukaan gel sephadex. Ketika penambahan air, gel sephadex akan mengembang membuat molekul dengan berat molekul kecil terjebak dan tertahan di dalam gel

sephadex. Sedangkan penambahan metanol, gel sephadex akan mengecil dan membuat molekul yang terjebak di dalamnya keluar dari kolom.

Setiap fraksi yang didapat dihilangkan pelarut metanolnya dengan *rotary evaporator*, sedangkan sisa airnya dihilangkan dengan *freeze dryer*. Hasil yang didapat adalah bentuk serbuk dari fraksi 1, 2, 3 dan 4 sebesar 12,6 g; 0,256g; 0,0606 g dan 0,015 g.

Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Xantin Oksidase

Aktivitas inhibisi enzim xantin oksidase dilakukan pada serbuk hasil pengeringan menggunakan *freeze dryer* dari fraksi 1, 2, dan 3 serta dari ekstrak metanol *Hibiscus sabdariffa* dan alopurinol sebagai kontrol positif yang dilakukan secara *in vitro*. Fraksi 4 dan 5 tidak dilakukan uji aktivitas inhibisinya karena massa sampel tidak mencukupi. Pengujian aktivitas inhibisi xantin oksidase dilakukan konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 31,25 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm dan 500 ppm. Penggunaan variasi konsentrasi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi sampel terhadap peningkatan daya inhibisi sampel. Prosentase aktivitas inhibisi enzim xantin oksidase dari ekstrak, hasil fraksi 1, 2 dan 3 serta alopurinol ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Prosentasi aktivitas inhibisi xantin oksidase.

Pada gambar tersebut menunjukkan bahwa ekstrak metanol-HCl dari *Hibiscus sabdariffa* pada konsentrasi 500 ppm mampu menghambat 73,27% aktivitas enzim xantin oksidase. Fraksi 1 (air - metanol = 100:0) memiliki kemampuan inhibisi xantin oksidase sebesar 23,96%, fraksi 2 (air - metanol = 75:25) mampu menghambat 40,55% dan

fraksi 3 (air - metanol = 50:50) mampu menghambat 28,69%. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa aktivitas inhibisi dari ekstrak metanol-HCl lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil fraksinasi. Namun jika hasil fraksinasi dibandingkan satu sama lain, fraksi 2 memberikan aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan fraksi 1 dan 3. Kenaikan konsentrasi memberikan peningkatan aktivitas inhibisi enzim dari ekstrak metanol-HCl, fraksi 1, fraksi 2 dan fraksi 3.

Identifikasi Senyawa Antosianin Fraksi Aktif dari Ekstrak Metanol-HCl

Hasil pengujian aktivitas inhibisi xantin oksidase menunjukkan bahwa fraksi 2 memberikan aktivitas inhibisi yang cukup baik dibandingkan fraksi 1 dan fraksi 3 sehingga fraksi 2 dilakukan identifikasi senyawa antosianinnya. Salah satu cara analisis adalah menggunakan kromatografi lapis tipis. Prinsip kromatografi adalah perbedaan adsorpsi atau partisi fase diam (adsorben) dengan pelarut pengembang (fase gerak). Fasa diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fasa gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Hasil KLT yang diamati di bawah lampu UV₃₆₅ memiliki Rf 0,94; 0,88; 0,80; 0,69; 0,67 dan 0,55.

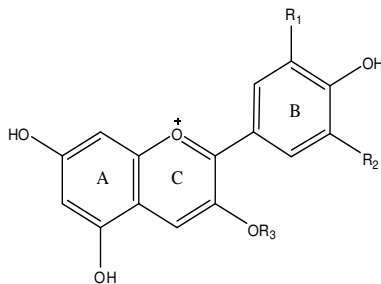
Setiap noda yang terbentuk di analisis menggunakan uji penampak bercak AlCl₃ dan uap amonia. Berdasarkan hasil uji penampak bercak terlihat bahwa noda yang memiliki Rf 0,94 dan Rf 0,69 dengan uap amonia memberikan warna biru menyala, sedangkan terhadap penampak bercak AlCl₃ memberikan warna biru dan kuning.

Menurut Markham [9] senyawa yang memberikan warna kuning dan biru dengan penampak bercak AlCl₃ dan memberikan warna biru menyala dengan uap amonia di bawah lampu UV₃₆₅ merupakan senyawa flavonoid golongan antosianin.

Pemisahan noda yang terdapat pada fraksi 2 dilakukan dengan menggunakan metode KLT preparatif. Noda A (Rf 0,94 dan noda D (Rf 0,69) di uji kemurnian dengan KLT berbagai macam pelarut dan menunjukkan bahwa kedua noda tersebut telah murni.

Analisis Spektroskopi UV-Vis dan IR

Isolat A dan D yang telah murni dianalisis serapan panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil analisis menunjukkan isolat A memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 271 (pita 2) dan 534 (pita 1). Sedangkan pada isolat D memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 261 nm (pita 2) dan 518 nm (pita 1). Hal ini menunjukkan bahwa noda tersebut merupakan senyawa yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi dan adanya gugus kromofor. Menurut Markham [9], adanya 2 pita pada rentang serapan panjang gelombang 261 nm (pita 2) sampai 534 nm (pita 1) merupakan serapan khas dari senyawa flavonoid golongan antosianin dan antosianidin, dimana terdapat senyawa aromatik sebagai pusat gugus kromofor dari senyawa golongan flavonoid, gugus -OH yang tersubstitusi pada benzene dan gugus C=O. Hasil tersebut diperkuat oleh Jordheim [10] yang mengukur spektrum senyawa antosianin golongan sianidin pada biji jarak (*Ricinus communis*) yang mempunyai serapan maksimal pada panjang gelombang 283 nm, 314 nm, dan 522 nm. Struktur senyawa antosianin ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur senyawa antosianin

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer FTIR, kedua isolat memiliki gugus O-H, CH₂, C=O karbonil, C=C aromatik, =C-H aromatik, C-O-C eter, C-O alkohol dan substitusi benzena yang memperkuat hasil analisis spektroskopi UV-Vis yang menandakan adanya gugus aromatik, -OH, serta C=O karbonil.

Meskipun hasil identifikasi kedua isolat memiliki kemiripan pita serapan pada spektroskopi FTIR, namun kedua isolat tidak sama karena memiliki profil yang berbeda satu dengan yang lainnya, tetapi masih

berada dalam satu senyawa golongan yaitu antosianin. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada daerah sidik jarinya, karena daerah sidik jari merupakan daerah khas yang dimiliki oleh suatu senyawa. Hasil analisis spektroskopi FTIR memperkuat analisis dari spektroskopi UV-Vis dan menduga bahwa kedua senyawa merupakan senyawa golongan antosianin/antosianidin.

Identifikasi Menggunakan TLC Scanner

Analisis *TLC Scanner* dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 356 nm dan luas area dari fraksi 2 yang telah dielusi dengan pengembang n-butanol : asam asetat : air (4:1:5). Berdasarkan hasil *scanner* yang dilakukan pada panjang gelombang 365 nm diperoleh 15 noda yang memiliki jarak R_f hampir berdekatan. Analisis menggunakan *TLC Scanner* akan didapat luas area relatif pada isolat A dan D yang tampak dibawah lampu UV₃₆₅ pada pengamatan menggunakan *TLC Scanner*. Luas area tersebut ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Luas area beberapa noda pada *TLC Scanner* yang terlihat di bawah lampu UV₃₆₅.

| Noda | R _f | Luas area | % area |
|------|----------------|-----------|--------|
| A | 0,94 | 189,1 | 4,67 |
| B | 0,88 | 90,5 | 2,23 |
| C | 0,80 | 356,1 | 8,79 |
| D | 0,69 | 982,0 | 24,24 |
| E | 0,55 | 511,1 | 12,62 |

Hasil *TLC scanner* dapat dilihat luas area relatif dari isolat A (R_f 0,94) adalah 4,67%, sedangkan isolat D (R_f 0,69) memiliki luas area relatif paling besar yaitu 24,24%.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian identifikasi antosianin dari ekstrak metanol-HCl bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) menunjukkan bahwa ekstrak metanol-HCl rosella (IC₅₀ 0,64 ppm) memiliki kemampuan menghambat aktivitas xantin oksidase jauh lebih kuat dibandingkan hasil fraksinasinya. Fraksi 2 mempunyai aktivitas inhibisi xantin oksidase paling kuat dibandingkan fraksi 1 dan fraksi 3. Komponen utama dari fraksi 2 diantaranya

isolat A (Rf 0,9) diduga merupakan antosianin dengan kadar relatif 4,67% dan isolat D (Rf 0,64) juga diduga merupakan antosianin dengan kadar relatif 24,24%.

Daftar Pustaka

- [1] Hardi. Soenanto, (2009), 100 Resep Sembuhkan Hipertensi, Asam Urat dan Obesitas, PT. Elex Media Komputindo, Jakarta
- [2] Patrick L. Owen, Timothy Johns, (1999), Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout, *Journal of ethnopharmacology*, 64 (2), 149-160 [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00119-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00119-6)
- [3] Paul Cos, Li Ying, Mario Calomme, Jia P Hu, Kanyanga Cimanga, 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 superoxide scavengers, *Journal of natural products*, 61 (1), 71-76
- [4] Badreldin H. Ali, Naser Al Wabel, Gerald Blunden, (2005), Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review, *Phytotherapy research*, 19 (5), 369-375 [10.1002/ptr.1628](https://doi.org/10.1002/ptr.1628)
- [5] D. Yulianto, (2009), Inhibisi Xantin Oksidase Secara In Vitro oleh Ekstrak Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dan Ciplukan (*Physalis angulata*), in: Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- [6] Jeffrey Barry Harborne, (1987), Metode fitokimia, Edisi ke-2. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*,
- [7] M. Umamaheswari, K. Asokkumar, A. T. Sivashanmugam, A. Remyaraju, V. Subhadradevi, T. K. Ravi, (2009), In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb, *Journal of ethnopharmacology*, 124 (3), 646-648 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.018>
- [8] Meiny Suzery, Sri Lestari, Bambang Cahyono, (2010), Penentuan Total Antosianin dari Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L) dengan Metode Maseri dan Sokshletasi, *Jurnal Sains dan Matematika*, 18 (1), 1-6
- [9] Kenneth R. Markham, (1982), *Techniques of flavonoid identification*, Penerbit ITB, Bandung
- [10] Monica Jordheim, (2007), Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms, in: Department of Chemistry, University of Bergen, Bergen, Norway.