

**KARAKTERISASI DAN ANALISIS HASIL NMR DARI
FLAVONOID GLIKOSIDA YANG TELAH DIISOLASI DARI
LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Val.)**

**AMAL REZKA PUTRA
N11109258**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**KARAKTERISASI DAN ANALISIS HASIL NMR DARI
FLAVONOID GLIKOSIDA YANG TELAH DIISOLASI DARI
LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Val.)**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**



**AMAL REZKA PUTRA
N11109258**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**KARAKTERISASI DAN ANALISIS HASIL NMR DARI
FLAVONOID GLIKOSIDA YANG TELAH DIISOLASI DARI
LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Val.)**



Yusnita Rifai, S.Si.,M. Pharm.,Ph.D.,Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001

Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt
NIP. 19491018 198003 2 001

Pada tanggal, 24 Juli 2013

PENGESAHAN

**KARAKTERISASI DAN ANALISIS HASIL NMR DARI
FLAVONOID GLIKOSIDA YANG TELAH DIISOLASI DARI
LEMPUYANG WANGI (*Zingiber aromaticum* Val.)**

Oleh :
AMAL REZKA PUTRA
N11109258

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal 24 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : **Usmar, S.Si., M.Si., Apt** (.....)
2. Sekretaris : **Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt** (.....)
3. Ex Officio : **Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt** (.....)
4. Ex Officio : **Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt** (.....)
5. Anggota : **Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt** (.....)

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 20 Juli 2013

Penyusun,

Amal Rezka Putra

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillahirabbilalamin. Tiada kata yang lebih berharga yang terucap dari lisan penulis yang dhaif ini, selain kata “syukur” kepada Allah Subhanahu Wa Ta’ala yang telah melimpahkan nikmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Shalawat dan salam akan selalu tercurahkan kepada junjungan kita, Nabiyullah Muhammad Shallallahu ‘alaihi Wasallam.

Terima kasih yang tak ternilai serta rasa sayang penulis haturkan kepada ayahanda Lamin D. dan ibunda Kumala atas segala pengorbanan dan do’a yang selalu ditujukan kepada anaknya sehingga penulis dapat menggapai keberhasilan. Penulis sadar bahwa tidak ada yang dapat penulis lakukan untuk membalas pengorbanan tersebut, tetapi penulis hanya dapat membalas dalam bentuk do’a kepada Allah SWT, sesungguhnya Allah Maha Tahu dan Maha Bijaksana.

Kepada kakakku Nur Asma dan Nur Asia, dan keponakanku Nurwafia, Muh. Ardha dan Fadhilah, serta seluruh keluarga yang telah memberiku semangat untuk terus berjuang di Farmasi, penulis haturkan terima kasih.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama penulis, dan Ibu Prof. Dr. Hj. Asnah Marzuki, M.Si., Apt. selaku pembimbing pertama penulis, yang bisa membimbing penulis ke jalan

yang benar. Dengan kesabaran dan ilmu yang dimilikinya untuk membimbing penulis dalam melakukan penelitiannya.

Terima kasih penulis haturkan:

1. Kepada ibu Dekan Fakultas Farmasi, Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA., Apt. dan ibu Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt. selaku penasehat akademik penulis; dan bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi UNHAS, terima kasih atas ilmu, nasehat, dan saran yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan.
2. Kepada seluruh Staf Pegawai Akademik dan seluruh Laboran Fakultas Farmasi UNHAS yang telah banyak membantu penulis dalam kehidupan di kampus ini.
3. Kepada saudara-saudara seangkatan Farmasi 2009 (Ginkgo = Give Inspiration and Keep Going On) dan warga Kemafar Fakultas Farmasi UNHAS. Terima kasih banyak atas semua persaudaraan dan persahabatan yang telah kalian ukir dalam setiap lembar kehidupanku, begitu juga canda dan tawa yang telah kalian goreskan dalam setiap bab perjalanan hidup penulis.
4. Kepada saudara-saudara seangkatan; Satria Putra Penarosa, Hendra, Nurhadri Azmi, Nurul Haq, Muh. Rizky Husein, Irwan R. terimakasih telah menjadi bagian dalam suka maupun duka cerita hidup penulis.
5. Kepada teman-teman seperbimbingan penulis, Harold B. Tani dan Kuandi Tandiara Tan; terimakasih atas bantuan dan kesabarannya dalam proses pemeriksaan skripsi.

6. Kepada kanda Andi Arjuna, S.Si., Apt. yang selama ini telah banyak berjuang bersama kami baik itu sebagai teman, kakak, asisten laboratorium, dosen, ataupun orang tua selama di kampus atau di luar kampus.
7. Kepada kanda Ismail, S.Si., Apt. Terimakasih telah membantu penulis melakukan penelitian di PKP Biofarmaka Unhas.
8. Terimakasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebut satu per satu dan telah banyak membantu penulis, baik dalam menyusun skripsi ini ataupun dalam kehidupan sehari-hari. Semoga diberi kemudahan oleh Allah SWT dalam menjalani hidup kalian.

Penulis menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak terdapat kekeliruan, sehingga saran dan kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya.

Makassar, 20 Juli 2013

Penulis,

Amal Rezka Putra

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian karakterisasi dan analisis hasil NMR dari flavonoid glikosida yang telah diisolasi dari lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.). Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan karakterisasi dari senyawa flavonoid glikosida yang telah diisolasi dari lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.) berdasarkan analisis hasil spektrum UV-Vis, *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), dan NMR. Penentuan struktur digunakan Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, dan karakteristik gugusnya digunakan Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri FTIR. Hasil dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan ada 19 jenis proton yang saling berinteraksi dan pada spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan 22 atom C pada senyawa tersebut. Pada spektrum FTIR menunjukkan gugus hidroksil, benzen, metin, metilen, metil, dan karbonil. Pada spectrum UV-Vis memperlihatkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 265 nm yang menunjukkan adanya gugus benzen. Data spektrum yang telah dianalisis dibandingkan terhadap pustaka dan didapat dukungan bahwa struktur senyawa dalam penelitian ini adalah 3-[(5"-etil-2",3",4"-trihidroksioksan-1"-il)oksi]-5,7-dihidroksi-2-(3',4',5'- trihidroksifenil)-kromen-4-on.

ABSTRACT

A study on characterisation and analysis of NMR result of flavonoid glycoside isolated from *Zingiber aromaticum* Val. Has been done the aim of this research was to determinate characterization of flavonoid glycoside isolated from *Zingiber aromaticum* Val. by analysis of spectrum UV-Vis, Fourier Transform Infra Red (FTIR), and NMR. A Determinated structure used $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Spectroscopy, and the characteristic of group function used UV-Vis Spectrophotometry and Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectrophotometry. The result of $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed 19 protons which made interactions and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum showed 22 atoms carbon. In FTIR spectrum showed group function type of hydroxyl, benzene, methyn, methylen, methyl, and carbonyl. The UV-Vis spectrum showed maximum absorbance in wave length 265 nm that mean was benzene. Analysis of some spectrums which compared with literatures showed 3-[(5"-ethyl-2",3",4"-trihidroxyoxan-1"-yl)oxy]-5,7-dihidroxy-2-(3',4',5'-trihidroxyphenyl)-chromen-4-one as a result of this research.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Flavonoid	4
II.1.1 Klasifikasi senyawa gula	6
II.1.2 Flavonoid glikosida	8
II.2 Elusidasi struktur.....	10
II.3 Spektrofotometri Ultraviolet dan Visibel (UV-Vis).....	11
II.4 Spektrofotometri <i>Infrared</i> (IR)	14
II.5 Spektroskopi <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR).....	17
II.5.1 Spektroskopi Proton (^1H) NMR	17
II.5.1.1 Pemilihan pelarut pada ^1H NMR	19
II.5.2 Spektroskopi ^{13}C NMR.....	20
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	22

III.1 Alat dan Bahan	22
III.2 Metode Kerja.....	22
III.2.1 Penyiapan Sampel Penelitian	22
III.2.2 Pengukuran jumlah ^1H proton dan ^{13}C karbon senyawa flavonoid glikosida menggunakan spektroskopi NMR	22
III.2.2.1 Pengukuran menggunakan spektroskopi NMR	22
III.2.2.2 Analisis data spektrum NMR.....	23
III.2.3 Karakterisasi	23
III.2.3.1 Spektrofotometri UV-Vis.....	23
III.2.3.2 Spektrofotometri FTIR	24
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	25
IV.1 Hasil Penelitian	25
IV.2 Pembahasan	28
BAB V PENUTUP	31
V.1 Kesimpulan	31
V.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR TABEL

TABEL	halaman
1. Rentang serapan IR menurut Hukum Hoke (17)	16
2. Data hasil spektrum FTIR senyawa flavonoid glikosida hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	26
3. Data hasil spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut CDCl_3 hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	27

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	halaman
1. (a) inti flavan dan (b) inti 4-okso-flavonoid (9)	5
2. Golongan-golongan utama flavonoid (9)	6
3. Bentuk D-glukosa dan L-glukosa (11)	7
4. Bentuk tiga dimensi konformasi kursi β -D-glukosa (12)	7
5. Bentuk konformasi α -D-glukopiranosida dan β -D- glukopiranosida (13)	8
6. (a) flavonoid O-glikosida dan (b) flavonoid C-glikosida (10).....	9
7. Spektrum UV-Vis senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut metanol hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	25
8. Nama dukungan struktur senyawa flavonoid glikosida hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	27
9. Spektrum FTIR senyawa flavonoid glikosida hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	35
10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut CDCl_3 hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.).....	36
11. Hasil ekspansi 1 spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut CDCl_3 hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	37
12. Hasil ekspansi 2 spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut CDCl_3 hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	38
13. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa flavonoid glikosida dalam pelarut CDCl_3 hasil isolasi dari Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.).....	39
14. Sampel isolat Lempuyang wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.).....	40
15. Methanol proanalisis	40

16. Spektrofotometer FTIR.....	40
17. Spektrofotometer UV-Vis.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	halaman
I. Skema Kerja Karakterisasi Dan Analisis Senyawa Flavonoid Glikosida Hasil Isolasi Dari Lempuyang Wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	34
II. Gambar Spektrum FTIR, ¹ H-Nmr, ¹³ C-Nmr Senyawa Flavonoid Glikosida Hasil Isolasi Dari Lempuyang Wangi (<i>Zingiber aromaticum</i> Val.)	35
III. Foto Pelaksanaan Penelitian.....	40

BAB I

PENDAHULUAN

Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.) merupakan salah satu jenis tanaman obat tradisional yang biasanya dijadikan sebagai obat asma, merangsang nafsu makan, merangsang mukosa lambung, mengurangi rasa nyeri, pembersih darah, pereda kejang, penyakit empedu, radang sendi, batuk, kolera, anemia, malaria, penyakit saraf, nyeri perut (1). Lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.) diduga memiliki kandungan minyak atsiri dari golongan terpenoid seperti zerumbon, limonen, dan humulen dan dari golongan flavonoid glikosida seperti quersetin-3-rutinosida.

Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder. Senyawa flavonoid adalah senyawa yang memiliki struktur C6-C3-C6. Tiap bagian C6 merupakan cincin benzen yang terdistribusi dan dihubungkan oleh atom C3 yang merupakan rantai alifatik. Dalam tumbuhan flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam bentuk kombinasi glikosida (2).

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil atau ikatan dengan gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi

oksidasi secara enzimatis maupun non enzim (3). Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik terhadap radikal hidroksil dan superoksida, dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak. Aktivitas antioksidannya dapat menjelaskan mengapa flavonoid tertentu merupakan komponen aktif tumbuhan yang digunakan sebagai antikanker (4).

Kanker merupakan penyakit degeneratif yang ditandai dengan keadaan sel yang membelah secara terus menerus (*proliferasi*) dan tidak terkontrol (5). Pertumbuhan ini akan mendesak dan merusak pertumbuhan sel-sel normal. Sel normal tumbuh dengan suatu tujuan yang jelas yaitu membentuk jaringan tubuh dan mengganti jaringan yang rusak. Sedangkan pertumbuhan sel-sel kanker akan menyebabkan jaringan menjadi besar yang disebut tumor. Jika tidak diobati sel-sel kanker yang tumbuh dengan cepat ini akan menyusup dan menyebar ke jaringan sekitarnya melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (6).

Senyawa bahan alam yang telah diisolasi dapat dikatakan sebagai obat apabila telah diketahui struktur molekulnya. Sehingga pada tahap selanjutnya dilakukan penentuan struktur molekul menggunakan spektrometri. Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (*Nuclear Magnetic Resonance*) berfungsi dalam penentuan struktur molekul, dengan ditunjang oleh data spektrofotometri UV-Vis dan IR. Spektrum UV-Vis dapat membedakan gugus kromofor yang ada pada senyawa, sedangkan

spektrum IR digunakan untuk memberi petunjuk gugus fungsional yang menjadi ciri khas dari suatu senyawa (7).

Sebelumnya telah diisolasi senyawa flavonoid glikosida dari lempuyang wangi menggunakan Sephacore®. Senyawa tersebut diisolasi menggunakan metode isolasi berbasis target menggunakan GLI-GST-*dynabeads* sehingga berpotensi sebagai inhibitor signal *Hedgehog* atau GLI. Namun senyawa ini belum dikarakterisasi dan belum diketahui struktur kimianya (8).

Oleh karena itu, maksud dari penelitian ini yaitu menentukan struktur kimia dari senyawa flavonoid glikosida yang telah diisolasi dari lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.).

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan karakterisasi senyawa dari flavonoid glikosida yang telah diisolasi dari lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.) berdasarkan analisis hasil spektroskopi NMR, spektrofotometri UV-Vis dan spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

BAB II

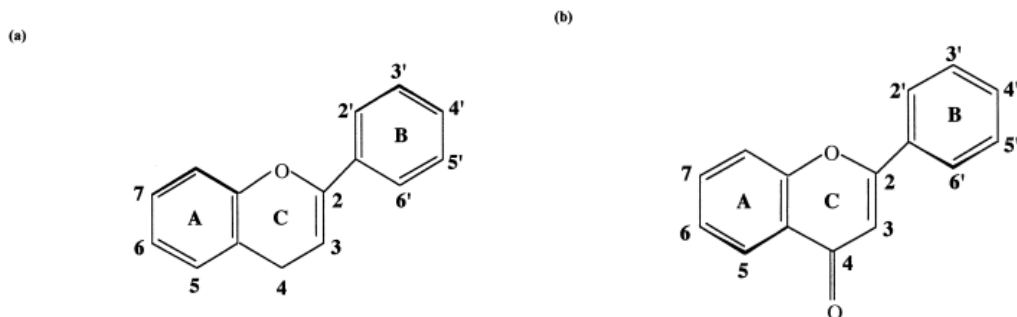
TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Flavonoid

Flavonoid terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh tetapi beberapa kelas lebih tersebar daripada yang lainnya. Flavon dan flavonol terdapat di alam sedangkan isoflavon dan biflavonol hanya terdapat pada beberapa suku tumbuhan. Flavonoid mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV-Vis (2).

Struktur flavonoid didasarkan pada inti flavonoid (Gambar 1a), yang terdiri dari tiga cincin fenolik disebut sebagai cincin A, B, dan C. Cincin benzen A terkondensasi dengan cincin C, pada C-2 berikatan dengan benzen cincin B sebagai substituen. Cincin C mungkin Piran heterosiklik, yang menghasilkan flavanol (katekin) dan antosianidin, atau piran, yang menghasilkan flavonol, flavon, dan flavanon. Istilah 4-okso-flavonoid yang sering digunakan untuk menggambarkan flavonoid, seperti flavanol (katekin), flavanon, flavonol dan flavon, yang membawa gugus karbonil pada C-4 pada cincin C (Gambar 1b). Sifat kimia dari flavonoid tergantung pada struktur kelas, tingkat hidroksilasi, substitusi dan konjugasi lainnya, dan tingkat polimerisasi. Pada tumbuhan, flavonoid relatif tahan terhadap panas, kekeringan dan derajat keasaman yang sedang. Stabilitas cahaya dari molekul flavonoid tergantung pada sifat dari gugus hidroksil yang

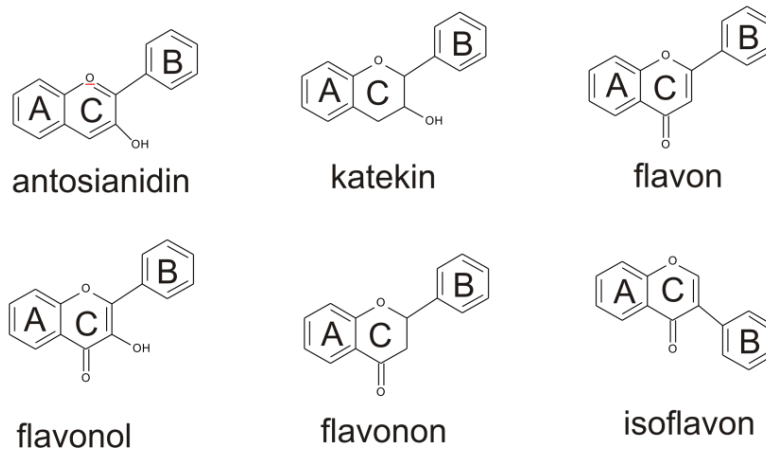
melekat pada C-3 cincin C. Tidak adanya glikosilasi pada gugus hidroksil ini menyebabkan stabilitas cahaya yang lebih tinggi pada molekul (9).



Gambar 1. (a) inti flavan dan (b) inti 4-okso-flavonoid (9).

Flavonoid dapat diklasifikasikan menurut jalur biosintesisnya. Beberapa flavonoid merupakan senyawa lanjutan atau senyawa akhir dari biosintesis, contohnya khalkon, flavonon, flavonon-3-ols dan flavan-3,4-diols. Golongan lain hanya diketahui senyawa akhir dari biosintesisnya seperti antosianin, flavon, flavonol. Dua kelas dari flavonoid memiliki 2-fenil yang berdampingan dari isomerisasi flavonoid pada 3 posisi (isoflavon) dan pada 4 posisi (neoflavon) (10).

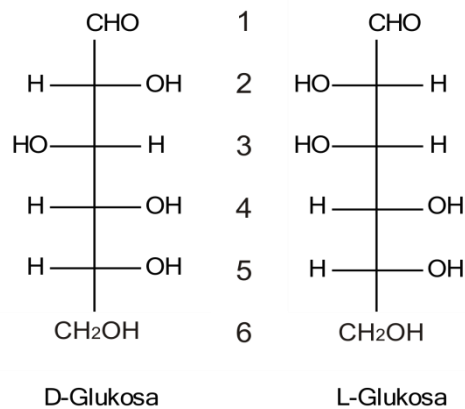
Aktivitas biologis flavonoid dan metabolitnya tergantung pada struktur kimianya dan variasi gugus pada molekulnya. Struktur dasar dari inti flavonoid memungkinkan untuk banyak pola substitusi pada cincin A, B, dan C, sehingga membentuk berbagai subkelompok. Flavonoid dibagi menjadi beberapa kelas sesuai dengan tingkat oksidasi pada cincin C, yang meliputi antosianidin, flavanol (katekin), flavon, flavonol, flavanon, dan isoflavonoid (Gambar 2). Flavon dan flavonol telah diidentifikasi pada hampir semua tanaman, dengan hidroksilasi cincin B pada posisi C-3 dan C-4 (9).



Gambar 2. Golongan-golongan utama flavonoid (9).

II.1.1 Klasifikasi senyawa gula

Karbohidrat memainkan peran penting dalam banyak proses biologis sebagai senyawa penyimpanan energi dan juga berfungsi dalam banyak reaksi (11). Gula sederhana dapat dibagi menjadi beberapa jenis menurut jumlah atom karbonnya. gula dengan tiga karbon (triosa), empat karbon (tetrosa), lima karbon (pentosa) dan enam karbon (heksosa), gula ini disebut monosakarida (12). Bentuk dari monosakarida ini biasanya dalam bentuk D- dan dalam bentuk L- (gambar 3) dan molekul kiral dalam bentuk D- sangat banyak dalam karbohidrat mamalia (12).

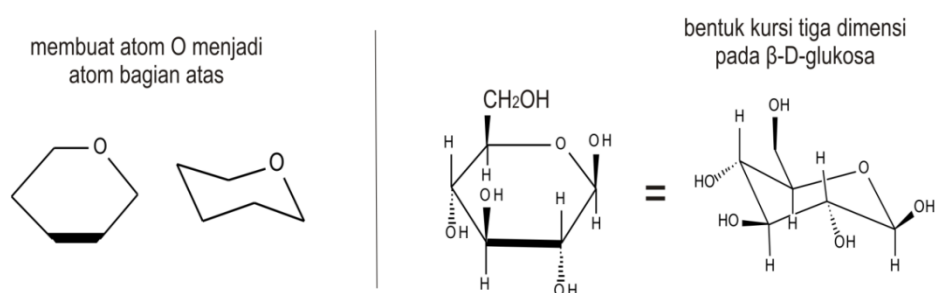


Gambar 3. bentuk D-Glukosa dan L-Glukosa (11)

Aldosa adalah monosakarida yang memiliki gugus aldehid sedangkan ketosa memiliki gugus keton. Contoh: aldohexosa (D-glukosa), Kethexosa (D-fruktosa), aldopentosa (D-ribosa), kethexosa (D-xillulosa) (11).

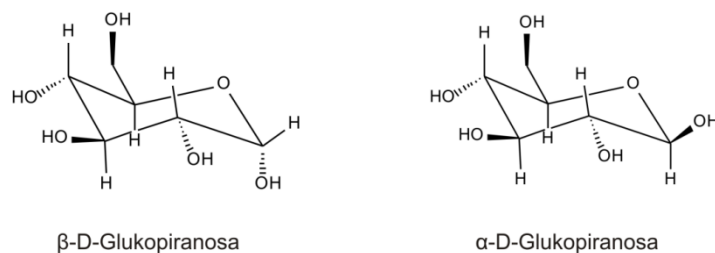
Bentuk dari tiga dimensi dari D-glukosa sangat diperlukan karena formasi kursi enam atom karbon yang membentuk cincin memberikan penampakan yang lebih baik. Glukosa memiliki banyak sekali substitusi atom hidrogen pada posisi ruang yang sejajar sehingga membuat senyawa ini menjadi sangat stabil dan dapat mewakili dari golongan monosakarida. Bentuk anomer β merupakan bentuk isomer yang paling banyak dijumpai karena gugus hidroksil juga berada pada posisi yang sejajar (12).

Di bawah ini menggambarkan proses konversi proyeksi Haworth dua dimensi menjadi bentuk konformasi kursi tiga dimensi (gambar 4).



Gambar 4. bentuk tiga dimensi konformasi kursi β -D-glukosa (12)

Anomer dari gula merupakan pasangan molekul gula yang hanya berbeda dalam satu pusat tertentu, misalnya α -D-glukopiranosida dan β -D-glukopiranosida (gambar 5) (13).



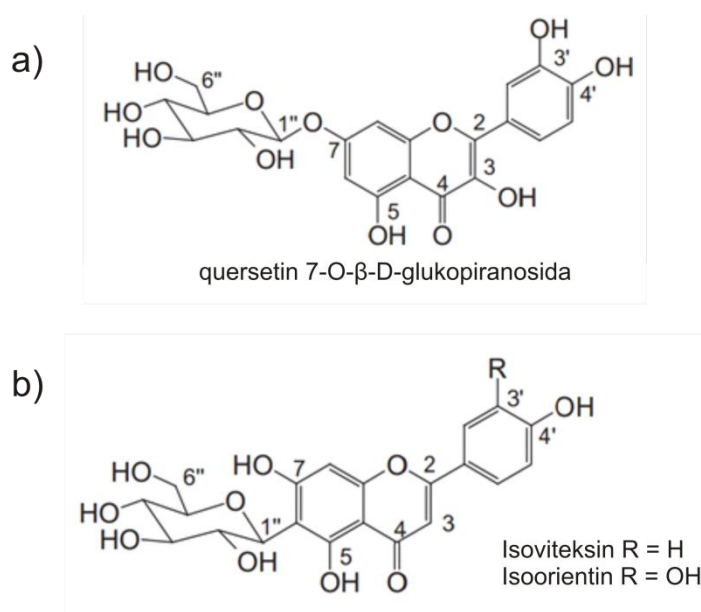
Gambar 5. bentuk konformasi α -D-Glukopiranososa dan β -D-Glukopiranososa (13)

II.1.2 Flavonoid Glikosida

Struktur flavonoid sangat berbeda ketika berada pada klasifikasi utama dan pada substitusi yang meliputi glikosilasi, hidrogenasi, hidroksilasi, malonilasi, metilasi, dan sulfasi. Pola konjugasi, glikosilasi, metilasi dapat membentuk senyawa yang sangat kompleks, dengan memodifikasi hidrofilitas molekul dan sifat biologis dapat meningkatkan berat molekul dari flavonoid. Molekul flavonoid tidak melekat pada gugus gula yang disebut sebagai bentuk aglikon, sedangkan molekul flavonoid dengan gugus gula disebut flavonoid glikosida. Flavonol dan flavon terdapat dalam makanan sebagai O-Glikosida. Dari kelas flavonoid utama, flavonol mendominasi dalam buah-buahan dengan berbagai glikosida telah teridentifikasi, sedangkan pada sayuran didominasi oleh quersetin glikosida (9).

Gugus gula dalam bentuk glikosida dapat berikatan dengan aglikon pada beberapa jenis atom, lebih banyak yang berikatan pada atom oksigen (O-glikosida). Dapat juga berikatan dengan atom karbon (C-glikosida), atom nitrogen (N-glikosida), atau atom sulfur (S-glikosida). Glikosida dapat berupa glukosa dan disebut sebagai glukosida, begitu

pula dengan senyawa gula lain seperti fruktosa atau galaktosa dan glikosidanya disebut sebagai fruktosida atau galaktosida. Glikosida dapat diklasifikasikan berdasarkan tipe struktur dari aglikonnya (10). Sebagai contoh: (Gambar 6a) flavonoid O-glikosida (quersetin 7-O- β -D-glukopiranosida) dan (gambar 6b) flavonoid C-glikosida (isoviteksin dan isoorientin).



Gambar 6. (a) flavonoid O-glikosida dan (b) flavonoid C-glikosida(10).

Ketika glikosida terbentuk, biasanya glikosilasi terikat pada molekul flavonol di posisi C-3 dan lebih jarang terjadi pada posisi C-7. D-glukosa adalah residu gula yang paling biasa ditemukan. Namun, tidak menutup kemungkinan substitusi karbohidrat lainnya seperti arabinosa, galaktosa, glukoramnosa, lignin, L-ramnosa, dan xilosa juga biasanya terjadi. misalnya, quersetin bisa dihubungkan dengan ramnosa 3-O-glikosida untuk menghasilkan quersitrin, atau glukoramnosa untuk menghasilkan rutin (12). Selain flavonoid glikosida dalam bentuk monosakarida, telah

dilaporkan pula flavonoid yang berikatan dengan gugus gula dalam bentuk disakarida, trisakarida, dan tetrasakarida (14).

II.2 Elusidasi struktur

Pada banyak kasus ekstraksi dan isolasi dari senyawa alam memiliki tujuan akhir yaitu identifikasi senyawa atau pada kesimpulannya elusidasi struktur dari senyawa isolat. Bagaimanapun elusidasi struktur dari senyawa isolat berasal dari tanaman, jamur, bakteri atau organisme lain yang pada umumnya dapat dikonsumsi dan terkadang berasal dari penelitian senyawa alam. Metode spektroskopi digunakan untuk mendapatkan informasi tentang struktur kimia, namun interpretasinya membutuhkan orang yang ahli dan memiliki pengetahuan yang memadai tentang spektroskopi dan memiliki pengalaman di bidang kimia bahan alam. Jika komponen target diketahui biasanya lebih mudah karena dapat dibandingkan dengan literatur atau dibandingkan dengan sampel standar. Namun, jika komponen target tidak diketahui dan merupakan senyawa alam yang kompleks maka dibutuhkan pengetahuan yang lebih luas mengenai varietas secara fisik, kimia dan teknik spektroskopi. Di bawah ini merupakan teknik spektroskopi yang biasanya digunakan dalam menentukan struktur dari bahan alam (15):

1. Spektrofotometri *Ultraviolet-visible* (UV-Vis), menyediakan informasi tentang gugus kromofor, beberapa senyawa alam seperti flavonoid, isoquinolon alkaloid, dan kumarin memiliki karakteristik spesifik dari karakteristik puncak absorpsinya.

2. Spektrofotometri *Infrared* (IR), digunakan untuk menentukan gugus fungsional yang berbeda seperti contoh: -C=O, -OH, -NH₂, aromatis yang ada pada molekul.
3. Spektroskopi massa memberikan informasi tentang massa molekul, pola pemecahan dan bentuk molekul. Biasanya digunakan teknik seperti *impact mass spectrometry* (EIMS), *Chemical ionization mass spectrometry* (CIMS), *electrospray ionization mass spectrometry* (ESIMS), dan *fast atom bombardment mass spectrometry* (FABMS).
4. NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), menyatakan informasi nomor dan tipe dari proton dan karbon (termasuk elemen lain seperti nitrogen dan fluor) yang berada molekul dan hubungan antar atom. Penelitian menggunakan NMR dapat diklasifikasikan menjadi dua kategori:
 - a. Tipe satu dimensi yang terdiri dari ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹³C-DEPT, ¹³C-PENDANT.
 - b. Tipe dua dimensi yang terdiri dari ¹H-¹H COSY, ¹H-¹H DQF-COSY, ¹H-¹H ROESY, ¹H-¹H TOCSY (HOHAHA), ¹H-¹³C HMBC, ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HSQC, HSQC-TOCSY.

II.3 Spektrofotometri *Ultraviolet-Visibel* (UV-Vis)

Molekul menyerap energi dalam ultraviolet dan spektrum sinar tampak bergantung pada struktur elektronik dari molekul. Energi serapan menghasilkan elevasi elektron dari orbital dasar ke orbital yang lebih tinggi tereksitasi (16). Batas sensitivitas mata manusia adalah sinar tampak atau terlihat (*Visible*) yaitu dengan panjang gelombang (λ) antara 4×10^{-7} m

(400 nm) berupa cahaya violet/ungu/lembayung sampai 8×10^{-7} m (800 nm) atau merah (7).

Panjang gelombang dinyatakan dalam unit nanometer (nm), $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ dan panjang gelombang maksimum (λ_{max}) antara 200- 380 nm. Oksigen di atmosfer menyerap pada 185-200 nm atau spektrofotometer UV-Vis vakum. Energi diserap dalam daerah UV menghasilkan transisi elektron valensi dalam molekul. Transisi ini terjadi terdiri dari elektron yang tereksitasi dari orbital molekul (biasanya orbital ρ dan π) ke energi orbital yang lebih tinggi (antibonding ρ^* dan π^*), antibonding diberi tanda asterisk. Perpindahan dari ikatan orbital π ke antibonding orbital π^* dinyatakan sebagai $\pi \rightarrow \pi^*$ (16).

Hubungan selisih antara energi pada kedudukan dasar dan tereksitasi (ΔE) dengan panjang gelombang maksimum (λ_{max}) dan kecepatan cahaya (C), sebagai berikut:

$$\Delta E = \frac{C}{\lambda_{\text{max}}} \quad \text{atau} \quad \lambda_{\text{max}} = \frac{C}{\Delta E}$$

Intensitas serapan diturunkan dari aturan Lambert-Beer yang menyatakan hubungan antara absorbansi, ketebalan sampel, dan konsentrasi larutan, hubungan ini dinyatakan sebagai berikut:

$$\text{Log}_{10} I_0/I = \epsilon l C$$

I_0 adalah intensitas energi radiasi yang ditembakkan pada sampel, I adalah intensitas dari radiasi yang dipancarkan dari sampel, C adalah konsentrasi dalam mol/L, sedangkan l adalah panjang kuvet. $\text{Log } I_0/I$

disebut absorptansi, ϵ dikenal sebagai koefisien ekstinsi molar dan dinyatakan sebagai $1000 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (16).

Ada beberapa istilah tertentu yang biasanya digunakan dalam spektrofotometri UV-Vis (16):

- a. Kromofor adalah gugus tak jenuh kovalen (σ) yang menyebabkan serapan elektronik (contoh C=C, C=O, dan NO_2).
- b. Auksokrom adalah gugus jenuh yang bila terikat pada suatu kromofor akan mempengaruhi panjang gelombang (λ) dan intensitas serapan maksimum (contoh OH, NH_2 dan Cl).
- c. Pergeseran batokromik (pergeseran merah), pergeseran serapan ke arah panjang gelombang (λ) lebih panjang akibat pengaruh substituen atau pelarut.
- d. Pergeseran hipsokromik (pergeseran biru), pergeseran serapan ke arah panjang gelombang lebih pendek akibat substituen atau pelarut.
- e. Efek hiperkromik adalah efek yang mengakibatkan kenaikan intensitas serapan.
- f. Efek hipokromik adalah efek yang mengakibatkan penurunan intensitas.

Kromofor yang penting adalah ikatan rangkap dua atau ikatan rangkap yang terkonjugasi, ikatan rangkap terisolasi (tak terkonjugasi) memberikan serapan maksimum pada kurang lebih $\lambda_{\text{max}} 165 \text{ nm}$ ($\pi \rightarrow \pi^*$), jika orbital molekul dari dua ikatan rangkap akan dihasilkan energi lebih kecil ($\pi_2 \rightarrow \pi^*_3$) yang menghasilkan $\lambda_{\text{max}} 217 \text{ nm}$ (16).

II.4 Spektrofotometri *Infrared* (IR)

Sinar infra merah (*Infrared* = IR) mempunyai bilangan gelombang yang lebih panjang dibandingkan UV-Vis, sehingga energinya lebih rendah dengan bilangan gelombang antara $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ atau sekitar ($1,7 \times 10^{-3}\text{ cm}$ sampai dengan $2,5 \times 10^{-4}\text{ cm}$). Sinar IR hanya dapat menyebabkan vibrasi (getaran) pada ikatan baik berupa rentangan (*stretching* = str) maupun berupa bengkokan (*bending* = bend). Energi vibrasi untuk molekul adalah spesifik, yang menunjukkan bilangan gelombangnya juga spesifik. Namun pada prakteknya spektrofotometri IR lebih diperuntukkan untuk menentukan adanya gugus-gugus fungsional utama dalam suatu sampel yang diperoleh berdasarkan bilangan gelombang yang dibutuhkan untuk vibrasi tersebut (7).

Berikut ini adalah langkah-langkah yang biasanya digunakan dalam analisis spektrum IR (7):

1. Gugus karbonil C = O terdapat pada daerah $1820\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ dan puncak ini biasanya terkuat dengan penampilan lebar tajam dan sangat karakteristik.
2. Bila gugus C = O ada maka uji langkah-langkah berikut, bila tidak ada lanjutkan pada langkah no. 3.
 - a. Asam karboksilat akan memunculkan serapan OH pada bilangan gelombang $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$.
 - b. Amida akan muncul serapan N-H yang medium dan tajam pada gelombang 3500 cm^{-1} .

- c. Ester akan memunculkan serapan C-O tajam dan kuat pada bilangan gelombang 1300-1000 cm^{-1} .
 - d. Anhidrida akan memunculkan serapan C=O kembar 1810 cm^{-1} dan 1760 cm^{-1} dan akan lebih spesifik bila menggunakan FTIR.
 - e. Aldehid akan memunculkan C-H aldehid intensitas lemah tapi tajam pada 2850-2750 cm^{-1} baik yang simetri maupun antisimetri.
 - f. Keton bila semua yang di atas tidak muncul.
3. Bila serapan karbonil tidak ada maka.
- a. Ujilah alkohol (-OH), Serapan melebar pada sekitar 3500-3300 cm^{-1} (dikonformasi dengan asam karboksilat) dan diperkuat dengan serapan C-O pada sekitar 1300-1000 cm^{-1} .
 - b. Ujilah amina (N-H), Serapan medium pada sekitar 3500 cm^{-1} (dikonformasi dengan amida).
 - c. Ujilah eter (C-O), Ujilah serapan pada sekitar 1300-1000 cm^{-1} (dikonformasi dengan alkohol dan ester).
4. Ikatan C=C alkena dan aromatis.
- Untuk alkena serapan pada 1650 cm^{-1} , sedangkan untuk aromatis sekitar 1650-1450 cm^{-1} (lebih lemah karena adanya delokalisasi elektron), atau yang dikenal dengan resonansi. Serapan (C-H)_{alifatik} (sp^2 -s) alkena akan muncul dibawah 3000 cm^{-1} , sedangkan (C-H)_{vinilik} (sp^2 -s) benzen akan muncul diatas 3000 cm^{-1} .

5. Ikatan C=C alkuna dan C=N nitril.

Gugus C=N akan muncul sekitar 2250 cm^{-1} medium dan tajam, sedangkan serapan C=C lemah tapi tajam akan muncul pada sekitar 2150 cm^{-1} . Untuk alkuna diuji C-H_{asetinilik} (sp-s) atau terminal sekitar 3300 cm^{-1} .

6. Gugus nitro NO₂

Serapan kuat pada sekitar $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ dari (N=O)_{anti-simetri} dan juga pada $1390\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ untuk (N=O)_{simetri}.

7. Hidrokarbon jenuh.

Hidrokarbon jenuh baik alkana maupun sikloalkana sebenarnya tidak mempunyai gugus fungsional yang spesifik. Namun bila informasi satu sampai enam tidak ada maka patut diduga bahwa spektra IR tersebut adalah hidrokarbon jenuh.

Tabel 1. Rentang serapan IR menurut hukum Hooke (17)

Tipe ikatan	Gaya konstan (f) dyne/cm	Rentang serapan (cm ⁻¹)	
		Hasil perhitungan	Hasil penelitian
C-O	$5,0 \times 10^5$	1113	1300-800
C-C	$4,5 \times 10^5$	1128	1300-800
C-N	$4,9 \times 10^5$	1135	1250-1000
C=C	$9,7 \times 10^5$	1657	1900-1500
C=O	$12,1 \times 10^5$	1731	1850-1600
C≡C	$15,6 \times 10^5$	2101	2150-2100
C-D	$5,0 \times 10^5$	2225	2250-2080
C-H	$5,0 \times 10^5$	3032	3000-2850
O-H	$7,0 \times 10^5$	3553	3800-2700

II.5 Spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Untuk melengkapi bagian lain dari suatu struktur molekul organik yang tidak diketahui (*unknown*), maka digunakan spektroskopi *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) (7).

II.5.1 Spektroskopi Proton (^1H) NMR

Berdasarkan azas Pauli bahwa inti berpasangan sebagai anti paralel ($\uparrow\downarrow$) dan bila inti ditempatkan pada suatu medan magnet, maka suatu inti yang berlawanan arah dengan medan magnet akan menempati kedudukan energi lebih tinggi atau tereksitasi (*excitation state*), sedangkan yang satu lagi tetap pada kedudukan energi lebih rendah atau dasar (*ground state*) (16).

Kedudukan proton tidak dinyatakan dalam frekuensi tetapi dinyatakan dalam pergeseran kimia (δ). Tetra Metil Silan (TMS) digunakan sebagai standar dalam (0 ppm). Semakin besar kerapatan elektron (σ) maka makin kecil frekuensinya, makin kecil pula pergeseran kimia proton tersebut (δ), sebaliknya makin kecil kerapatan elektron (σ) maka makin besar frekuensinya dan makin besar pula pergeseran kimia proton tersebut (16).

Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pergeseran kimia anatara lain: (16).

1. Faktor induktif
2. Faktor anisotropik
3. Faktor sterik

4. Ikatan hidrogen
5. Pelarut yang digunakan

Suatu proton bila berinteraksi dengan proton lainnya akan memberikan kopling konstan yang sama dan besarnya tidak terpengaruh dengan besar magnet yang digunakan tetapi bergantung pada: (9).

1. Besar sudut dihidral (θ)
2. Substituen, senyawa dengan substituen elektronegatif yang terikat pada atom karbon yang sama, perubahan kopling konstan relatif kecil.



3. Tegangan sudut.
4. Panjang ikatan, pada ikatan C-C dari aromatik (misal: benzen) sifat ikatan rangkapnya kurang (efek resonansi) dibandingkan dengan ikatan rangkap (olefin) murni, akibatnya panjang ikatan pada C-C aromatik lebih panjang ini menyebabkan 3J pada benzen (8Hz) lebih kecil dibanding dengan 3J pada sikloheksan (8,8 – 10,5 Hz).

Ada 4 langkah yang dapat digunakan dalam menginterpretasikan suatu spektrum ${}^1\text{HNMR}$ yaitu sebagai berikut. (7)

1. Mengidentifikasi jumlah sinyal menjelaskan ada berapa macam tipe proton yang terdapat dalam suatu molekul.
2. Kedudukan sinyal menjelaskan tentang lingkungan elektronik setiap tipe proton atau secara kuantitatif mengetahui harga pergeseran kimia (δ ppm).

3. Intensitas sinyal merupakan perbandingan empiris dari setiap proton.
4. Pemecahan spin (*Splitting*) menjelaskan suatu tipe proton pecah menjadi $(n + 1)$ dengan ketinggian tiap pemecahan sesuai dengan pola segitiga pascal.

II.5.1.1 Pemilihan Pelarut Pada ^1H NMR

Pelarut yang ideal untuk NMR tidak boleh mengandung proton dan bersifat inert, titik didih rendah dan tidak mahal. Deuterasi pelarut perlu dilakukan pada instrumen modern karena hal ini tergantung pada sinyal deuterium untuk mengunci atau menstabilkan medan magnet. Instrumen memiliki sebuah "channel" deuterium yang terlihat konstan dan terkunci pada frekuensi pelarut deuterasi. Deuterasi kloroform (CDCl_3) merupakan pelarut yang biasanya digunakan dan tidak mengubah keadaan analisis. Sinyal proton yang kecil dan tajam pada δ 7,26 dari CHCl_3 yang tidak murni terkadang memperlihatkan hasil yang tidak bagus. Untuk setiap pelarut sampel, CDCl_3 dapat berisi 100% isotop murni (17).

Daftar pelarut yang umum dan bisa digunakan pada penentuan posisi proton harus dimurnikan seperti CHCl_3 menjadi CDCl_3 memiliki pergeseran kimia yang bergeser $\pm 0,1$ ppm. Untuk pelarut yang lebih polar seperti d_6 -DMSO, d_4 -metanol, dan d_6 -aseton bergesernya lebih besar $\pm 0,3$ ppm, sedangkan bila diganti dengan d_6 -benzen akan bertambah menjadi $\pm 1,0$ ppm (16).

Residu magnetik besi yang terdapat pada sampel menyebabkan hasil puncak yang kuat dan lebar karena reduksi dari waktu relaksasinya.

sumber dari pengotor ini berasal dari kerang air, bahan nikel, dan partikel dari logam perabotan. Hal ini dapat diatasi dengan cara filtrasi untuk membuang logam-logam tersebut (17).

Pada spektrum proton NMR sering dijumpai sinyal yang melebar mewakili beberapa proton yang disebabkan oleh pergeseran kimia yang perbedaannya sangat kecil. Contoh senyawa heksanol dengan empat gugus metilen yang pergeseran kimianya hampir sama sehingga tidak bisa dibedakan. Untuk memisahkan sinyal keempat metilen tersebut maka digunakan reagen penggeser lantanida yang dapat menarik atau mendorong elektron secara kuat. Contoh reagen ini yaitu heptafloro-dimetil oktadionat (suatu senyawa kompleks) dengan logam europium (Eu) yang dapat menarik elektron atau dengan logam praseodimium (Pr) yang dapat mendorong elektron (16).

II.5.2 Spektroskopi ^{13}C -NMR

Kelimpahan atom ^{13}C dialam sangat kecil kira-kira 1,11% dibanding dengan ^1H (99,98%), karena itu perkembangan ^{13}C NMR lebih lambat disbanding dengan ^1H NMR. Pergeseran kimia ^{13}C NMR rentangnya jauh lebih lebar (0-230 ppm) dibandingkan dengan ^1H NMR yang rentangnya (0-10 ppm) kadang-kadang sampai 13-14 ppm bila ada ikatan hidrogen (16).

konstanta kopling ^{13}C - ^1H besarnya antara 125 dan 250 Hz tergantung dari karakter ikatan C dengan C dari ikatan C dan H dan besarnya konstanta kopling. Untuk gugus metil (CH_3 -) bentuk splitting

sesuai dengan rumus $(2n+1)$ dan karena n jumlahnya 3 (n = jumlah H yang mengikat C) maka dihasilkan kuartet, untuk metilen ($-\text{CH}_2-$) dihasilkan triplet ($n= 2$), metin ($-\text{CH}-$) bentuknya doublet ($n= 1$), sedangkan C kuartener ($-\text{C}-$) dihasilkan singlet ($n= 0$) (16).