

SENYAWA ASAM 2- METILESTER-1-H-PIROL-4-KARBOKSILAT DALAM EKSTRAK ETIL ASETAT BUAH SALAK VARIETAS BONGKOK SEBAGAI ANTIOKSIDAN DAN ANTIHYPERURICEMIA

[Studies on 2-Methylester-1-H-Pyrolle-4-Carboxylic Acid Compound in Ethylacetate Extract of Snake Fruit Variety Bongkok as Antioxidant and Anthyperuricemic]

Leni Herliani Afrianti ^{1)*}, Elin Yulinah Sukandar ²⁾, Slamet Ibrahim ³⁾, dan I Ketut Adnyana ²⁾.

- 1) Departemen Teknologi Pangan Universitas Pasundan, Bandung.
2) Farmakologi-Farmasi Klinik, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung.
3) Farmasi kimia Research Group, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung.

Diterima 1 Juli 2009 / Disetujui 20 Mei 2010

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the antioxidant and antihyperuricemia activity of ethyl acetate extract of snake fruit (*Salacca edulis* Reinw.) var. Bongkok. The research methods used in this study comprised of three stages. First stage, the isolation processes, consist ed of maceration, fractionation, and purification using several techniques of chromatography. The chemical structures of the isolated compounds were determined based on UV, IR, 1-D NMR, and 2-D NMR spectral data. The ethyl acetate extract of snake fruit var. Bongkok isolated was a new compound 2-methylester-1-H-pyrolle-4- carboxylic acid. In the second stage the antioxidant activity of the extract and the isolated compounds were measured by 1,1 diphenol (DPPH) method. The antioxidant activity of the extracts and the isolated compounds were expressed as IC₅₀. The ethyl acetate extracts at concentrations of 0.2, 2, 20, 200, 400, and 2000 µg/mL showed inhibition of 9.67, 4.47, 41.89, 96.06, 82.54, and 90.60 % respectively, with an IC₅₀ of 1.6 µg/mL. Ascorbic acid standards at the same concentration range showed an IC₅₀ of 0.54 µg/mL. Meanwhile, at the same concentrations the 2-methylester-1-H-pyrolle-4-carboxylic acid showed free radical inhibition of 17.48, 21.48, 18.14, 31.87, and 62.34 % respectively, with an IC₅₀ of 3.27 µg/mL. During the third stage, the antihyperuricemic properties of the extracts and the isolated compound were examined in vitro using inhibition of xanthin oxidase method. The ethyl acetate extracts at concentrations of 0.01, 0.02, 0.2, 2, and 2000 µg/mL showed xanthin oxidase inhibition of 49.24, 49.58, 50.28 and 52.26 % respectively, with an IC₅₀ of 24.75 µg/mL. At the same concentrations, the 2-methylester-1-H-pyrolle-4- carboxylic acid, showed xanthin oxidase inhibition of 27.7, 30.5, 37.3, 50.27 and 50.55 % respectively, with an IC₅₀ of 48.86 µg/mL. Allopurinol as a standard drug showed an IC₅₀ of 0.92 µg/mL.

Keyword : 2-methylester-1-H-pyrolle-4- carboxylic acid compound, ethyl acetate extract of snake fruit var. Bongkok, antioxidant activity, antihyperuricemia, IC₅₀.

PENDAHULUAN

Kajian terhadap senyawa aktif buah salak dari berbagai varietas masih belum banyak diketahui. Buah salak var. Manonjaya mengandung beberapa asam antara lain asam suksinat, asam askorbat, asam adipat, asam malat dan asam sitrat (Muchtadi, 1978). Menurut Leong dan Shui (2002), rata-rata buah salak mengandung asam askorbat $2,4 \pm 1,5$ mg/100g. Sedangkan kadar asam askorbat pada buah salak Bongkok adalah 8,37 mg/100 g berat bahan (Afrianti *et al.*, 2006). Menurut Supriyadi *et al.*, (2002), ¹salak var. Pondoh mengandung sukrosa, glukosa, fruktosa, metil ester dari asam butanoat, 2-asam metil butanoat, asam heksanoat, asam pentanoat dan asam karboksilat lainnya.

Pada umumnya buah-buahan mengandung zat antioksidan yang mempunyai struktur kimia berbeda seperti asam askorbat, asam amino, β karoten, likopen, melanoidin, asam organik tertentu, zat pereduksi, peptida, fosfatida, polifenol, tanin,

tokoferol, polifenol dan flavonoid (Benavente-Gracia *et al.*, 1997; Ferrari dan Torres, 2003; Singh *et al.*, 1995; Leong dan Shui, 2001; Marin *et al.* 2002). Senyawa antioksidan dalam buah-buahan dapat digunakan untuk mencegah dan memelihara sistem kekebalan tubuh, memperlambat proses penuaan, mengatasi stress, mencegah penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, disfungsi otak, dan katarak (Zhu *et al.*, 2004; Feskanich *et al.*, 2000).

Salah satu penyakit generatif adalah pirai, penyakit ini ditandai dengan terjadinya hiperurikemia yaitu kondisi asimtomatik dimana kadar asam urat dalam darah melebihi normal. Kadar normal asam urat dalam darah seorang pria adalah 3,4-7,0 mg/dL, sedangkan wanita lebih rendah yaitu 2,4-5,7 mg/dL. Asam urat merupakan produk akhir dari metabolisme purin. Tingginya kadar asam urat di dalam darah disebabkan banyaknya sisa-sisa pembuangan hasil metabolisme purin, sedangkan ekskresi asam urat melalui urin terlalu sedikit (Katzung, 2002).

Enzim penting yang berperan dalam sintesis asam urat adalah xantin oksidase yang sangat aktif bekerja dalam hati, usus halus dan ginjal. Tanpa bantuan enzim ini, asam urat tidak

Korespondensi penulis :

*E-mail : leni_priyatno@yahoo.com

dapat dibentuk. Xantin oksidase adalah kompleks metalo-flavoprotein yang mengoksidasi hipoksantin menjadi xantin, dan xantin menjadi asam urat (Fields *et al.*, 1996). Selama proses oksidasi terjadi pembentukan radikal-radikal bebas yang dapat meningkatkan aktivitas xantin oksidase dan kadar asam urat dalam tubuh akan meningkat pula. (Al-Qirim *et al.*, 2002; Fields *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2004).

Dari penelusuran pustaka, buah salak secara umum memiliki aktivitas antioksidan. Beberapa varietas buah salak mengandung senyawa bioaktif berupa senyawa antioksidan (Muchtadi, 1978; Suter, 1988; Leong dan Shui, 2002; Supriyadi *et al.*, 2002). Kapasitas antioksidan buah tropis seperti mangga adalah $46,7 \pm 4,7$ $\mu\text{mol/g}$ dan salak adalah $72,9 \pm 7,4$ $\mu\text{mol/g}$ (Leontowicz *et al.*, 2006). Akan tetapi sampai saat ini pengujian aktivitas antioksidan dan antihiperurikemia dari buah salak var. Bongkok belum dilaporkan.

Oleh karena itu timbul suatu pertanyaan komponen aktif apakah dari buah salak var. Bongkok yang dapat berpotensi sebagai antioksidan dan bagaimana menelaah mekanisme kerja antihiperurikemia dari komponen aktif buah salak (*Salacca edulis* Reinw.) varietas Bongkok. Dengan demikian kajian seperti tersebut di atas sangat perlu dilakukan.

Mengacu pada tinjauan pustaka terhadap komponen kimia dan aktivitas biologi buah salak secara umum, maka dapat diajukan hipotesis bahwa : (1). Buah salak (*Salacca edulis* Reinw.) varietas Bongkok diduga memiliki aktivitas antioksidan dan (2). Berdasarkan aktivitas antioksidan dalam buah salak Bongkok diduga memiliki efek untuk menghambat aktivitas xantin oksidase, yang pada gilirannya memiliki efek antihiperurikemia.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengungkap struktur komponen aktif yang berkhasiat antioksidan dan antihiperurikemia dari komponen aktif dalam ekstrak etil asetat buah salak (*Salacca edulis* Reinw.) var. Bongkok.

Pendekatan yang dilakukan untuk mewujudkan tujuan penelitian di atas meliputi isolasi, penentuan struktur senyawa hasil isolasi ditetapkan berdasarkan data spektroskopi, yang meliputi spektrum UV, IR, RMI 1-D, dan RMI 2-D, pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* pada ekstrak dan isolat dengan mengukur serapan DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) (Hsu *et al.*, 2003), dan antihiperurikemia dengan metode inhibisi enzim xantin oksidase (Vogel, 1996; Punched, 1996; Zhu, *et al.*, 2004).

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah Buah salak varietas Bongkok yang berasal dari desa Conggeang, kabupaten Sumedang. Buah salak Bongkok dipanen 5 bulan setelah pembungaan, mempunyai kulit buah mengkilap dan susunan sisiknya tampak merenggang, bila dipetik mudah terlepas dari tandannya. DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*), xantin oksidase dari Sigma (USA), xantin dari Sigma (USA), air suling, etil asetat, dan bahan-bahan kimia serta pereaksi-pereaksi yang digunakan untuk analisis profil fitokimia dari laboratorium SINDO. Peralatan yang digunakan adalah neraca analisis, tunnel drier, tabung

maserasi, bejana kromatografi, rak tabung, lemari pendingin, spektrofotometer (Spectronic 21 D), spektrofotometer (HP 8453), alat penguap vakum putar, oven, tanur, Spektrum ultraviolet (UV) diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer Cary Varian 100 Conc., spectrum inframerah ditetapkan dengan menggunakan alat spektrometer Perkin Elmer Spectrum One FT-IR, spectrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR diukur dengan menggunakan spektrometer JEOL LTD. ECP400 dan ECP500 DELTA_NMR, beroperasi pada 399,78 MHz (^1H) dan 100,53 MHz (^{13}C).

Metode

Penelitian ini terbagi dalam tiga tahap. Tahap pertama, pembuatan serbuk simplisia dilanjutkan dengan ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan pemurnian, kemudian karakterisasi struktur senyawa. Tahap kedua dilakukan pengujian antioksidan secara *in vitro* pada ekstrak dan isolat. Tahap ketiga pengujian antihiperurikemia secara *in vitro* dari ekstrak dan isolat yang berkhasiat antioksidan.

Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi ekstrak etil asetat

Buah salak Bongkok dilakukan pengeringan, penggilingan untuk mendapatkan serbuk simplisia buah salak Bongkok. Serbuk kering simplisia buah di ekstraksi dilakukan dengan maserasi-perkolasi pada suhu kamar dengan pelarut etil asetat selama 3 x @ 24 jam. Selanjutnya difraksinasi dengan kromatografi dengan kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan silica gel. Langkah awal fraksinasi KCV adalah dengan analisis komponen menggunakan KLT (kromatografi Lapis Tipis) dengan mengamati bercak dari golongan senyawa yang menjadi tujuan isolasi. Pengamatan bercak dapat digunakan di bawah lampu UV panjang gelombang 254 nm dan bantuan pereaksi penyemprot yaitu serum sulfat dan asam sulfat 10%. Pemurnian dilakukan untuk memisahkan fraksi yang mengandung hanya satu komponen utama yaitu KCV, Kromatografi tekan (KT) dan KLT preparatif; semuanya menggunakan silika gel sebagai adsorben. Elusidasi struktur menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Visibel untuk menganalisis adanya gugus kromofor dan gugus fungsi melalui profil spektrum, posisi panjang gelombang absorpsi maksimum dan absortivitanya pelarut tertentu, juga didukung dari data spektrum infra merah, dan NMR.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan diuji berdasarkan daya peredaman radikal bebas *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH). Ekstrak, isolat atau perbandingan asam askorbat, dilarutkan dalam air suling sehingga diperoleh konsentrasi 0,2; 2,0; 20; 200; 400 dan 2000 $\mu\text{g/mL}$. Zat uji terhadap aktivitas radikal bebas DPPH 1 M dilakukan dengan mengukur daya meredam radikal bebas DPPH secara spektrofotometri dengan panjang gelombang 517 nm. Dari persen peredaman yang diperoleh dihitung persamaan regresinya terhadap konsentrasi larutan uji, mengikuti persamaan :

$$Y = aX + b$$

Dimana : Y = % peredaman radikal bebas /DPPH (absorbansi)

X = log konsentrasi larutan uji

Dari semua data hasil percobaan kemudian ditentukan IC₅₀ yaitu konsentrasi inhibisi larutan uji yang mampu meredam 50% radikal bebas DPPH.

Uji Antihiperurikemia secara in vitro

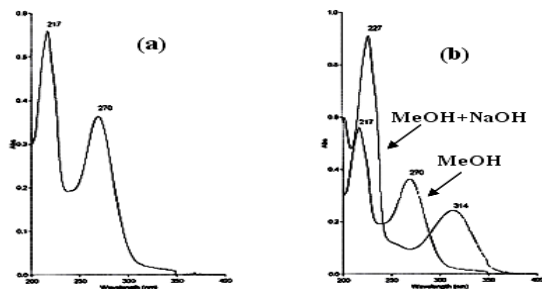
Uji antihiperurikemia dari isolat dan ekstrak etil asetat yang berkhasiat antioksidan secara in vitro. Sampel uji diinkubasi dengan xantin oksidase, EDTA dan bufer fosfat (pH 7,8) dan xantin pada 37°C selama 15 menit. Bahan uji dalam meredam aktivitas xanthin oksidase menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 293 nm. Larutan kontrol tanpa sampel uji, larutan perbandingan adalah alopurinol. Penentuan inhibisi xantin oksidase ditentukan terhadap larutan blanko (Zhu et al.,2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

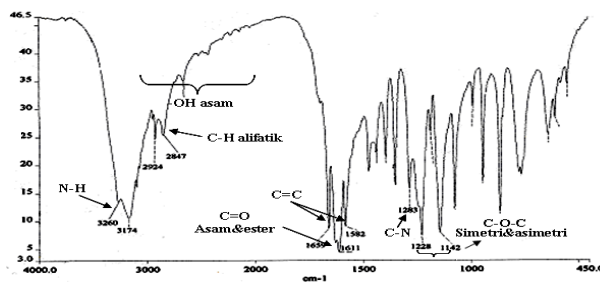
Karakterisasi dan elusidasi senyawa Asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat

Data spektrum UV senyawa 1 (Gambar 1) menunjukkan serapan maksimum pada daerah panjang gelombang λ_{max} 217 dan 270 nm yang mengindikasikan adanya kromofor. Penambahan pereaksi NaOH menyebabkan pergeseran batokromik ke panjang gelombang yang lebih tinggi yaitu pada λ_{max} 227 dan 314 nm. Ester metil pada senyawa tersebut bereaksi dengan NaOH terjadi peristiwa hidrolisis yang membentuk ion karboksilat.

Dari Spektrum IR (Gambar 2) nampak adanya serapan yang lebar pada daerah bilangan gelombang ν_{max} 3100-2500 cm⁻¹ yang berasal dari regang ulur (stretching) gugus OH asam dan serapan pada ν_{max} 3260 dan 3474 cm⁻¹ yang berasal dari regang ulur (stretching) gugus N-H amina sekunder. Selanjutnya, nampak adanya serapan dengan intensitas kuat dan tajam pada ν_{max} 1659 dan 1582 cm⁻¹, yang berasal dari regang ulur (stretching) dua gugus C=C alifatik yang berbeda substituen, sehingga muncul pada daerah yang berbeda. Pada daerah bilangan gelombang ν_{max} 1612 cm⁻¹ nampak adanya sinyal doublet yang sangat kuat dan tajam yang berasal dari regang ulur (stretching) gugus karbonil asam dan ester. Selain itu, spektrum IR juga menunjukkan serapan dari regang ulur (stretching) gugus C-N yang muncul pada ν_{max} 1283 cm⁻¹ dan regang ulur (stretching) gugus C-O-C ester asimetri dan simetri berturut-turut pada ν_{max} 1228 dan 1142 cm⁻¹.

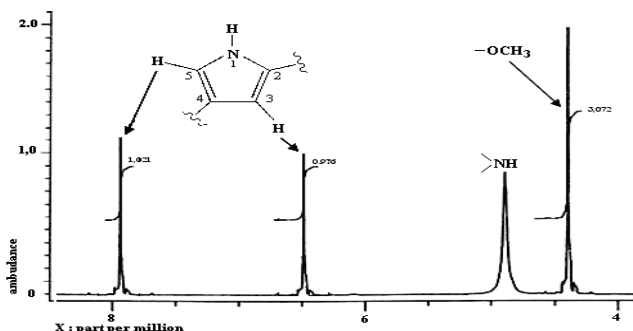


Gambar 1. Spektrum UV senyawa 1, (a) pelarut metanol, (b) pelarut metanol + NaOH



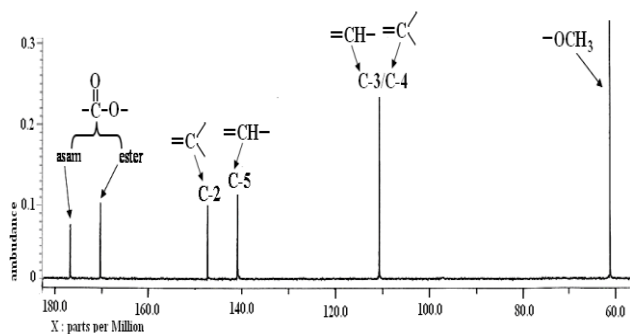
Gambar 2. Spektrum infra merah senyawa 1

Spektrum ¹H-RMI senyawa (1) (Gambar 3) menunjukkan adanya tiga sinyal proton singlet yang terdiri yaitu, satu sinyal proton singlet teroksigenasi yang berasal dari gugus metoksi pada δ_H 4,41 (OCH₃) ppm dan dua sinyal proton singlet vinilik pada δ_H 6,49 (H-3) dan 7,94 (H-4) ppm. Selain itu, dari spektrum ¹H-RMI nampak adanya sinyal singlet yang berasal dari proton amina (NH) pada δ_H 5,60 (NH) ppm. Berdasarkan analisis spektrum COSY, nampak bahwa ketiga sinyal proton tersebut tidak menunjukkan korelasi antara satu dengan yang lain, sehingga dapat disimpulkan bahwa proton-proton tersebut tidak bertetangga.

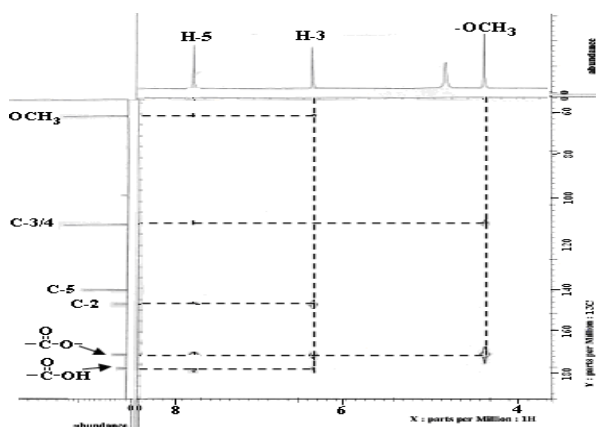


Gambar 3. Spektrum ¹H-RMI senyawa (1)

Dari data spektrum ¹³C-RMI (Gambar 4) nampak adanya enam sinyal yang mewakili tujuh atom karbon yaitu, satu karbon sp³ dan enam karbon sp². Satu sinyal karbon sp³ yang muncul pada δ_C 61,1 ppm berasal dari sinyal atom karbon metoksi (OCH₃), sedangkan enam sinyal karbon sp² muncul antara lain berasal dari, dua sinyal atom karbon metin vinilik pada δ_C 110,7 (C-3) dan 140,9 (C-5) ppm, dua sinyal atom karbon kuartener vinilik pada δ_C 110,69 (C-4) dan 147,3 (C-2) ppm; serta dua sinyal atom karbon karbonil pada geseran kimia δ_C 176,8 (C=O asam) dan 170,3 (C=O ester) ppm. Berdasarkan data-data tersebut dan data spektrum IR yang mengindikasikan adanya gugus amina, maka dapat diduga bahwa keempat karbon vinilik dan satu gugus amina tersebut membentuk suatu cincin pentasiklik. Korelasi antara proton dan karbon yang terjadi pada senyawa (1) selanjutnya akan dijelaskan berdasarkan spektrum HMBC.

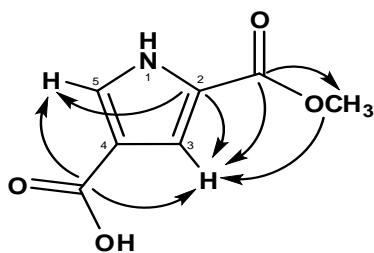


Gambar 4. Spektrum ¹³C-RMI senyawa (1)



Gambar 5. Spektrum C-H HMBC 2D senyawa (1)

Berdasarkan spektrum HMBC (Gambar 5), nampak adanya korelasi antara atom karbon pada δ_c 170,3 (C=O ester) ppm dengan proton H-3, dan H-metoksi, yang menetapkan posisi gugus metoksi terikat pada atom C-karbonil ester, sedangkan korelasi antara proton δ_H 6,49 (H-3) ppm dengan atom karbon C-2, C-metoksi dan C-karbonil ester, serta korelasi antara atom karbon C-2 dengan proton H-3, telah menetapkan posisi gugus karbonil ester terikat pada atom C-2. Penetapan posisi gugus karbonil ester pada C-2 tersebut berdasarkan korelasi antara atom karbon C-metoksi dengan proton H-3 yang memiliki posisi paling dekat dengan gugus C-metoksi. Selain itu, korelasi antara atom karbon pada δ_c 176,8 (C=O asam) ppm dengan proton H-3 dan H-5, telah menetapkan posisi atom karbon karbonil asam tersebut terikat pada C-4 (Gambar 6).



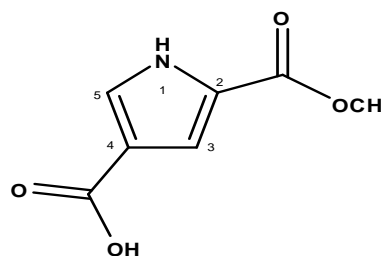
Gambar 6. Korelasi spesifik spektrum C-H HMBC 2D senyawa (2)

Tabel 1. Data Spektrum ¹H, ¹³C dan 2D RMI senyawa 1

No	¹ H RMI δ_H (multi.) ppm	¹³ C RMI δ_C (ppm)	HMBC
1	-	-	-
2	-	147,3	5, 3, OCH ₃
3	6,49 (s)	110,7	OCH ₃
4	-	110,7	-
5	7,94 (s)	140,9	-
C=O (asam)	-	176,8	3, 5
C=O (ester)	-	170,3	3, OCH ₃
OCH ₃	4,41 (s)	61,1	3

Asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat (1) diperoleh sebagai kristal jarum berwarna coklat muda, t.l. 63-68°C. Spektrum UV (MeOH) λ_{max} (nm); 217, 270, 227 dan 314. Spektrum IR (KBr) ν_{maks} (cm⁻¹); 3100-2500 (OH), 3260, 3474, 1283 (NH amia sekunder), 1659, 1582 (C=C), 1612 (C=O), 1228 dan 1142 (C-O-C). Spektrum ¹H RMI (aseton-d, 500 MHz) δ_H (ppm); 6,49 (1H, s, H-4), 7,94 (1H, s, H-5), 4,41 (3H, s, H-OCH₃). Spektrum ¹³C RMI (aseton-d, 125 MHz) δ_C (ppm); 147,31 (C-2), 110,69 (C-3), 110,69 (C-4), 140,90 (C-5), 176,78 (C=O, asam), 170,34 (C=O, ester), 61,12 (OCH₃)

Data tersebut sesuai dengan kerangka struktur senyawa siklik lima amina yang mempunyai dua pasang ikatan rangkap dua dari golongan pirol. Berdasarkan data-data tersebut dan hasil penelusuran data base dari *Chemfinder* dapat disimpulkan bahwa, senyawa 2 adalah senyawa turunan pirol yang baru pertama kali diisolasi dari tumbuhan yaitu asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat, dan kerangka strukturnya ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Asam metil-pirol-2,4- dikarboksilat

Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Senyawa Asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat

Hubungan antara ekstrak dan isolat dengan aktivitasnya sebagai antioksidan, akan lebih teliti dengan mempertimbangkan konsentrasi peredaman radikal bebas oleh ekstrak atau isolat tersebut dengan menggunakan nilai IC₅₀ (Hsu *et al.*, 2003). Konsentrasi inhibisi 50% dari masing-masing ekstrak dan isolat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. IC₅₀ ekstrak dan isolat buah salak Bongkok *Salacca edulis* (inw) dalam menghambat radikal bebas DPPH

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak etil asetat	1,60 ±0,9
Asam askorbat	0,54±0,23
2-metilester-1-H-pirol-4-asam karboksilat	3,27±2,12

Pada Tabel 2, senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat mempunyai IC₅₀ pada konsentrasi 3,27 µg/mL dan ekstrak etil asetat 1,60 µg/mL, sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat dan ekstrak etil asetat efektif sebagai antioksidan. Asam askorbat sebagai pembanding memiliki IC₅₀ sebesar 0,54 µg/ml. Menurut Desvia (2007), IC₅₀ ekstrak air buah salak Bongkok adalah 192,68 µg/mL. Sedangkan menurut Indraswari (2007) IC₅₀ ekstrak etanol buah salak Bongkok adalah 4,29 µg/mL.

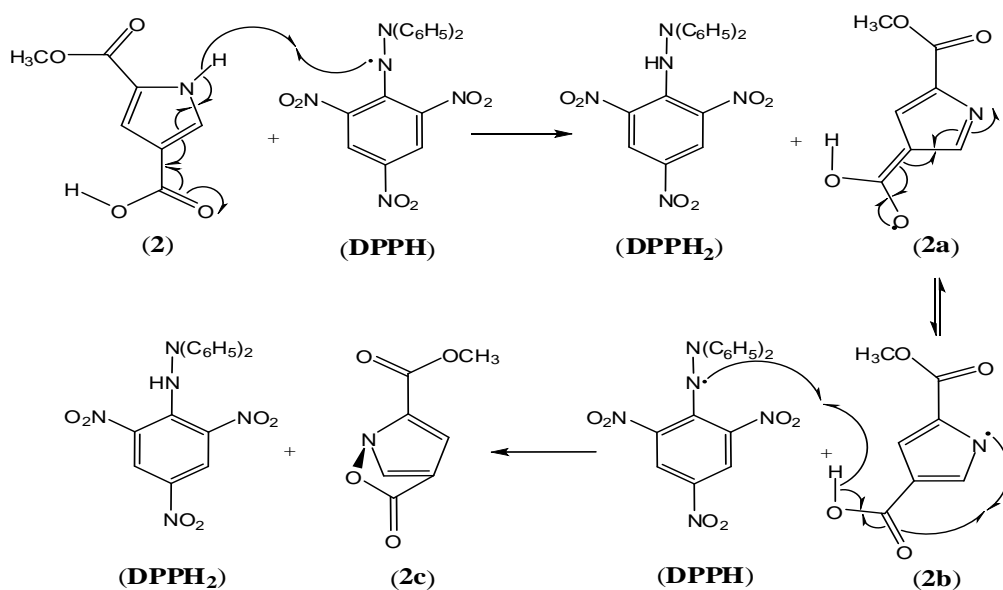
Asam askorbat merupakan antioksidan yang berfungsi sebagai reduktor mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas karena mempunyai ikatan rangkap dengan 2 gugus -OH yang terikat pada ikatan rangkap tersebut, radikal bebas DPPH akan mengambil satu atom hidrogen gugus hidroksil dan menyebabkan terbentuknya radikal. Radikal oksigen yang terbentuk tersebut selanjutnya akan bereaksi lagi dengan satu molekul DPPH, sehingga menghasilkan senyawa yang stabil dan tidak membahayakan melalui delokalisasi elektron. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka senyawa uji tersebut mempunyai keefektifan sebagai penangkap radikal yang lebih baik.

Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat, dapat diusulkan melalui mekanisme seperti ditunjukkan pada Gambar 7. Radikal bebas DPPH akan menangkap atom hidrogen yang terikat pada atom nitrogen gugus pirol, menghasilkan senyawa radikal (2a) dan senyawa DPPH₂ yang stabil. Selanjutnya senyawa radikal (2a) yang terbentuk ini, akan mengalami resonansi berkesetimbangan untuk memindahkan elektron radikal ke atom N dan menghasilkan senyawa radikal (2b). Senyawa radikal (2b) ini, selanjutnya akan bereaksi dengan satu molekul DPPH, melalui atom hidrogen yang terikat pada gugus asam, menghasilkan senyawa (2c) dan DPPH₂ yang stabil. Dari reaksi Gambar 7, nampak bahwa satu molekul asam metil-pirol-2,4-

dikarboksilat dapat menangkap dua molekul radikal bebas DPPH, sehingga dapat diharapkan bahwa Asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat memiliki kemampuan yang sama dengan asam askorbat. Namun berdasarkan hasil pengukuran aktivitas antioksidan, nampak bahwa asam askorbat memiliki nilai IC₅₀ yang lebih kecil dibandingkan dengan asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat, hal ini dapat dilihat dari perbedaan nilai IC₅₀ yang 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan asam askorbat.

Perbedaan kemampuan penangkapan radikal bebas DPPH antara asam askorbat dan asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan sifat atom hidrogen dan proses penangkapan radikal bebas DPPH. Proses penangkapan radikal bebas DPPH tahap pertama sama dengan asam askorbat, karena sifat atom hidrogen gugus amina memiliki sifat yang hampir sama dengan atom hidrogen gugus hidroksil alkohol asam askorbat, namun pada tahap kedua, penangkapan radikal bebas DPPH dilakukan oleh atom hidrogen gugus hidroksil asam yang lebih bersifat elektropositif, sehingga proses ini tidak mudah terjadi. Berdasarkan ulasan tersebut maka dapat disimpulkan bahwa, perbedaan aktivitas antioksidan antara asam askorbat dan asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat, disebabkan karena proses penangkapan radikal bebas DPPH yang efektif hanya terjadi pada tahap pertama.

Aktivitas antioksidan senyawa terhadap peredaman radikal bebas didasarkan pada nilai IC₅₀ yang merupakan persen penangkap radikal oleh senyawa anti radikal terhadap radikal DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ suatu ekstrak atau isolat maka semakin besar aktivitas antiradikal ekstrak atau isolat tersebut. Senyawa dikatakan aktif sebagai antioksidan bila memiliki nilai IC₅₀ < 200 µg/mL (Thuong *et al.*, 2006). Senyawa yang dapat dikembangkan untuk diuji lebih lanjut sifat antioksidannya adalah asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat.



Gambar 7. Usulan mekanisme reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat.

Menurut Tapiero *et al.*, (2004) senyawa yang mengandung sebuah atau beberapa ikatan rangkap seperti golongan karotenoid, vitamin, flavanoid atau fenol dapat menghambat oksidasi dan menangkap senyawa reaktif radikal bebas (oksigen singlet) yang merusak sel. Semakin banyak ikatan rangkapnya semakin kuat daya kerja antioksidannya. Oksigen singlet adalah molekul yang memiliki elektron π yang sangat reaktif. Mekanisme pelepasan (*quenching*) energi dari oksigen singlet yang elektron terluarnya sudah berpasangan dan memiliki tingkat energi yang tinggi sehingga oksigen singlet mudah bereaksi dengan molekul organik pada senyawa yang juga mempunyai elektron terluar berpasangan. Oksigen singlet bereaksi dengan senyawa yang mempunyai struktur dengan elektron pada ikatan rangkapnya. (Boff and Min,2002).

Menurut Raharjo (2006), antioksidan yang berfungsi sebagai reduktor, mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas karena mempunyai ikatan rangkap dan dengan adanya gugus -OH yang terikat pada ikatan rangkap tersebut, radikal bebas akan mengambil atom hidrogen dan menyebabkan terbentuknya radikal oksigen yang selanjutnya akan didelokalisasi melalui resonansi, sehingga menghasilkan radikal yang stabil.

3. Peredaman Xantin Oksidase Oleh Ekstrak Etil Asetat Dan Senyawa Asam Metil-Pirol-2,4-Dikarboksilat

Xantin oksidase adalah kompleks metalo-flavoprotein yang mengoksidasi hipoksantin menjadi xantin, dan xantin menjadi asam urat (Fields *et al.*, 1996). Selama proses oksidasi terjadi pembentukan radikal-radikal bebas yang dapat meningkatkan aktivitas xantin oksidase dan kadar asam urat dalam tubuh akan meningkat pula. (Al-Qirim *et al.*, 2002; Fields *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2004). Pada proses oksidasi xantin oksidase menghasilkan superoksida (O_2^-) yang mengubah xantin menjadi asam urat. Untuk menghambat terbentuknya asam urat digunakan alopurinol. Alopurinol (4-hidroksipirazol [3,4-d] pirimidin) adalah suatu analog purin yang menghambat sintesis asam urat dengan jalan menghambat secara kompetitif enzim xantin oksidase (Fields *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996). Alopurinol digunakan untuk terapi penderita hiperurikemia dan pirai, karena dapat menurunkan kadar asam urat dalam serum (Fields *et al.*, 1996).

Kemampuan ekstrak etil asetat dan senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat dalam meredam aktivitas xantin oksidase dilihat dari absorbansi yang memberikan nilai lebih rendah dibandingkan kontrol. Meskipun hasil absorbansi terhadap konsentrasi ekstrak menunjukkan bahwa ekstrak mempunyai absorbansi lebih rendah dibanding kontrol tetapi pada Tabel 3, persen peredaman ekstrak yang mampu meredam 50% enzim xantin oksidase, ekstrak etil asetat konsentrasi 0,01; 0,02; 0,2; 2; dan 2000 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing adalah 36,27; 49,24; 49,58; 50,28; dan 52,26% dengan IC_{50} 24,75 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat mampu meredam aktivitas xantin oksidase masing-masing yaitu 27,7; 30,5; 37,3; 50,27 dan 50,55% dengan IC_{50} 48,86 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, pada konsentrasi yang sama perbandingan alopurinol dapat menghambat aktivitas enzim xantin oksidase masing-masing yaitu 38,02; 41,72; 44,30; 65,31; dan 67,70 % dengan IC_{50} 0,92 $\mu\text{g/mL}$. Peredaman xantin oksidase oleh senyawa

didasarkan pada nilai IC_{50} , senyawa dikatakan aktif bila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 100 $\mu\text{g/mL}$ (Thuong *et al.*,2006).

Tabel 3. IC_{50} ekstrak dan senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat dalam buah salak Bongkok (*Salacca edulis* Reinw) dalam menghambat xantin oksidase

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak etil asetat	24,75 \pm 5,75
Alopurinol	0,92 \pm 0,79
2-metilester-1-H-pirol-4-asam karboksilat	48,86 \pm 6,72

Golongan senyawa aromatik seperti flavonoid pada ekstrak daun *Biota orientalis* yaitu quersetin dan rutin dapat mencegah pembentukan radikal bebas sehingga menghambat aktivitas xantin oksidase dan mengendalikan kenaikan kadar asam urat plasma tikus (Zhu *et al.*,2004; Al-Qirim *et al.*, 2002). Flavonoid merupakan senyawa antioksidan dan termasuk kelompok senyawa aromatik. Antioksidan adalah senyawa yang akan bereaksi dengan radikal bebas dengan memberi elektron membentuk produk yang stabil. Antioksidan yang telah kehilangan elektron tidak akan berubah menjadi radikal baru, karena struktur stabil (Lee *et al.*, 2004). Suatu molekul organik yang mempunyai kelebihan elektron pada gugus aromatik dan adanya ikatan rangkap akan terjadi interaksi dengan radikal bebas. Mekanisme pengikatan antara radikal bebas dengan ikatan rangkap pada senyawa tersebut berdasarkan transfer energi dari oksigen singlet ke molekul senyawa ikatan rangkap dalam kondisi triplet (Raharjo,2006).

Manfaat dari penelitian ini telah mengungkap beberapa kajian yang belum tergal dari buah salak varietas Bongkok. Adanya senyawa dari ekstrak etil asetat buah salak Bongkok yaitu asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat. Senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat merupakan senyawa baru yang berhasil diisolasi dalam ekstrak etil asetat yang mempunyai aktivitas antioksidan dan dapat menghambat xantin oksidase. Sementara itu, ekstrak etil asetat buah salak Bongkok memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menghambat xantin oksidase secara *in vitro*. Dengan adanya senyawa aktif dalam buah salak var. Bongkok (*Salacca edulis* Reinw.), maka dapat digunakan untuk pengembangan ekstrak buah salak var. Bongkok sebagai obat dan atau pangan fungsional. Penelitian lanjutan yang dapat dilakukan untuk pengembangan obat antihiperurikemia dan atau pangan fungsional adalah uji keamanan dan pengembangan formulasi dari ekstrak dan atau senyawa yang aktif.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah mengungkap aktivitas antioksidan dan antihiperurikemia ekstrak etil asetat dan berhasil diisolasi senyawa yaitu asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat buah salak var. Bongkok. Ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} 1,6 $\mu\text{g/mL}$ dan senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat merupakan senyawa baru dalam tanaman salak var. Bongkok yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan IC_{50} 3,27 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas menghambat xantin oksidase dengan IC_{50} 24,75 $\mu\text{g/mL}$, dan

senyawa asam metil-pirol-2,4-dikarboksilat dengan IC_{50} 48,86 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti LH, Sukandar EY, Ibrahim S, Adnyana IK. 2006. Aktivitas antioksidan ekstrak daging buah salak varietas Bongkok. *J.Acta Pharmaceutica*. ITB.2006.
- Al-Qirim TM, Shahwan M, Zaidi KR, Uddin Q, Banu N. 2002. Effect of khat, its constituent and restraint stress on free radical metabolism of rats. *J.Ethnopharm*, 83: 245 -250.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Marin FR, Ortuno A, Del Rio JA. 1997. Uses of properties of citrus flavanoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,45 (12). 4505-4515.
- Boff J, Min DB. 2002. Chemistry and reaction of singlet oxygen in food. *Comp Rev Food Sci. Safety*, 1:58-72.
- Desvia A. 2007. Pengaruh jumlah ekstrak salak dan konsentrasi gula terhadap karakteristik soft candy salak Bongkok sebagai pangan fungsional, Skripsi, Jurusan Teknologi Pangan Universitas Pasundan Bandung, hal 48.
- Ferrari CKB, Torres EAFS. 2003. Biochemical pharmacology of fungsional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacoterapy*, 57. 251-260.
- Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA. 2000. Prospective study of fruit and vegetables consumption and risk of lung cancer among man and woman. *J. of the nation Cancer Institute*, 92, 1812-1823.
- Fields M, Charles GL, Mark DL. 1996. Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, reduces uric acid levels and modifies the signs associated with copper deficiency in rats fed fructose, *J. Free Radical Biology & Medicine*, Vol 20, No 4, pp.595-600.
- Hsu CL, Chen W, Weng YM, Tseng. 2003. Chemical composition, physical properties and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *J.Food Chem.*,83(1), 85-92.
- Indraswari FP. 2007. Pengaruh konsnetrasi asam sitrat dan konsnetrasi asam tartrat terhadap karakteristik tablet effervescent dari ekstrak salak (*Salacca edulis* Reiw.) varietas Bongkok. Skripsi, Jurusan Teknologi Pangan Universitas Pasundan Bandung, hal 43.
- Katzung BG. 2002. Farmakologi Dasar dan Klinik, terjemahan Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Salemba Medika, Jakarta, 487-493.
- Leong LP, Shui G. 2002. An Investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets, *J. Food Chemistry* 76. 69-75.
- Marin FR, Martinez M, Uribealago T, Castillo S, Frutos MJ. 2002, Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction systems, *Food Chem.*, 78.319-324.
- Muchtadi D. 1978. Perubahan Fisiko Kimia Buah Salak Kalengan Selama Penyimpanan. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Raharjo S. 2006. Kerusakan Oksidatif pada Makanan, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Supriyadi, Suhardi, Suzuki M, Yoshida K, Muto T, Fuujita A, Watanabe N. 2002. Changes in the volatile compounds and in the chemical and physical properties of snake fruit (*Salacca edulis* Reinw.) cv. Pondoh during maturation. *J. Agric.chem.*,50;7627-7633Tapiero *et al.*, (2004)
- Thuong PT, Na MK, Dang NH, Hung TM, Ky PM, Thanh TV, Nam NH, Thuan ND, Sok DE, Bae KI. 2006. Antioxidant activities of Vietnamese medicinal Plants, *J. Natural Prod.Sci.*12(1):29-37.
- Vogel HG, Wolfgang HV. 1996. Drug discovery and evaluation pharmacological assay. Springer.Philadelphia.178-179.
- Zhu ZX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X. 2004. Effects of Biota orientalis extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J. Ethnopharmacology* 93:133-140.