

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1.1. Angsana

Angsana (*Pterocarpus indicus*) merupakan salah satu tanaman dari suku Leguminoceae, yang mempunyai potensi untuk dikembangkan di daerah lahan kering dan merupakan penghasil kayu yang mempunyai kualitas cukup baik. Tanaman ini dapat tumbuh dengan cepat, dimana sistem perakarannya melebar luas, mampu memberikan percabangan cukup banyak dan mampu beradaptasi pada daerah yang miskin unsur hara. Di samping itu, tanaman ini mempunyai kemampuan bersimbiosis dengan bakteri *Rhizobium* dalam pembentukan bintil akar, sehingga mampu menambat Nitrogen dari udara. Kemampuan tersebut menyebabkan tanaman ini mampu memenuhi kebutuhan unsur hara N dan tidak lagi tergantung pada pupuk N buatan serta akan menyisakan N pada tanah di sekitarnya sehingga dapat berperan dalam meningkatkan kesuburan tanah<sup>[16,19]</sup>.

Beberapa penelitian mengenai tanaman angsana yang telah dilakukan umumnya baru pada aspek pemanfaatan untuk lingkungan. Secara tradisional, tanaman ini berkhasiat sebagai obat sariawan, obat bisul, dan obat diare<sup>[1,16,19]</sup>.

#### 2.1.1. Klasifikasi tanaman angsana (*Pterocarpus indicus* Willd.)<sup>[1]</sup>

Klasifikasi tanaman angsana adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta  
Sub.Divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Rosales  
Suku : Leguminoceae  
Marga : Pterocarpus  
Jenis : *Pterocarpus indicus*

### 2.1.2. Deskripsi Tanaman angkana (*Pterocarpus indicus*)<sup>[1]</sup>

Habitus : Pohon, tinggi 10-20 m  
Batang : Bulat, berkayu, bercabang, putih kotor  
Daun : Majemuk, berseling, anak daun helai, bulat, ujung runcing, pangkal tumpul, mengkilat, panjang daun 3-10 cm, lebar 2-5 cm, pertulangan menyirip. hijau muda hijau  
Bunga : Majemuk, bentuk tandan, di ujung cabang, di ketiak daun, berbulu jingga  
Buah : Polong, bulat pipih, bersayap, diameter  $\pm$  5 cm, berisi 2-6 biji, hijau  
Biji : Bulat, coklat  
Akar : Tunggang, bercabang, putih kotor

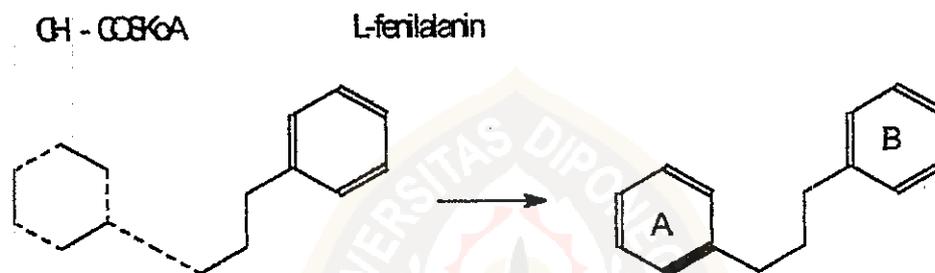
### 2.2. Tinjauan Tentang Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Menurut perkiraan, 2% dari seluruh hasil fotosintesis tumbuh-tumbuhan (1-10 ton/tahun) diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berkaitan erat dengannya. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau, kecuali alga, yang tersebar pada semua bagian tanaman termasuk daun, akar, kulit kayu, kayu, buah, tepung sari, bunga dan biji. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna

merah, ungu dan biru, serta sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan<sup>[3,10]</sup>.

### 2.2.1. Asal Usul Biosintesa Flavonoid

Semua golongan flavonoid saling berikatan karena alur biosintesis yang sama, yang memasukkan prazat dari alur 'shikimat' dan alur 'asetat-malonat'. Cincin A dari struktur flavonoid berasal dari jalur poliketida, yakni kondensasi dari 3 unit asetat atau malonat, sedangkan cincin B dan 3 atom karbon dari rantai propan berasal dari jalur fenil propanoid (jalur shikimat)<sup>[3,9,12,14,20]</sup>.



Gambar 2.1. Jalur pembentukan flavonoid

Flavonoid yang dianggap pertama kali terbentuk adalah khalkon yang berisomer dengan flavanon berperan sebagai senyawa antara dalam biosintesa berbagai jenis flavonoid lainnya. Adanya proses enzimatik menyebabkan flavonoid mengalami modifikasi seperti glikosilasi gugus hidroksil atau inti flavonoid, hidroksilasi, metilasi dan dimerisasi<sup>[14]</sup>.

Flavonoid memiliki kerangka dasar karbon C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Pola biosintesis yang disarankan oleh Birch antara lain: pada tahap-tahap pertama biosintesa flavonoid suatu unit C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> berkombinasi dengan 3 unit C<sub>2</sub> yang menghasilkan unit C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-(C<sub>2</sub>+C<sub>2</sub>+C<sub>2</sub>). Kerangka C<sub>15</sub> yang dihasilkan dari kombinasi ini telah mengandung gugus fungsi oksigen pada posisi yang diperlukan. Selanjutnya, sebagai akibat

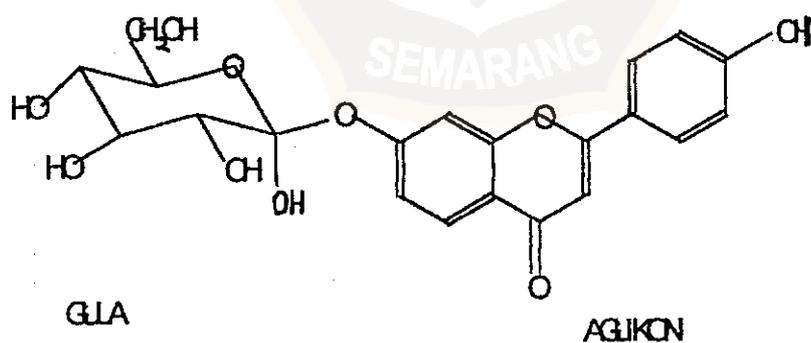
dari perubahan yang disebabkan oleh enzim, ketiga atom karbon dari rantai propan dapat menghasilkan berbagai gugus fungsi. Alur biosintesis flavonoid dapat terlihat pada gambar 3.

### 2.2.2. Klasifikasi flavonoid

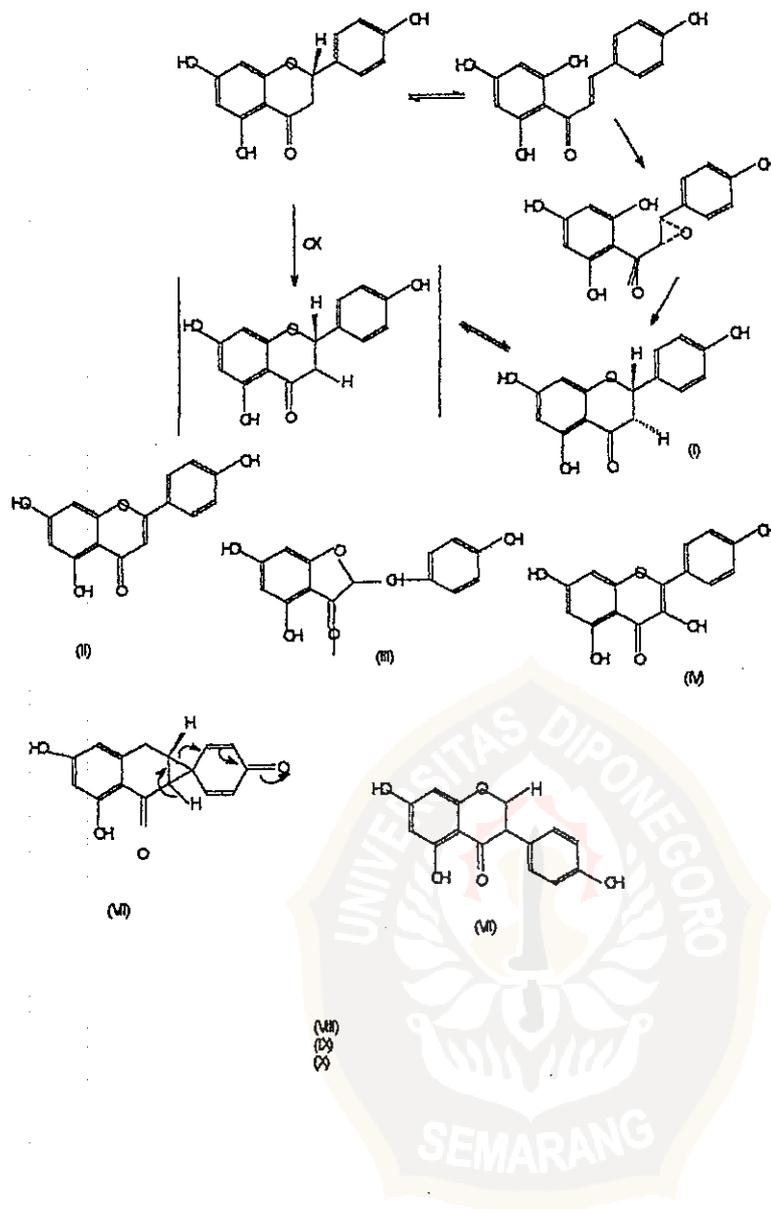
Flavonoid adalah golongan senyawa dengan kerangka dasar yang terdiri dari 15 atom karbon, dua cincin benzena ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propan ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6-C_3-C_6$ . Rantai propan pada susunan ini dapat membentuk cincin ketiga (cincin C) sebagai akibat dari adanya perubahan yang disebabkan oleh enzim. Senyawa-senyawa flavonoid terdiri atas beberapa golongan. Berdasar pada jenis atom yang berikatan antara gula dan aglikon, flavonoid dibedakan atas flavonoid O-glikosida dan flavonoid C-glikosida<sup>[18]</sup>.

#### a). Flavonoid O-glikosida

Yang termasuk golongan ini adalah flavonoid yang mempunyai ikatan hemiasetal yang terbentuk antara, gugus hidroksil pada aglikon dengan gula



Gambar 2.2. Ikatan Flavonoid O-glikosida



Gambar 2.3. Alur biosintesis flavonoid

Keterangan gambar. (I)flavanonol, (II)flavon, (III)auron, (IV) flavonol, (VII)isoflavon, (VIII)flavon-3,4-di-ol, (IX)katekin, (X)antosianidin.

Flavonoid O-glikosida mudah dihidrolisis dengan katalis asam yang menghasilkan aglikon dan gula. Gula yang biasa ditemukan adalah glukosa,

ditemukan pula gula alosa, manosa, dan fruktosa. Selain berikatan dengan monosakarida, ditemukan pula aglikon yang berikatan dengan di-, tri-, dan tetra-sakarida<sup>[18]</sup>.

#### a.) Flavonoid C-glikosida

Pada flavonoid golongan ini, ikatan antara molekul gula dengan aglikon terjadi ikatan C-C. Gula yang sering dijumpai adalah glukosa, xilosa dan arabinosa. Sedangkan aglikonnya tidak banyak beragam.

Aglikon flavonoid dapat digolongkan berdasar tingkat oksidasi dari rantai propan (cincin C) dan menurut Geissman (1955) dibedakan atas katekin, dihidrokhalkon, khalkon, flavanon, isoflavon, flavanonol, flavon, isoflavanon, antosianin, auron dan flavonol<sup>[18]</sup>.

#### 2.2.3. Kelarutan Flavonoid

Aglikon flavonoid adalah polifenol, oleh karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil bebas atau suatu gula. Karena itu, flavonoid umumnya larut dalam pelarut polar seperti air, metanol, etanol, aseton, dimetilsulfoksida (DMSO) dan dimetilforfamida (DMF)<sup>[8,18,12]</sup>. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air. Dengan demikian, campuran pelarut tersebut dengan air merupakan pelarut yang baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon flavonoid yang kurang polar akan larut dalam pelarut eter, kloroform, diklorometan dan heksana<sup>[6,7,12]</sup>.

Aglikon yang bersifat kurang polar antara lain isoflavan, flavanon atau dihidroflavonol, flavon serta flavonol yang mempunyai gugus metoksi. Sedangkan aglikon yang bersifat polar adalah flavon terhidroksilasi, flavonol, biflavonil, auron dan khalkon<sup>[8]</sup>.

#### 2.2.4. Bioaktivitas Flavonoid

Flavonoid adalah salah satu golongan metabolit sekunder, di samping golongan metabolit sekunder lain seperti alkaloid, steroid, isoprenoid, dan lain-lain yang mempunyai berbagai jenis bioaktivitas.

Hasil-hasil penelitian tentang bioaktivitas flavonoid memperlihatkan kecenderungan atau pola tertentu, seperti korelasi antara bioaktivitas dan struktur flavonoid. Keaktifan flavanon, flavon dan flavanol sebagai antioksidan ditentukan oleh adanya gugus -OH ganda, terutama adanya keterikatan antara gugus C=O pada posisi C-4 dengan gugus -OH pada posisi C-3 dan C-5. Sistem gugus fungsi demikian memungkinkan terbentuknya suatu kompleks dengan logam tembaga. Senyawa flavonoid juga menunjukkan aktivitas anti inflamasi, dengan adanya gugus C=O pada posisi C-4 dan gugus -OH pada posisi C-5 yang diperlukan untuk membentuk kompleks dengan besi<sup>[20]</sup>.

Beberapa jenis flavonoid seperti khalkon, flavanon, flavanol, flavon, katekin, isoflavonoid, dan neoflavonoid yang telah ditemukan mempunyai aktivitas biologis tertentu seperti antialergi, antitumor, antihepatotoksik, sebagai phytohormon (hormon tanaman), mengatasi gangguan kardiovaskular dan lain-lain<sup>[20]</sup>.

### 2.2.5. Isolasi Flavonoid

Isolasi flavonoid dimulai dengan ekstraksi yang merupakan proses pemisahan substansi dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi tergantung pada tekstur dan kandungan senyawa yang diisolasi.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan pelarut organik terhadap bahan segar atau bahan kering. Pada prinsipnya senyawa polar diekstraksi dengan pelarut polar sedang pelarut non polar diekstraksi dengan pelarut non polar.

Flavonoid mudah mengalami peruraian karena panas, kerja enzim dan pH. Oleh karena sifatnya yang mudah terurai ini, ekstraksi dapat dilakukan pada suhu kamar dengan cara maserasi, perkolasi atau maserasi-perkolasi. Dengan panas, cara yang digunakan adalah ekstraksi menggunakan alat refluks atau sokletasi.

Crude ( ekstrak kasar ) yang didapat dari ekstraksi dihilangkan dari senyawa-senyawa yang kurang polar, misalnya lemak, terpen, klorofil, xantofil menggunakan pelarut heksan, petroleum eter atau etil asetat.

Fraksi yang akan diambil senyawa flavonoidnya diuji terlebih dahulu menggunakan uji warna dan kromatografi lapis tipis. Selanjutnya untuk memperoleh senyawa murni dilakukan kromatografi kolom menggunakan pelarut yang paling sesuai seperti pelarut yang digunakan pada kromatografi lapis tipis.

Untuk mengetahui kemurnian senyawa yang diisolasi dapat dilakukan analisa menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau menggunakan kromatografi lapis tipis. Senyawa dikatakan sudah murni bila pada KLT didapatkan satu noda dan pada KCKT didapatkan satu puncak.

## 2.3. Identifikasi Flavonoid

Beberapa teknik yang biasa digunakan untuk identifikasi flavonoid antara lain:

### 2.3.1. Teknik Kromatografi

#### a.) Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi ini banyak digunakan untuk identifikasi flavonoid. Prinsip kerja dari teknik ini adalah proses pemisahan suatu cuplikan yang berada pada suatu fasa diam menggunakan eluen (sistem pelarut) tertentu sebagai fasa gerakannya. Beberapa jenis fasa diam yang dapat digunakan antara lain: magnesol, silika gel, shepadex, alumina ataupun selulosa. Eluen yang digunakan sangat beragam tergantung tingkat kepolaran senyawa yang akan diisolasi<sup>[6,7]</sup>.

#### b.) Kromatografi Kertas

Prinsip kerja dari teknik kromatografi ini sama seperti KLT, hanya saja sebagai fase diam digunakan kertas (biasanya menggunakan kertas Whatman.<sup>[6]</sup> Untuk senyawa yang lebih polar, teknik kromatografi ini lebih efektif dari pada KLT. Kedua teknik kromatografi tersebut akan lebih efektif untuk identifikasi senyawa flavonoid dengan pemakaian reagen warna sebagai uji khas flavonoid dan senyawa pembanding (standar). Beberapa reaksi warna flavonoid dapat dilihat pada tabel 1.

### 2.3.2. Teknik spektroskopi

#### a.) Spektroskopi Ultra Violet –Tampak

Spektroskopi ultraviolet–tampak merupakan salah satu metode spektroskopi yang paling tua, tetapi sampai saat ini masih digunakan dalam identifikasi dan penentuan struktur suatu senyawa , utamanya golongan flavonoid

Tabel 2.1. Reaksi warna-warna khas flavonoid<sup>[6]</sup>

Jenis flavonoid	NaOH 10 %	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> p	Mg-HCl
Khalkon	Jingga-merah	Jingga-merah	-
dihidrokhalkon	Tak berwarna-kuning pucat	Tak berwarna-kuning pucat	-
auron	Merah-ungu	Merah-magenta	-
Flavanon	Dingin: kuning-jingga Panas: merah tua atau ungu	Jingga-merah	Merah-magenta Ungu-biru
Flavon	kuning	Kuning pekat-jingga kadang berfluoresensi	Kuning-merah
Flavonol	Kuning-jingga (coklat karena oksidasi oleh udara)	Kuning pekat- jingga kadang berfluoresensi	Merah-magenta
flavanonol	Kuning pucat, segera berubah menjadi coklat	Kuning kemerahan	Merah-magenta
leukoantosianin	Kuning	Merah-ungu	Merah muda dengan HCl berubah merah tua dengan Mg
Antosianidin-antosianin	Biru-ungu	Jingga kekuningan	Merah terang-merah muda pucat
katekin	Kuning, berubah menjadi merah-coklat	merah	-
isoflavan	kuning	kuning	Kuning
isoflavanon	kuning	kuning	-

Spektrum ultra violet –tampak dari senyawa flavonoid dapat memberikan informasi tentang bagian aromatik dari senyawa dan pola substitusinya. Dengan mengubah pH larutan analisa dapat diketahui adanya gugus fenolik dan posisi substituenya.

Spektrum ultra violet-tampak dari senyawa flavonoid pada umumnya terdiri dari sistim benzoil dan sinamoil dengan tambahan pengaruh beberapa auksokrom. Sistim benzoil mempunyai puncak maksimum pada panjang gelombang 280-290 nm, sedangkan sistim sinamoil pada 320-340 nm. Petunjuk mengenai rentang maksimum utama yang diperkirakan untuk setiap golongan flavonoid disajikan dalam tabel 2.2.

Tabel.2.2.Rentang serapan spektrum ultraviolet-tampak senyawa flavonoid

Pita II (nm)	Pita I (nm)	Jenis flavonoid
250-280	310-350	Flavon
250-280	330-360	Flavonol (3-OH tersubstitusi)
250-280	350-385	Flavonol (3-OHbebas)
245-247	310-330 (bh)	Isoflavon
275-295	300-330	Flavanon dan dihidroflavonol
230-270 (Kekuatan rendah)	340-390	Khalkon
270-280	465-560	Antosianin dan antosianidin
230-270	380-430	Auron

Adapun senyawa flavonoid jenis flavanon biasanya tidak mempunyai serapan dan intensitas puncak sinamoil, jika ada biasanya dalam bentuk shoulder (bahu). Posisi substituen senyawa flavonoid dapat diketahui dengan mengubah pH larutan dengan pereaksi diagnosa, yang akan menimbulkan efek batokromik pada puncak serapan benzoil dan sinamoil. Penambahan  $AlCl_3$  dapat digunakan untuk mengetahui adanya gugus hidroksil pada posisi C-5, yang akan membentuk kompleks Al dengan gugus karbonil pada posisi C-4. Indikasi yang dapat diamati adalah bertambahnya pergeseran puncak serapan pada 20-5/60 nm.

Pereaksi geser lain yang biasa digunakan adalah natrium hidroksida, natrium asetat, magnesium-asam klorida, natrium metoksida dan asam borat. Secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Petunjuk mengenai

karakterisasi spektru UV-tampak senyawa flavonoid disajikan dalam tabel 3<sup>[15,18,11]</sup>

Tabel.2.3. Karakterisasi spektrum ultraviolet-tampak senyawa flavonoid

Reagen	Posisi substituen	Pergeseran $\lambda$ (nm)
MeOH	6-OH	-8-12
	8-OH	+13-16
+ AlCl <sub>3</sub>	3-OH	+60
	5-OH	+35-55
	3,5-di-OH	+50-60
	5,6-di-OH	+20
	5-OH,3,6-di-OMe	+20
+ AlCl <sub>3</sub> + HCl	5-OH, 6-OH	+25-30
	5-OH,6-Ome	+20
	5-OH, 8-Ome	+55-57
+ NaOMe (NaOH)	3,3',4'-tri-OH	+5-20
	7-OH	+5-20
+NaOAc	7-OH	+5-20
+NaOAc-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	O-di-OH	+12-30

Sampai saat ini perkembangan teknik-teknik spektroskopi untuk menentukan struktur suatu senyawa sudah cukup pesat. Berbagai teknik spektroskopi telah ditemukan untuk mempermudah dan meningkatkan akurasi elusidasi struktur. Teknik-teknik tersebut adalah: spektroskopi massa, <sup>13</sup>CNMR, <sup>1</sup>HNMR, dan CH-CoSY (HMBC dan HMQC).

#### b.) Spektroskopi Massa

Cara ini dapat menunjang penentuan struktur molekul flavonoid. Informasi paling penting yang dapat diperoleh dari spektroskopi massa adalah berat molekul melalui ion molekul M<sup>+</sup>. Bila nilai ini dikombinasikan dengan pola fragmentasi dan spektrum ultraviolet maka akan banyak informasi guna identifikasi struktur molekul. Penggunaan spektroskopi massa bila dikombinasikan dengan proton dan

karbon resonansi magnet inti akan memberikan gambaran rumus molekul dari senyawa.

Pola fragmentasi spektrum massa dari senyawa flavonoid yang paling penting adalah fragmentasi retro Diels-Alder dari ion molekul, dimana muatan positif dilokalisasi pada cincin benzoil. Pola fragmentasi lainnya, adalah ion molekul pecahan dari cincin A,C dan B. Ion molekul ( $M^+$ ) biasanya tampak berupa puncak utama pada aglikon.  $M^+$  ini, harus bilangan massa genap dan bobot molekul inti flavonoid dasar, flavon, isoflavon, dan auron (222), flavon dan khalkon (224), flavanol 238, dan dehidroflavanol 240. Fragmentasi senyawa flavonoid yang mempunyai gugus hidroksil ditandai dengan lepasnya molekul air ( $M^+ = -18$ ), sedangkan yang mempunyai gugus metoksi ditandai dengan lepasnya ion metil<sup>[11,18]</sup>.

### c.) Spektroskopi Resonansi Magnet Inti

Cara lain yang sangat penting dalam penentuan struktur molekul senyawa flavonoid adalah resonansi magnet inti. Spektroskopi magnet inti memberikan informasi penting tentang lingkungan dan posisi dari proton/hidrogen dan karbon.

Spektrum proton resonansi magnet inti senyawa flavonoid secara garis besar dibagi atas tiga kelompok. Kelompok pertama sinyal proton aromatik dari cincin A yang muncul pada pergeseran sekitar 6 ppm. Kelompok kedua, sinyal proton aromatik cincin B yang muncul pada pergeseran lebih besar dari 7 ppm. Kelompok ketiga, adalah sinyal proton dari gugus yang terikat pada aromatik dan atom C-3. Gugus hidroksil yang terikat pada aromatik muncul pada pergeseran lebih besar 10 ppm, sedangkan metoksi muncul pada 3,85 ppm.

Sinyal-sinyal tersebut di atas dapat bergeser dengan kondisi lingkungan proton yang bersangkutan. Adapun yang mempengaruhi resonansi proton tersebut adalah efek induksi, anisotropi, ikatan kimia dan posisi proton dalam ruang<sup>[8,15]</sup>.

Spektrum karbon-13 resonansi magnet inti terjadi pada daerah 0-200 ppm dari tetrametilsilan (TMS). Setiap karbon yang berlainan akan menghasilkan satu sinyal. Penggandengan antara sinyal atom yang bertetangga juga terjadi pada spektrum karbon-13 ini. Hal ini terjadi karena antaraksi karbon dengan proton yang berdekatan (gandeng  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ).

Semua gula yang terikat pada O atau C menghasilkan pola sinyal yang berbeda. Untuk O-glikosida hidroksil flavonoid menyebabkan pergeseran ke medan atas (geser kimia lebih kecil) sampai 2 ppm, untuk C-glikosida menyebabkan pergeseran sinyal ke medan bawah sebesar 10 ppm.

