



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN ELUSIDASI SENYAWA SERTA UJI AKTIVITAS
BIOLOGI DARI KULIT BATANG *Calophyllum hosei* Ridley**

TESIS

ERNAWATI

0806421735

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM PASCA SARJANA

DEPOK

DESEMBER 2010



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN ELUSIDASI SENYAWA SERTA UJI AKTIVITAS
BIOLOGI DARI KULIT BATANG *Calophyllum hosei* Ridley**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

ERNAWATI

0806421735

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA

DEPOK

JANUARI 2011

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun
dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ernawati
NPM : 0806421735
Tanda Tangan : .....
Tanggal : 27 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Ernawati
NPM : 0806421735
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul Tesis : Isolasi dan Elusidasi Senyawa serta Uji Aktivitas Biologi dari Kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Magister Ilmu Kimia, Kekhususan hayati, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembtiimbing : Prof. Dr. Soleh Kosela M Sc (.....)

Pembimbing : Dr. Jamilah Abbas (.....)

Penguji : Dr. Ivandini Tribidasari A. (.....)

Penguji : Dr. Asep Saefumillah M Si. (.....)

Penguji : Dr. Antonius Herry Cahyana (.....)

Penguji : Dr. Yoki Yulizar (.....)

Ditetapkan di : .Depok

Tanggal : .Januari 2011

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr Wb.

Alhamdulillah, puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Perkuliahan, penelitian dan penulisan tesis ini merupakan pengalaman berharga yang tidak terlupakan. Semua ini tidak terlepas dari dorongan, pengorbanan dan doa dari suami tercinta Mas Darmadji sehingga penulis dapat melanjutkan dan menyelesaikan pendidikan program magister ini. Doa anak-anakku tersayang Pandu Aji Pradana dan Dimas Rizqi Dwiaji seta bantuan dan doa adik-adik : Ida, Nur dan Sigit. Doa yang terus menerus tercurah dari Ibu tercinta, mertua serta sanak saudara. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan orang-orang yang penulis cintai dan sayangi ini.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati dan penuh rasa hormat, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada:

1. Prof. Dr. Soleh Kosela M Sc selaku Pembimbing Utama atas keikhlasan dan kesabaran beliau dalam memberikan ilmunya, meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.
2. Dr. Jamilah Abbas selaku Pembimbing Pendamping yang telah banyak meluangkan waktu untuk membimbing, membantu dan mengarahkan penulis dalam pelaksanaan penelitian di Puslit Kimia LIPI Serpong.
3. Pimpinan Puslit Kimia LIPI Serpong yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian.

4. Dr. Endang Saepudin dan Dr. Asep Saefumillah selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi Ilmu Kimia Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia dan seluruh staf pengajar.
5. Ibu Sri Hartati, Ibu Puspa, Ibu Mimin, Ibu Mega, Pak Ngadiman, mbak Dini, mbak Sofa, Aa Akhmad atas kerjasamanya selama penulis melakukan penelitian di Puslit Kimia LIPI Serpong
6. Temanku Jamilah dan teman-teman kuliah yang lain atas bantuan dan kerjasamanya selama perkuliahan, pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini.
7. Bapak Drs. Mugni Hadi selaku Kepala SMA Negeri 109 Jakarta yang telah dorongan semangat dan mengizinkan penulis menyelesaikan studi dan penelitian ini diantara waktu mengajar di sekolah.
8. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini. Penulis menyadari, bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Saran dan kritik sangat diharapkan untuk menyempurnakan tulisan ini dimasa 6ating agar lebih bermanfaat bagi pembaca.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 27 Desember 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ernawati
NPM : 0806421735
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Departemen : Kima
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Isolasi dan Elusidasi Senyawa serta Uji Aktivitas Biologi dari kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 27 Desember 2010
Yang menyatakan



(Ernawati)

ABSTRAK

Nama : Ernawati
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul : Isolasi dan Elusidasi senyawa serta Uji Aktivitas biologi dari Kulit Batang Tanaman *Calophyllum hosei* Ridley

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dan elusidasi untuk mendapatkan senyawa aktif dari kulit batang tanaman *Calophyllum hosei* Ridley. Isolasi didahului dengan ekstraksi menggunakan pelarut *n*-heksana. Ekstrak yang diperoleh dimurnikan melalui kromatografi kolom lambat dengan fase diam silika gel G 60(Merck 1.07734) dan larutan pengelusi adalah *n*-heksana dengan etil asetat yang dibuat isokratik dengan perbandingan 98:2. Satu senyawa kimia berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksana. Senyawa tersebut berupa kristal kuning dengan titik leleh 185-187°C. Pada isolasi berikutnya dari ekstrak etil asetat berhasil diperoleh kristal putih dengan titik leleh 210-212°C. Senyawa tersebut didapat dengan menggunakan perbandingan *n*-heksana : etil asetat = 9:1. Fraksinasi dilanjutkan dengan pemurnian rekristalisasi menggunakan sistem dua pelarut. Struktur molekul ditentukan berdasarkan spektrum UV, IR, LC-MS, GC-MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa isolat fraksi *n*-heksana merupakan turunan santon dan isolat fraksi etil asetat merupakan senyawa triterpen yaitu friedelin. Uji antioksidan menggunakan metode *radical scavenger* terhadap DPPH pada fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol menghasilkan IC₅₀ berturut-turut adalah 58,29 µg/mL, 9,39 µg/mL dan 11,30 µg/mL. Uji aktivitas senyawa turunan santon dan friedelin terhadap sel leukimia L 1210 menghasilkan IC₅₀ berturut turut adalah 4,82 µg/mL dan 5,76 µg/mL µg/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua senyawa aktif sebagai anti kanker.

Kata kunci : *Calophyllum hosei* Ridley, Isolasi, antioksidan, antikanker, santon, friedelin

xii + 71 halaman; 13 gambar; 9 tabel

Daftar Pustaka : 57 (1973-2008)

ABSTRACT

Name : Ernawati
Program Study : Magister Ilmu Kimia
Title : Isolation and Elusidation of Chemical compounds and Biology Activity from The Steam Bark of *Calophyllum hosei* Ridley

Research was conducted to obtain the active compound from the stem bark of *Calophyllum hosei* Ridley. Extraction of stem bark of *C.hosei* Ridley using *n*-hexane for 6 days. The extract was run on column chromatography with the stationary phase silica gel G 60 (Merck 1.07734) and the solvent system were *n*-hexane and ethyl acetate with 98:2 ratio. The compound was isolated from *n*-hexane extract is a yellow crystals with melting point 185-187°C. Subsequent compound of the ethyl acetate extract is white crystals with a melting point of 210-212°C. The compounds was obtained by using the ratio of *n*-hexane: ethyl acetate = 9:1. The molecular structure determined were base on data of UV, IR, LC-MS, GC-MS, ¹H and ¹³C-NMR. The xanthone derivate was isolated from *n*-hexane extract while from ethyl acetate extract was friedelin. Antioxidant test method against DPPH radical scavenger showed the extract of *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol showed value IC₅₀ 58,29 µg/mL; 9,39 µg/mL dan 11,30 µg/mL. The compounds against L 1210 leukemia cells showed IC₅₀ 4,82 µg/mL and 5,76µg / mL for xanthone derivate and friedelin respectively. Both of compounds are active as anticancer.

Key words: *Calophyllum hosei* Ridley, isolation, antioxidant, anticancer, xanthone, friedelin.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan botani tanaman <i>Calophyllum hosei</i> Ridley	5
2.1.1. Taksonomi	5
2.1.2. Morfologi tanaman	6
2.2. Kandungan kimia dari berbagai spesies <i>Calophyllum</i>	6
2.3. Antikanker	12
2.3.1 Hormon.....	13
2.3.2 Alkaloid Vinka	13
2.3.3 Zat pengalkilasi	14
2.3.4 Antimetabolit.....	14
2.4 Antioksidan	16
2.5 Uji aktivitas biologi	17
2.5.1 Uji toksisitas	17
2.5.2 Uji antioksidan	18
2.5.3 Uji antikanker	19
3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	21
3.2 Bahan dan Alat	21
3.2.1 Tanaman	21
3.2.2 Bahan Kimia	21
3.2.3 Hewan Uji	21
3.2.4 Alat-alat.....	21

3.3 Tahapan penelitian	22
3.3.1 Pengumpulan Sampel	22
3.3.2 Determinasi Tanaman	22
3.3.3 Penyediaan Simplisia	22
3.3.4 Proses Isolasi	23
3.3.5 Identifikasi Senyawa	25
3.3.6 Uji Toksisitas	26
3.3.7 Uji Aktivitas Antioksidan	27
3.3.8 Uji Aktivitas terhadap Sel Leukimia L 1210	29
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Pembuatan ekstrak dan fraksinasi	32
4.2. Uji toksisitas terhadap larva udang <i>A. Salina</i> Leach	33
4.3. Uji antioksidan menggunakan metode DPPH	34
4.4 Uji aktivitas sitotoksik terhadap sel Leukimia L 1210	35
4.5 Penentuan struktur molekul senyawa murni	39
4.5.1 Senyawa ECH 1A	39
4.5.2 Senyawa ECH 5	43
4.5.2.1. Biosintesis Friedelin	47
5. KESIMPULAN DAN SARAN	49
DAFTAR PUSTAKA	50

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Tanaman <i>Calophyllum hosei</i> Ridley.....	6
Gambar 2. Mekanisme reaksi <i>radical scavenger</i>	17
Gambar 3. Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan..	19
Gambar 4. Sel Leukimia yang hidup dan yang mati	31
Gambar 5. Skema tahapan penelitian	32
Gambar 6. Hasil KLT isolat ECH 1A	32
Gambar 7. Hasil KLT isolat ECH 5	33
Gambar 8. Hubungan konsentrasi isolat ECH 1A dengan % inhibisi	37
Gambar 9. Hubungan konsentrasi isolat ECH 5 dengan % inhibisi	39
Gambar 10. Struktur molekul senyawa ECH 1A	42
Gambar 11. HMBC dan HMQC senyawa ECH 1A	42
Gambar 12. Struktur molekul senyawa Friedelin	46
Gambar 13. Biosintesis Friedelin	47

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Berbagai senyawa yang diisolasi dari beberapa spesies <i>Calophyllum</i>	10
Tabel 2. Hasil uji toksisitas terhadap larva udang <i>A. salina</i> Leach	33
Tabel 3. Hasil uji antioksidan dengan metode DPPH	35
Tabel 4. Hasil uji antikanker isolat ECH 1A dalam methanol	36
Tabel 5. Hubungan % inhibisi isolat ECH 1A dengan IC ₅₀	36
Tabel 6. Hasil uji antikanker isolat ECH 5 dalam DMSO	38
Tabel 7. Hubungan % inhibisi isolat ECH 1A dengan IC ₅₀	38
Tabel 8. Data pergeseran kimia ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR dan HMBC Senyawa ECH 1A.....	40
Tabel 9. Perbandingan data pergeseran kimia ¹³ C-NMR senyawa ECH 5 dengan friedelin	45

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Hasil identifikasi tumbuhan	55
Lampiran 2. Spektrum massa senyawa ECH 1A.....	56
Lampiran 3. Spektrum Inframerah senyawa ECH 1A.....	57
Lampiran 4. Spektrum UV senyawa ECH 1A.....	58
Lampiran 5. Spektrum ¹³ C-NMR senyawa ECH 1A.....	59
Lampiran 6. Spektrum ¹ H-NMR senyawa ECH 1A.....	60
Lampiran 7. Spektrum HMBC senyawa ECH 1A.....	62
Lampiran 8. Spektrum HMQC senyawa ECH 1A.....	63
Lampiran 9. Kromatogram GC-MS senyawa ECH 5 dan Friedelin.....	64
Lampiran 10. Waktu retensi senyawa ECH 1A	65
Lampiran 11. Spektrum Inframerah senyawa ECH 5.....	66
Lampiran 12. Spektrum ¹ H-NMR senyawa ECH 5.....	67
Lampiran 13. Spektrum ¹³ C-NMR dan DEPT senyawa ECH 5.....	68
Lampiran 14. Spektrum HMBC senyawa ECH 5	69
Lampiran 15. Spektrum HMQC senyawa ECH 5.....	70
Lampiran 16. Spektrum UV senyawa ECH 5.....	71

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia termasuk negara tropis dengan tingkat kelembaban yang tinggi. Pertumbuhan penduduk yang cepat, migrasi yang tinggi, sanitasi yang buruk serta daerah yang terlalu padat, memudahkan penyebaran penyakit seperti demam berdarah, malaria, HIV dan penyakit lainnya.

Masyarakat Indonesia umumnya mempunyai masalah bila berhubungan dengan biaya pengobatan. Maka untuk mengobati penyakit, masyarakat menanggulangnya dengan cara yang termudah yaitu dengan menggunakan tanaman sebagai obat tradisional, terutama yang mudah diperoleh dari lingkungan sekitarnya. Hal ini didukung kenyataan bahwa Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati. Fakta yang tumbuh dimasyarakat dan berdasarkan pengalaman turun temurun, akhirnya tanaman yang mempunyai khasiat tersebut dikenal sebagai tanaman obat (Dharma, A., 1985).

Dalam dasawarsa terakhir ini penggunaan obat tradisional telah menarik perhatian dan kepopulerannya di masyarakat kita semakin meningkat. Salah satu penyebabnya adalah penerimaan masyarakat itu sendiri terhadap kegunaan tumbuhan obat untuk pemeliharaan kesehatan.

Berdasarkan catatan WHO, lebih dari 20.000 spesies tumbuhan obat digunakan oleh penduduk diseluruh dunia (Zuhud, 1994). Indonesia mengandung lebih dari 30.000 jenis tumbuhan tingkat tinggi yang sangat potensial untuk diteliti dan dikembangkan.

Kemajuan teknologi dan ilmu pengetahuan tidak menghilangkan arti pengobatan secara tradisional. Bahkan dewasa ini pengobatan dengan bahan alami semakin populer. Jaminan terhadap kualitas obat alami semakin meningkat dengan cukup tingginya permintaan terhadap bahan baku untuk pembuatan obat herbal. Khasiat dan kualitas dari obat herbal akan tergantung dari komposisi senyawa kimia yang terdapat didalamnya. Untuk meyakinkan konsistensi

khasiat/kualitas suatu ekstrak diperlukan analisis senyawa atau golongan senyawa penanda (*marker compound*) yang terkandung didalamnya, seperti flavonoid, terpenoid dan lain lain. Setelah dianalisis, tumbuhan tersebut dapat dikembangkan menjadi sumber bahan bioaktif. Pemilihan tumbuhan untuk mencari senyawa bioaktif baru dapat dilakukan melalui penelusuran terhadap hubungan kekerabatan antar tumbuhan dengan asumsi tumbuhan yang sekerabat memiliki kandungan kimia yang sama atau paling tidak memiliki rangka atau inti senyawa aktif yang sama.

Diantara tanaman obat berkhasiat tersebut terdapat kelompok *Calophyllum*. Tanaman ini banyak ditemukan di Melanesia, Australia Utara, Semenanjung Malaysia, Sumatra, Kalimantan, hingga Papua (Prosea., 2000). Penyebarannya itulah yang menyebabkan tanaman ini dikenal luas oleh masyarakat.

Kelompok *Calophyllum* merupakan bagian penting dari komposisi hutan Indonesia (Heyne, 1987). Berbagai spesies *Calophyllum* yang tumbuh di hutan Indonesia telah lama digunakan sebagai obat tradisional. Kulit batang *Calophyllum inophyllum* Linn bila direbus dalam air yang ditambah kulit *Intosia amboinensis*, *samama* (*Anthocephalus macrophylus hovel*) dan gayang laut diberikan pada ibu setelah bersalin mempunyai khasiat sebagai pembersih dan memperbaiki keadan masa nifas. Daunnya bila direndam 1 malam dapat digunakan sebagai kompres mata karena bersifat mendinginkan. Minyaknya dapat digunakan sebagai obat kudis, obat rambut dan obat reumatik (Sastroamidjojo ,A, 1987). Getah pohon *C. inophyllum* dan *C. tallichianum* dapat digunakan sebagai obat penyakit kulit (Heyne, 1987)

Di Indonesia ditemukan lebih dari 200 jenis *Calophyllum* yang tumbuh tersebar di hutan tropis kepulauan Nusantara. Spesies yang ada di Indonesia antara lain *C. hasskarlii* T & B, *C. canum* Hook F, *C. amoenum* Wall, *C. lanigerum* Miq, *C. muscigerum* Boerl & Kds, *C. pulcherrimum* Wall, *C. soulatri* Burm, *C. venulosum* Zoll & Mor, *C. wallichianum* Planch & Triana.(Heyne, 1987)

Dari penelitian sebelumnya terhadap *Calophyllum* telah berhasil diisolasi berbagai senyawa. Dari *Calophyllum inophyllum* Munekazu Inuma dan kawan-

kawan mendapatkan kalosanton A dan B (Munekazu, et al., 1994). Dari *Calophyllum brasiliense* Ricardo Reyes dan kawan-kawan memperoleh friedelin, kanofillol dan 8 kumarin (Ricardo, 2004). Dari *Calophyllum membranaceum* diperoleh 3 jenis pyranosanton yaitu nigrolineasanton, kalophinin dan kalosanton (Chen et al., 2008). Pada spesies *Calophyllum inophyllum* Linn didapatkan senyawa yang potensial sebagai anti HIV (Kiran, D, et al., 2007). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Guang Ying Chen dan kawan-kawan pada *Calophyllum caledonicum* ditemukan senyawa santon yang mempunyai aktifitas anti malaria (Chen, 2008). Senyawa yang terkandung dalam marga *Calophyllum* umumnya adalah kumarin, santon, flavonoida, biflavonoida, triterpenoida, asam-asam organik dan senyawa benzofenon (Yamdjo, 2004). Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas farmakologis.

Penelitian marga *Calophyllum* sampai saat ini masih terus berlangsung mengingat besarnya pemanfaatan tanaman ini oleh masyarakat, ketersediaanya yang luas dan masih banyak spesies lainnya yang belum dieksplorasi kandungan kimianya, lebih setengah tanaman marga *Calophyllum* belum diidentifikasi kandungan kimianya (Jamilah, 2008).

Walaupun pada awalnya, penggunaan tanaman obat didasarkan pada pengalaman empiris nenek moyang kita, tetapi pada akhirnya perlu untuk dilakukan penelitian ilmiah guna membuktikan khasiatnya. Dengan mengetahui banyaknya senyawa dan manfaat yang terkandung pada tumbuhan kelompok *Calophyllum*, maka dipandang perlu untuk dilakukan penelitian guna mendapatkan senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Dari penelusuran kepustakaan ternyata belum ada laporan mengenai kandungan kimia dari spesies *Calophyllum hosei* Ridley. Dari latar belakang tersebut maka dicoba untuk diteliti kulit batang tanaman ini yang secara kemitoksonomi berpeluang besar menemukan senyawa kimia yang aktif sebagai antioksidan dan antikanker seperti spesies *Calophyllum* lainnya.

1.2. Identifikasi Masalah

Dari uraian latar belakang, masalah yang dapat diidentifikasi adalah sebagai berikut :

- 1). Senyawa aktif apakah yang terkandung dalam *Calophyllum hosei* Ridley ?
- 2). Diantara fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat, fraksi manakah yang paling aktif yang dapat berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai antioksidan dan antikanker ?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley yang diperoleh dari Hutan Riset Bulungan, Malinau-Kaimantan Timur. Isolasi senyawa kimia dilakukan pada fraksi *n*- heksana dan fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom. Untuk mengidentifikasi beberapa senyawa dilakukan dengan menggunakan data spektrum FT – IR, UV-Vis, GC-MS, LC-MS, dan NMR 2D. Selanjutnya pada senyawa aktifnya dilakukan uji aktivitas biologinya.

1.4. Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diketahui komponen zat aktif yang terkandung dalam kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley. Hal ini berguna untuk melengkapi dan memperkaya data penelitian bahan alam. Uji aktivitas biologinya bermanfaat untuk kepentingan manusia dan memberikan peluang pemanfaatannya sebagai kandidat obat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Botani Tanaman *Calophyllum hosei* Ridley

2.1.1. Taksonomi

Pohon *Calophyllum* termasuk kedalam familia Clusiaceae atau Guttiferae. Di Indonesia ditemukan lebih dari 200 jenis *Calophyllum* yang tumbuh tersebar di hutan tropis kepulauan Nusantara. Spesies yang ada di Indonesia antara lain *C. hasskarlii* T & B, *C. canum* Hook F, *C. amoenum* Wall, *C. lanigerum* Miq, *C. muscigerum* Boerl & Kds, *C. pulcherrimum* Wall, *C. soulatri* Burm, *C. venulosum* Zoll & Mor, *C. wallichianum* Planch & Triana. (Heyne, 1987)

Calophyllum hosei Ridley, berdasarkan taksonomi tumbuhan, (Tjitrosoepomo, 1996) diklasifikasikan sebagai berikut :

- Divisio : Spermatophyta
- Sub Divisi : Angiospermae
- Kelas : Dicotyledoneae
- Sub Kelas : Dilleniidae/Archichilangideae
- Ordo : Guttiferales/Clusiales
- Familia : Guttiferae/Clusiaceae
- Genus : *Calophyllum*
- Species : *Calophyllum hosei* Ridley

Tanaman ini tumbuh tersebar dari Sumatra bagian Tenggara sampai Selatan dan Kalimantan. *Calophyllum hosei* Ridley umumnya tumbuh pada tanah berawa yang airnya jernih di dataran rendah (Prosea, 2000)

2.1.2. Morfologi Tanaman

Calophyllum hosei Ridl merupakan tumbuhan berukuran sedang sampai besar, tingginya sampai 18 meter tetapi dapat pula mencapai 36 meter. Diameter tanaman ini mencapai 45 cm dan tanpa akar penunjang. Ranting umumnya melingkari batang dan tunas tumbuh dipusatnya, 2-4 mm panjangnya, daunnya bulat sampai bulat panjang, berukuran 4-9,5 cm banyak terdapat pada dasar rantingnya. Tiap pohon berbunga antara 7 – 13. Bunganya mempunyai 4 kelopak. Buahnya bulat sampai bulat panjang sekitar 20 mm panjangnya, terbalut selaput tipis pada bagian luarnya. (Prosea, 2000).



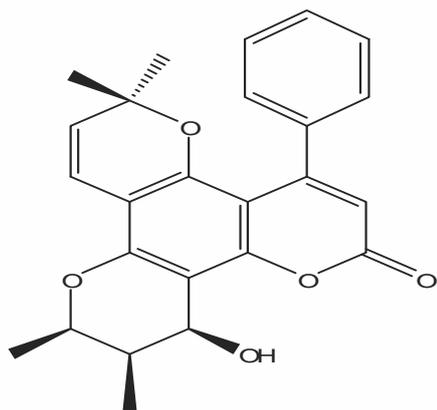
Gambar 1. Tanaman *Calophyllum hosei* Ridley

2.2. Kandungan kimia dari berbagai spesies *Calophyllum*

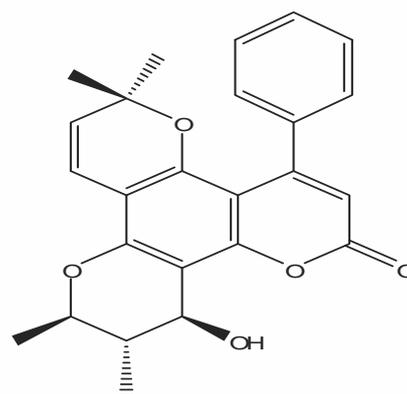
Beberapa jenis *Calophyllum* dan senyawa yang terkandung didalamnya antara lain adalah :

a. *Calophyllum inophyllum* Linn

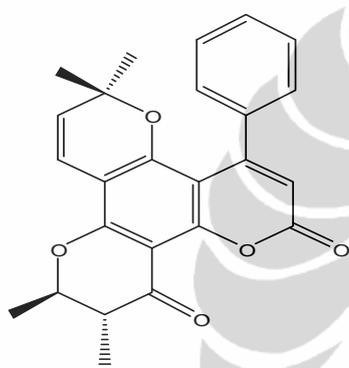
Dari daun dan ranting tumbuhan ini, Kawazu dan kawan kawan berhasil mengisolasi inofillum A(1), B(2), C(3), E(4) dan kalofiloida(5) sedangkan Patil dan kawan kawan berhasil mengisolasi inofillum G-1(6), G-2(7), P(8) (Patil, 1993).



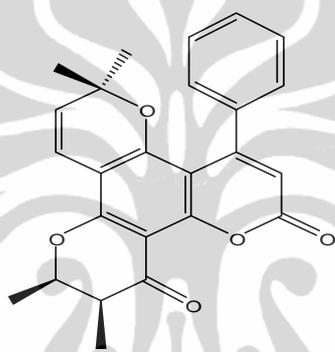
Inofillum A(1)



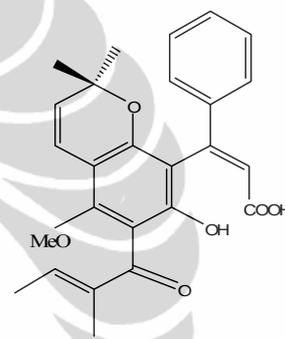
Inofillum B(2)



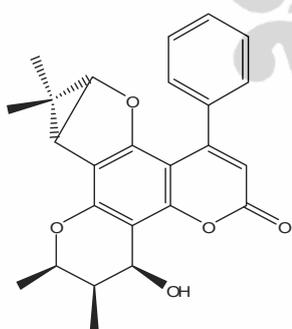
Inofillum C(3)



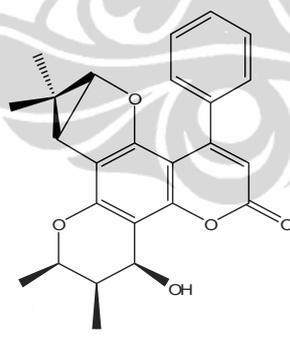
Inofillum E(4)



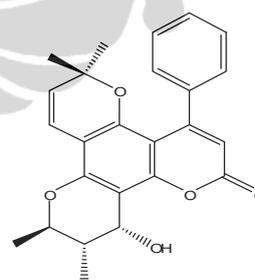
Kalofilloida(5)



Inofillum G-1(6)



Inofillum G-2(7)

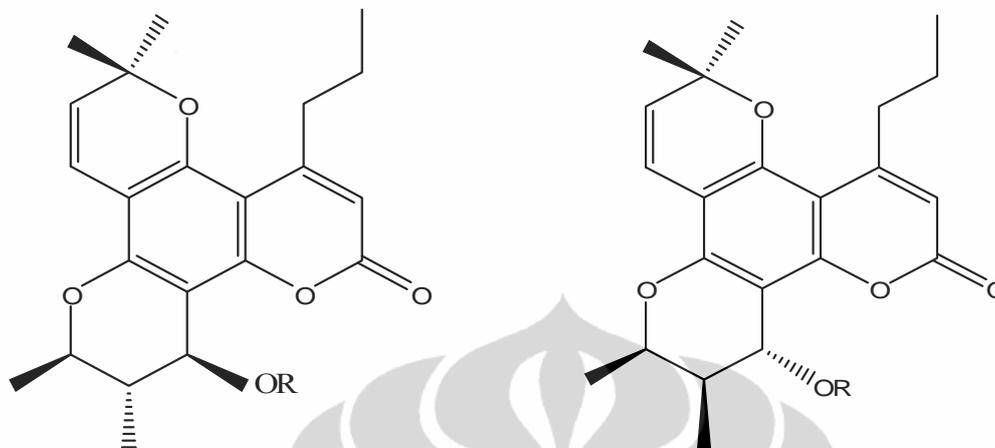


Inofillum P(8)

b. Calophyllum lanigerum Mig

Dari ekstrak buah dan ranting tumbuhan ini, Kashman dan kawan kawan berhasil mengisolasi delapan senyawa kumarin yaitu kаланolida A(9), kаланolida B(10), kаланolida C(14), kаланolida E(15), 12-metoksikаланolida A(11), 12-asetoksi

kalanolida A(**12**), 12-metoksikalanolida B(**13**) dan senyawa 7(**16**) yang merupakan derivat kumarin. (Kashman, 1992)



Kalanolida A

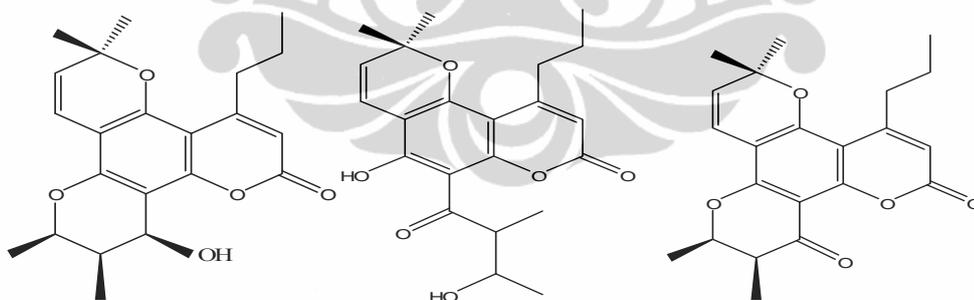
Kalanolida B

R=H : kalanolida A (**9**)

R=H : kalanolida B (**10**)

R=CH₃ : 12-metoksikalanolida A (**11**) R=CH₃: 12-metoksikalanolida B (**13**)

R=Ac : 12-asetoksikalanolida A (**12**)



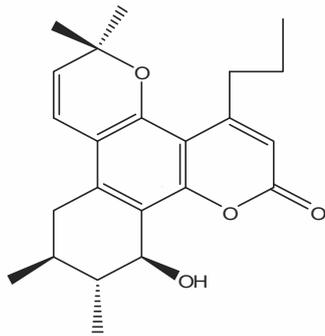
Kalanolida C(**14**)

Kalanolida E(**15**)

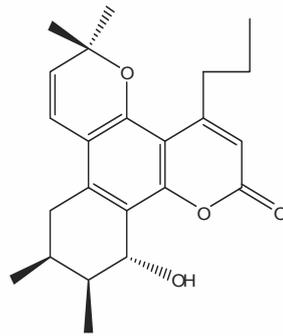
Senyawa 7(**16**)

c. Calophyllum cordatooblongum Thw

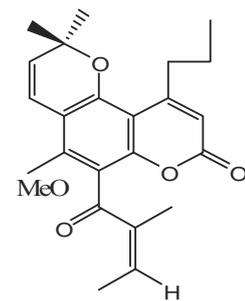
Dari daun tumbuhan ini, Dharmaratne dan kawan kawan mengisolasi 3 senyawa derivat kumarin yaitu kordatolida A(**17**), kordatolida B(**18**), dan oblongulida(**19**) (Dharmaratne, 1985).



Kordatolida A(17)



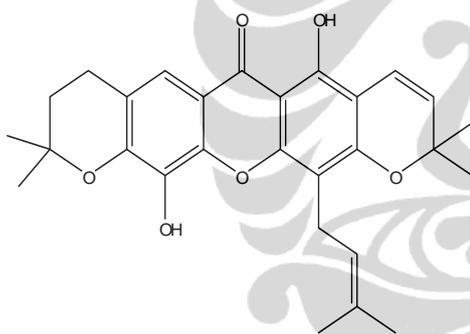
Kordatolida B(18)



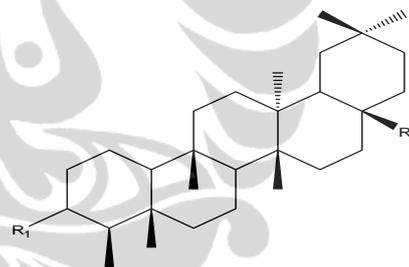
Oblongulida(19)

d. Calophyllum membranaceum

Dari tangkai dan batang tumbuhan ini Guang-Ying Chen dan kawan kawan berhasil mengisolasi 3 piranosanton yaitu nigrolineasanton W, kalophonin, kalosanton dan 3 triterpenoida yaitu friedelin, kanofillol dan asam kanofillat (Chen, 2008).

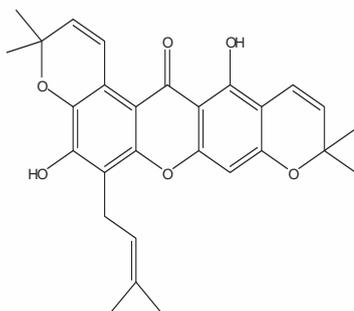


Kalosanton(20)

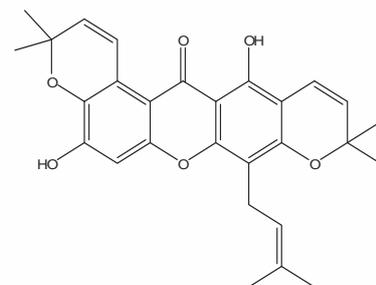
friedelin : R₁=O R₂=Me(21)

Kanofillol :R₁=O R₂=CH₂OH(22)

asam kanofillat :R₁=OH R₂=COOH(23)



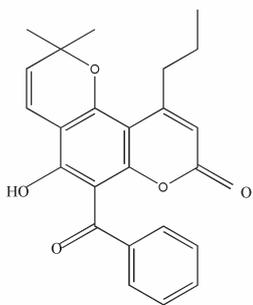
nigrolineasanton W(24)



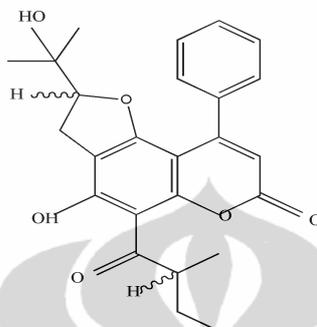
kalophonin(25)

e. Calophyllum brasiliense

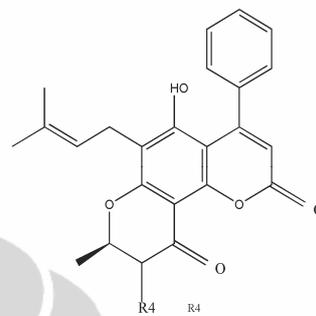
Dari kulit batangnya didapat 3 senyawa kumarin oleh Chihiro Ito (2003) yaitu senyawa brasimarin A(26), brasimarin B(27), brasimarin C(28).



brasimarin A (26)



brasimarin B (27)



brasimarin C (28)

Spesies *Calophyllum* lainnya yang telah diteliti serta senyawa-senyawa yang diisolasi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Berbagai senyawa yang diisolasi dari beberapa spesies *Calophyllum*

No	Jenis	Bagian tanaman	Senyawa yang diisolasi	Rujukan
1.	<i>C. zeylanicum</i> Kosterm	Kulit batang	zeilosanton	Karunanayake, 1981
2.	<i>C. gracilipes</i>	Daun	gracilipen	Chao, 1997
3.	<i>C. apetalum</i>	Kulit, batang, akar	apetalinon A, B, C, zeylosanton	Iinuma, 1997
4.	<i>C. walkeri</i> Wight	Kulit batang dan kayu	taraxerol, friedelin, thwaitesisanton, jakarubin, β -sitosterol, 1,5-dihidroksisanton, 1,7-dihidroksisanton	Dahanayake, 1974
5.	<i>C. teysmanii</i> var. <i>inophylloid</i>	Getah	kalanolida A, kostatolida, kalanon, sulattrolida	Gustafson, 1994
6.	<i>C. inopyllum</i> Linn	Kulit akar dan inti akar	kalosanton D dan E	Iinuma, 1995
7.	<i>C. soulattri</i> Burn	Kulit batang	sulattron A	Nigam, 1988
8.	<i>C. lanigerum</i> Miq	Buah dan ranting	Kalanolid A, B dan C	Kashman, 1992

Tabel 1. Berbagai senyawa yang diisolasi dari beberapa spesies *Calophyllum* (lanjutan)

No	Jenis	Bagian tanaman	Senyawa yang diisolasi	Rujukan
9.	<i>C. calaba</i> L	Daun	asam kapelirat, asam isokapelirat, friedelin, friedelan-3 β -ol, friedelan-3 β ,28-diol, kanofillal, kanofillol, amentoflavon, asam kanofillat	Gunatilaka, 1984
10.	<i>C. lankaensis</i> Kosterm, <i>C. thwitesii</i> Planch & Tr, <i>C. walkeri</i> Wight	Kulit batang	asam kalozeilanat	Samaraweera, 1983
11.	<i>C. inopyllum</i> Linn	Hati kayu	2-(3-hidroksi-3-metilbutil)-1,3,5,6-tetrahidroksisanton, jakarubin, 6-deoksijakarubin, 2-(3-metilbut-2-enil)1,3,5,6-tetrahidroksisanton, 2-(3-metilbut-2-enil)-1,3,5-trihidroksisanton	Goh, 1991
12.	<i>C. inopyllum</i> Linn	Daun	(2S,3R)-2,3-dihidro-5-hidroksi-2,3,8,8-tetra-6-(1-feniletetil)-4H,8H-benzol[1,2-b:3,4-b] dipiran-4-one dan isomernya	Khan, 1996
13.	<i>C. dispar</i>	Kulit batang	Dihidroksi kumarin disparinol B, disparinol D, disparpropilinol B, dispardiol B, 3-hidroksi-2, 2- dimetil dihiropiran, mammea A/AB dioksalanosiklo F	David, 2001

Tabel 1. Berbagai senyawa yang diisolasi dari beberapa spesies *Calophyllum* (lanjutan)

No	Jenis	Bagian tanaman	Senyawa yang diisolasi	Rujukan
14.	<i>C. inophyllum</i> Linn	Biji buah	inokalofillin A,B	Ya-Ching, 2003
15.	<i>C. blancoi</i>	Akar	blancosanton, asetilblancosanton, 3-hidroksi blancosanton	Ya-Ching, 2005
16.	<i>C. soulattri</i> Burm	Daun	friedelin	Deddi, 2008

Vania Floriani Noldin dan kawan-kawan menyatakan bahwa dari genus *Calophyllum* dapat diisolasi jenis senyawa seperti triterpen, kromanon, kumarin, santon, flavonoid, biflavonoid dan senyawa benzofenon (Vania, 2006).

2.3. Antikanker

Kanker secara umum didefinisikan sebagai perbanyakan sel/proliferasi sel yang tak terkendali atau abnormal. Sel-sel kanker merusak dan menyerang seluruh jaringan tubuh melalui aliran darah dan pembuluh getah bening sehingga dapat tumbuh dan berkembang ditempat yang baru (Jamilah, 2008).

Antikanker didefinisikan sebagai senyawa yang dapat mengeliminasi (membunuh) sel-sel kanker dengan sesedikit mungkin efek yang merugikan terhadap jaringan normal. Jadi antikanker atau antineoplastik diharapkan memiliki toksisitas selektif. Karena itu senyawa-senyawa penghambat pertumbuhan kanker dapat memperlambat progresi proses penyakit kanker dengan menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat.

Antikanker menurut mekanisme kerjanya berdasarkan atas gangguan pada salah satu proses sel. Kerja antikanker pada proses ini dibagi dalam 4 kelompok

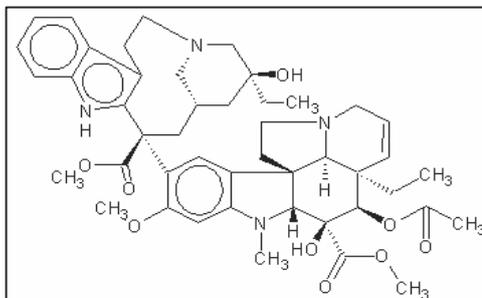
yaitu hormon, alkaloid vinka, zat pengalkilasi (alkilator) dan antimetabolit (Mulyadi, 1996).

2.3.1. Hormon

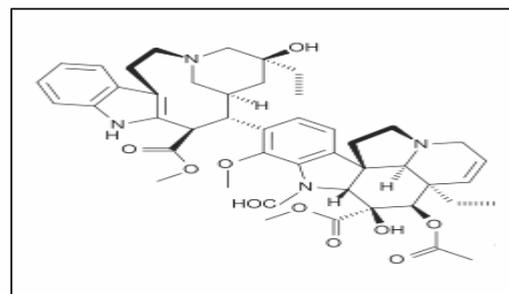
Hormon yang biasa digunakan untuk melawan kanker adalah hormon steroid. Hormon steroid lebih spesifik dibandingkan obat antikanker lain karena bekerja semata-mata pada sel yang berdiferensiasi spesifik dan mempunyai reseptor tunggal untuk hormon tersebut (Mulyadi, 1996). Hormon steroid diantaranya adalah estrogen (diethylstilbestrol, etinilestradiol), antiestrogen (tamoksifen), androgen (testosterone propionate, fluoksimesteron), progestin (hidroksi progesteron kaproat), adrenokortikosteroid (prednison). Estrogen dan progestin merupakan penghambat pertumbuhan karsinoma prostate, suatu jaringan target untuk hormon androgen. Androgen yang biasanya mempunyai efek menghambat pertumbuhan pada sel yang pertumbuhannya distimulasi oleh estrogen, menunjukkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan tumor payudara. Progestin juga menyebabkan pengurangan pertumbuhan kanker pada penderita karsinoma endometrium.

2.3.2. Alkaloid Vinka

Beberapa alkaloid seperti kolkisin, vincristin dan vinblastin dihasilkan oleh tumbuhan, dapat digunakan sebagai antikanker dengan melakukan pemblokiran terhadap pembelahan sel pada tahap metastase (Mulyadi, 1997). Sifat sitotoksiknya disebabkan interaksi antara sitostatika, DNA dan topoisomerase-2. Sitostatika merupakan penghambat enzim topoisomerase-2.



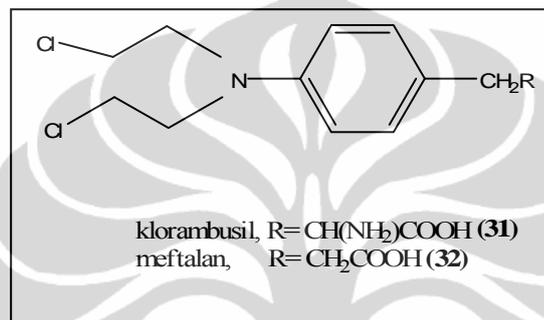
Vinblastin (29)



Vincristin (30)

2.3.3. Zat pengalkilasi (alkilator)

Zat pengalkilasi meliputi sejumlah derivat mustar nitrogen (antara lain klorambusil, melfalan dan siklofosfamida). Cara kerjanya melalui pembentukan ion karbonium atau kompleks lain yang sangat reaktif. Senyawa pengalkilasi mempunyai gugus elektrofilik misalnya alkil halida yang dapat bereaksi dengan nukleofil pada basa DNA sehingga terjadi kerusakan pada fungsi DNA. Hal inilah yang menjadi penyebab sifat sitotoksik dan mutagenik senyawa pengalkil.

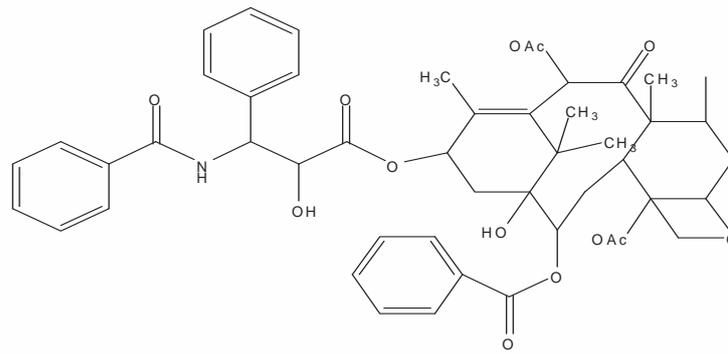


2.3.4. Antimetabolit

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang telah terbukti bekerja sebagai derivat antikanker diantaranya adalah :

a. Taksol

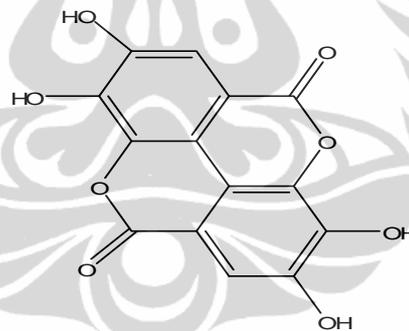
Adalah suatu senyawa turunan diterpenoid yang diperoleh dari kulit batang *Taxus brevifolia* dari suku Taxaceae. *Taxus brevifolia* merupakan pohon kecil yang tumbuh lambat dan ditemukan didaerah lembab dekat aliran sungai dibagian barat laut Pasifik. Pohon ini sangat potensial sebagai obat antineoplastik karena memblok pembelahan sel kanker (Usman, S., 1995)



Taksol (33)

b. Asam elagat

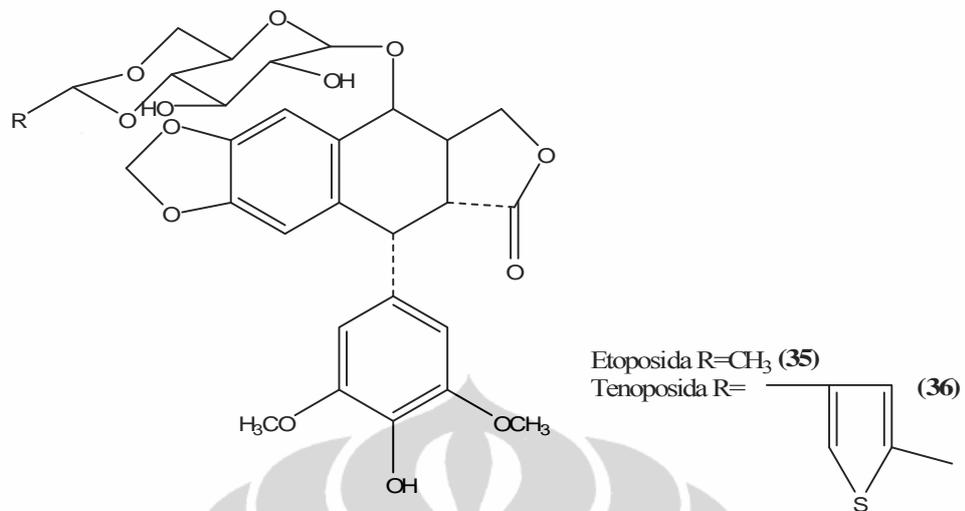
Adalah salah satu senyawa polifenol yang telah diketahui memiliki aktivitas antikanker (Setiawan Dharlimantha, 2007). Senyawa ini berhasil diisolasi dari spesies *Brassica oleracea* Var *italic* (Setiawan Dharlimantha, 2007).



Asam elagat (34)

c. Senyawa etoposida dan tenoposida

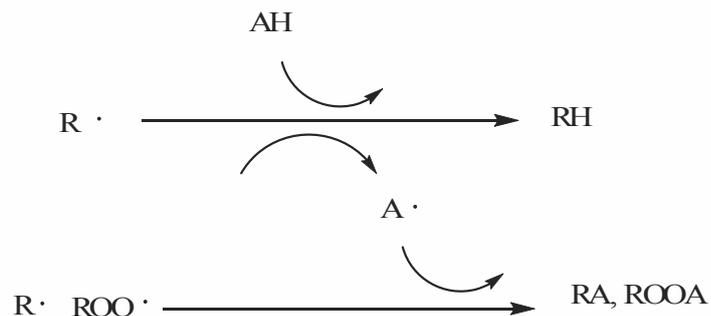
Senyawa ini diperoleh dari akar tanaman *Podophyllum feltatum*. Memiliki aktivitas antikanker karena mengandung zat anti mitosis yang berguna merintang mitosis dengan menghambat enzim topoisomerase 2 sehingga terjadi pemecahan DNA (Tan, 2007). Keduanya digunakan untuk mengobati kanker paru-paru dan testis.



2.4. Antioksidan

Menurut Ketaren, antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat atau mencegah kerusakan lemak atau bahan pangan yang berlemak akibat terjadinya proses oksidasi. Senyawa antioksidan menghambat proses autooksidasi lemak tidak jenuh. Umumnya antioksidan mengandung struktur inti yang sama, yaitu mengandung cincin benzena tidak jenuh disertai gugus hidroksi atau gugus amino (Ketaren, 1986). Senyawa tersebut berfungsi melindungi suatu bahan pangan dari kerusakan lemak atau minyak akibat proses oksidasi.

Salah satu penyebab terjadinya proses oksidasi adalah adanya radikal bebas. Antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas ini membentuk radikal bebas yang lain, yang tidak reaktif dan relatif lebih stabil. Pada proses ini terjadi donor proton atau elektron dari suatu antioksidan kepada radikal bebas tersebut. Antioksidan dapat bertindak sebagai donor hidrogen atau akseptor elektron. Saat antioksidan memberikan atom hidrogen, merupakan tahap awal dari mekanisme antioksidan melalui *radical scavenger* (pemerangkap radikal). Reaksi *radical scavenger* adalah sebagai berikut:



Keterangan
 $\text{R} \cdot$ = Radikal bebas asam lemak
 $\text{ROO} \cdot$ = Radikal peroksida
 AH = Radical scavenger dari antioksidan

Gambar 2. Mekanisme reaksi *radical scavenger*

Mekanisme *radical scavenger* didahului tahap reaksi inisiasi yaitu saat asam lemak diberi inisiator seperti cahaya, panas, enzim atau logam berat sehingga terbentuk radikal bebas ($\text{R} \cdot$). Tahap reaksi berikutnya adalah propagasi, yaitu radikal bebas yang terbentuk saat inisiasi membentuk radikal bebas yang lain dan berlangsung sangat cepat. Radikal bebas ini akan bereaksi dengan O_2 membentuk radikal peroksida ($\text{ROO} \cdot$). Radikal bebas yang terbentuk dideaktivasi dengan senyawa yang berfungsi sebagai *radical scavenger*. Saat bertindak sebagai donor hidrogen pada radikal bebas, *radical scavenger* menyebabkan terjadinya penghambatan pembentukan radikal peroksida. Tahap terminasi adalah tahap akhir dimana terjadi penggabungan antara dua radikal bebas membentuk suatu senyawa yang stabil.

2.5. Uji aktivitas biologi

2.5.1. Uji Toksisitas

Metode yang digunakan secara luas dalam penelitian bahan alam untuk uji toksisitas adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer, 1982). Uji ini dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Selama uji, dilakukan pengamatan mortalitas larva udang yang disebabkan oleh ekstrak

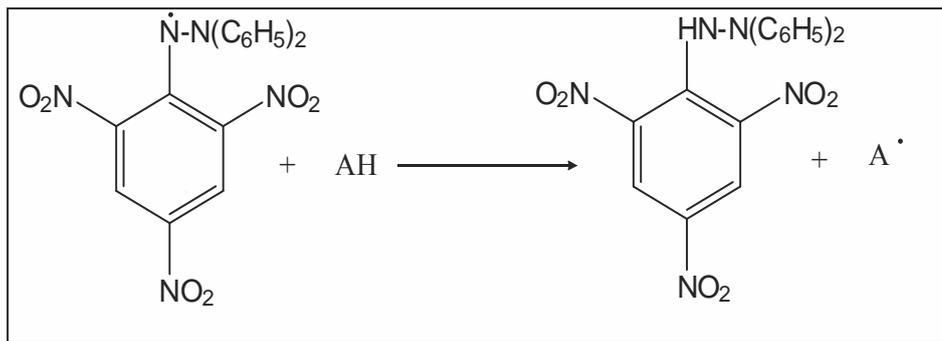
tanaman uji. Senyawa yang aktif akan menghasilkan tingkat mortalitas yang tinggi.

BSLT merupakan salah satu cara yang cepat, prosedurnya sederhana, hasilnya dapat dipercaya serta memiliki spektrum aktivitas farmakologis yang luas. Metode ini seringkali dikaitkan dengan uji pendahuluan antikanker (Meyer, 1982).

Data yang diperoleh diolah untuk mendapatkan angka LC_{50} yaitu dosis yang menyebabkan 50% hewan percobaan mati, dengan tingkat kepercayaan 95% menggunakan *Probit Analysis Method* untuk mendapatkan regresi linier. (Finney, 1971). Senyawa dengan angka $LC_{50} < 1000$ ppm digolongkan kedalam senyawa yang aktif.

2.5.2. Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas. Radikal bebas yang biasa digunakan sebagai model dalam mengukur kemampuan penangkapan radikal bebas adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil yang jika direaksikan dengan ekstrak atau senyawa murni dari tumbuhan yang mengandung antioksidan, maka akan terjadi reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH (ungu) yang kemudian berubah menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (kuning). Prinsip penentuan aktivitas antioksidan metode ini berdasarkan pengukuran serapan senyawa hasil reaksi (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) antara DPPH dengan senyawa antioksidan. Besarnya aktivitas dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang merupakan konsentrasi sampel uji yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH (Blois, 1958).



Gambar 3. Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan

Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan sampel. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel disebut sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbans blanko} - \text{Absorbans sampel}}{\text{Absorbans blanko}} \times 100 \%$$

Selanjutnya nilai hasil perhitungan dimasukkan kedalam persamaan linier dengan konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu Y).

Nilai IC_{50} diperoleh dari perhitungan pada saat nilai % inhibisi sebesar 50 %.

2.5.3. Uji antikanker

Salah satu uji pendahuluan dalam penentuan senyawa yang berkhasiat sebagai anti kanker adalah uji daya hambat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210. Ekstrak kasar dari suatu bahan alam dapat diuji secara langsung dalam biakan sel leukemia L1210. Jika hasilnya positif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210, maka dapat dikatakan ekstrak tersebut aktif sebagai inhibitor.

Sebagai ukuran aktivitas sitotoksik, ditentukan IC_{50} dari ekstrak kasar tersebut. Ekstrak atau fraksi dinyatakan aktif bila $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$. Aktivitas kristal (isolat) dikatakan sangat aktif sebagai anti kanker bila nilai $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ dan tergolong aktif bila $IC_{50} < 8 \mu\text{g/mL}$.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam PUSLIT Kimia LIPI, Serpong dan dilaksanakan mulai bulan Januari 2010 sampai November 2010.

3.2. BAHAN DAN ALAT

3.2.1. Tanaman

Bagian tanaman yang diteliti adalah kulit batang tanaman *Calophyllum hosei* Ridley

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah metanol, *n*-heksana, etil asetat, aseton, aquadest, *n*-butanol, diklormetana, kloroform, etanol, silika gel 60 GF 254 E. Merck 1.07734 (0,063 – 0,200 nm), shepadex LH-20, lempeng KLT (E. Merck 05554), H₂SO₄ 10 % sebagai penampak noda pada KLT, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), air laut, DMSO dan metanol p.a..

3.2.3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach.

3.2.4. Alat-Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan maserasi, penguap putar (*rotary evaporator* Buchii), alat uji titik leleh merek Fisher Scientific serial 90340058, peralatan kromatografi kolom, spektrometri UV-Visible merek Hitachi model U 2000, Infra Merah (FTIR Prestige-21 Shimadzu),

Resonansi Magnet Inti (500 MHz, Jeol), LC-MS merek Mariner Mass Spectrometer menggunakan kolom C18 dengan fase gerak metanol : air = 90:10, digunakan untuk isolat ECH 1A sedangkan untuk isolat ECH 5 digunakan GC-MS merk Agilent Technologies seri 6890 N kolom HP-5(30 m x 0,25 m) film 0,2 μm , peralatan uji toksisitas, antioksidan dan anti kanker.

3.3. Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi :

- Pengumpulan sampel
- Pengidentifikasian sampel
- Proses Isolasi
- Pengidentifikasian senyawa-senyawa dengan menggunakan data spektrum NMR, FT-IR, UV-Vis, dan LC-MS

3.3.1. Pengumpulan Sampel

Kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley diperoleh dari Hutan Riset Bulungan, Malinau-Kaimantan Timur.

3.3.2. Determinasi tanaman

Untuk memastikan kebenaran sampel tersebut, dilakukan determinasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor dengan berpedoman pada pustaka Backer dan Bakhuizen van den Brink (1965).

3.3.3. Penyediaan simplisia

Kulit batang *Calophyllum hosei* Ridley dipotong kecil-kecil, dikeringkan dibawah sinar matahari selama seminggu. Kemudian dimasukkan oven pada suhu 50⁰ C sampai kering. Kemudian dibuat serbuk dengan cara digiling menggunakan grinder. Serbuk direndam (dimaserasi) dengan etanol 70% dalam bejana tertutup rapat selama seminggu. Maserasi dilakukan tiga kali untuk mengekstrak sebanyak mungkin zat-zat yang ada dalam serbuk kulit batang. Hasil perendaman disaring dan dipartisi dengan *n*-heksana dan air dengan perbandingan 1 : 1. Hasil tersebut

merupakan fraksi *n*-heksan. Maserasi dilakukan berulang kali sampai filtrat yang keluar tidak berwarna lagi. Filtrat diuapkan dengan alat *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kasar yang kering. Ekstrak tersebut berwarna coklat kehitaman.

3.3.4. Proses Isolasi

Serbuk kulit kayu *Calophyllum hosei* Ridley (4,18 kg) diekstraksi dengan etanol 70% dengan teknik maserasi, kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak etanol pekat. Ekstrak etanol pekat selanjutnya dipartisi dengan campuran *n*-heksana: air (1:1), diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Kemudian fraksi air dipartisi lagi dengan etil asetat (1:1), diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Pelarut masing-masing fraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* dan cairan kentalnya dioven sampai diperoleh ekstrak kering, kemudian ditimbang.

Fraksinasi berikutnya dilakukan dengan teknik kromatografi kolom cepat. Sebanyak 20,1209 gram fraksi *n*-heksana difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum menggunakan fase diam silika G 60 (230-400 mesh) dan fase gerak *n*-heksana yang dirubah kepolarannya dengan perbandingan gradien menggunakan etil asetat dan metanol. Perbandingan *n*-heksana : etil asetat berturut turut adalah : 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9 dan 0:10, masing-masing dibuat sebanyak 400 mL. Fase gerak berikutnya adalah campuran larutan etil asetat dan metanol dengan perbandingan berturut-turut adalah 9:1; 8:2; 6:4; 4:6; 2:8; 1:9; 0:10 (masing-masing dibuat sebanyak 400 mL). Setiap 100 mL hasil kolom ini ditampung dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh 30 fraksi. Hasil kolom dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT) pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 nm dan 356 nm menggunakan penampak noda H₂SO₄ 5% dalam metanol. Fraksi yang sama digabung kemudian ditentukan nilai R_f spotnya sehingga diperoleh 12 fraksi (FH1 – FH12).

Fraksi 2 (FH2) sejumlah 0,729 gram dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom menggunakan 15 gram silika gel 60 (0,063-0,200 mm) sebagai fase diam dan fase gerak adalah larutan *n*-heksana dan etil asetat dengan

perbandingan 98:2 yang dilakukan secara isokratik. Setiap 100 mL hasil kolom ditampung dan diuapkan dengan penguap putar. Dari kromatografi kolom ini dihasilkan 76 fraksi, selanjutnya dilihat dengan KLT, fraksi yang sama digabung kembali, sehingga dihasilkan 10 fraksi gabungan. Pada fraksi gabungan 2, diperoleh kristal berwarna kuning. Selanjutnya kristal tersebut dimurnikan dengan metode preparatif menggunakan plat KLT. Akan diperoleh noda yang terpisah satu sama lain, dikerok dan dilarutkan dengan pelarut aseton serta dipisahkan dari silikanya dengan cara disaring, kemudian pelarut diuapkan sehingga didapatkan senyawa murni. Kristal tersebut dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi berulang-ulang dengan pelarut aseton dan *n*-heksana sehingga diperoleh 8,2 mg kristal kuning dengan kode ECH-1A.

Fraksinasi selanjutnya dilakukan terhadap fraksi etil asetat. Sebanyak 92,4 gram fraksi etil asetat difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum menggunakan fase diam silika G 60 (230-400 mesh) dan fase gerak *n*-heksana yang dirubah kepolarannya dengan perbandingan gradien menggunakan etil asetat dan metanol. Perbandingan *n*-heksana : etil asetat berturut turut adalah : 20:1; 10:1; 5:1; 3:1; 1:1. Selanjutnya dengan 300 ml etil asetat. Fase gerak berikutnya adalah campuran larutan etil asetat dan metanol dengan perbandingan berturut-turut adalah 20:1; 10:1; 5:1; 3:1; 1:1; 1:2; 1:5; 1:8 (masing-masing dibuat 300 ml). Setiap 100 ml hasil kolom ditampung dan diuapkan dengan penguap putar. Dari kromatografi kolom ini dihasilkan 28 fraksi, selanjutnya dilihat dengan KLT, fraksi yang sama digabung kembali, sehingga dihasilkan 7 fraksi gabungan yaitu FEA1 – FEA7. Dari FEA2 sebanyak 1,397 gram dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom lambat. Fase diam adalah silica G60 sebanyak 8,25 gram dan sebagai fase geraknya adalah campuran *n*-heksana, etil asetat dan metanol dengan kepolaran yang ditingkatkan. Perbandingan *n*-heksana dan etil asetat berturut-turut adalah 98:2; 95:5; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 3:7; 0:1 masing-masing 300 ml. Setiap 100 ml hasil kolom ditampung dan diuapkan dengan penguap putar. Dari kromatografi kolom ini dihasilkan 60 fraksi. Berdasarkan KLT dari hasil yang diperoleh, pola kromatografi yang sama digabung sehingga diperoleh 7 kelompok. Dari kelompok 2 dari eluen menggunakan perbandingan *n*-heksana : etil asetat = 9:1 diperoleh kristal putih. Kristal tersebut dimurnikan dengan aseton dan

kloroform. Senyawa lain larut dalam aseton dan dipisahkan. Pemurnian dilakukan berulang-ulang hingga dihasilkan kristal yang lebih murni dengan melihat hasil KLT nya, baik KLT 1 dimensi maupun KLT 2 dimensi.

3.3.5. Identifikasi Senyawa

Identifikasi dan penentuan struktur molekul dilakukan dengan cara fisika, KLT, spektrofotometri UV-Vis, IR, MS, spektroskopi resonansi magnetik proton ($^1\text{H-NMR}$) dan karbon ($^{13}\text{C-NMR}$) serta teknik NMR-2D yang meliputi HMQC dan HMBC.

a. Pemeriksaan fisika

Isolat dikarakterisasi wujud/bentuk, warna, bau dan titik didih/titik lelehnya menggunakan *Fisher Scientific* Serial 90340058. Caranya yaitu dengan meletakkan sebutir kristal pada wadah yang ada pada alat tersebut. Kemudian suhu dinaikkan secara perlahan-lahan, lazimnya tiap menit temperatur dinaikkan 30°C . Titik leleh ditandai dengan mulai meleburnya kristal sampai seluruhnya berubah wujud menjadi cair.

b. Pemeriksaan kromatografi lapis tipis

Cairan pengelusi dijenuhkan dalam bejana ± 10 menit. Pada plat KLT ditotolkan sampel uji menggunakan pipa kapiler, kemudian dimasukkan kedalam bejana dengan posisi cairan pengelusi dibawah bercak penotolan. Eluen dibiarkan merambat sampai mencapai batas plat yang telah ditandai. Noda diidentifikasi pada sinar UV dengan λ_{max} 254 nm dan 366 nm dan penyemprotan dengan H_2SO_4 5% dalam metanol, uap iodium atau pereaksi lainnya, kemudian ditentukan R_f nya.

c. Pemeriksaan spektrum Infra merah (IR)

Pemeriksaan dilakukan menggunakan alat spektrofotometer FTIR Prestige-21 Shimadzu yaitu dengan menggerus sejumlah 1 mg sampel dengan 100 mg KBr secara homogen, kemudian diukur serapan infra merahnya.

d. Pemeriksaan spektrum ultraviolet

Pemeriksaan dilakukan dengan alat spektrometer UV-Vis merek Hitachi model U 2000, yaitu dengan melarutkan 2 mg sampel (dalam metanol untuk sampel ECH 1A dan dalam kloroform untuk sampel ECH 5) sampai 2 mL, sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 µg/mL. Sampel diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 10, 5, 2, atau 1 µg/mL (dipilih konsentrasi yang memberikan nilai adsorban 0,2-0,8) Kemudian dimasukkan kedalam kuvet, pelarut dimasukkan pada kuvet lain dan diukur secara bersamaan.

e. Pemeriksaan spektrum massa dengan LC-MS

Sebanyak 1 mg senyawa ditimbang dan dilarutkan dalam eluen metanol/air (90:10) yang mengandung 0,3% asam asetat. Diambil 20 µL sampel dan disuntikkan pada LC-MS melalui 2 x 150 mm silika C 18 dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit.

3.3.6. Uji Toksisitas

Uji toksisitas menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach. BSLT dilakukan terhadap fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, isolat ECH 1A dan isolat ECH 5 dari *Calophyllum hosei* Ridl menggunakan metode Meyer.

a. Penetasan *Artemia salina* Leach.

Pembiakan udang dilakukan dalam sebuah kotak yang telah dibagi menjadi dua bagian dengan sekat lalu dimasukkan air laut secukupnya. Salah satu sisi kotak ditutup dengan aluminium foil sedang sisi lain dibiarkan terbuka dibawah sinar lampu. Telur udang dimasukkan ke dalam bagian kotak yang tertutup aluminium foil. Kemudian kotak diletakkan di bawah lampu selama 48

jam. Larva yang menembus daerah terang setelah berumur 48 jam siap digunakan untuk uji toksisitas

b. Penyiapan sampel uji.

Larutan induk dibuat dengan melarutkan 4 mg sampel dengan 10 μL DMSO dan ditambahkan dengan air laut dengan kadar garam 3,8 % hingga 2 mL. Kadar larutan induk adalah 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Fraksi yang akan diuji disiapkan pada konsentrasi 1000, 500, 100 dan 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

c. Uji toksisitas Metode Meyer.

Sebanyak 10 larva udang dalam 100 μL air laut dimasukkan ke dalam vial uji, kemudian ditambahkan 100 μL larutan sampel. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan tanpa penambahan larutan uji tapi dengan penambahan DMSO menggunakan 200 μL air laut. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva udang yang masih hidup dan yang sudah mati. Nilai LC_{50} ditentukan dengan program komputer sederhana untuk analisis probit pada taraf kepercayaan 95 %. Suatu fraksi atau ekstrak dikatakan aktif bila mempunyai nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$, untuk senyawa murni dikatakan aktif bila mempunyai nilai $\text{LC}_{50} \leq 30 \mu\text{g}/\text{mL}$.

3.3.7. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil). Ekstrak dan isolat dibuat pada konsentrasi 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm dan 5 ppm yang kemudian ditambahkan larutan DPPH 1 mM dalam metanol. Sebagai kontrol positif dan untuk pembanding digunakan vitamin C dan quercetin.

* Pembuatan larutan DPPH 1 mmol :

20 mg DPPH (M_r 394,32) ditimbang dan ditambah metanol p.a hingga 50 mL. Lalu disimpan dalam botol gelap dalam ruangan bersuhu rendah.

* Pembuatan larutan baku :

Sebanyak 2 mL larutan DPPH 1 mmol dipipet dan ditambah 10 mL metanol p.a dikocok sampai homogen.

* Pembuatan larutan uji :

Sampel serbuk yang akan dianalisis sebanyak 2 gram ditambah methanol p.a hingga 10 mL (1000 ppm). Sejumlah 100 μ L, 250 μ L, 500 μ L dan 1000 μ L larutan induk dipipet kedalam labu ukur 10,0 mL untuk memperoleh konsentrasi 10, 25, 50, dan 100 ppm. Kedalam masing-masing labu ukur ditambahkan 2 mL larutan DPPH 1 mmol dan ditambahkan methanol p.a sampai 10 mL. Setelah homogen, diinkubasi dalam penangas air pada 37⁰C selama 30 menit. Serapan dibaca pada panjang gelombang 515 nm.

* Pembuatan larutan kuersetin sebagai pembanding

- Pembuatan larutan induk kuersetin konsentrasi 1000 μ g/mL
Sejumlah 1,0 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 1 ml metanol, kemudian diocok hingga homogen

- Pembuatan larutan seri kuersetin 5, 10, 15, 20 dan 25 μ g/mL

Dipipet 10, 20, 30, 40 dan 50 μ L larutan induk kuersetin kedalam 5 tabung reaksi. Pada masing-masing tabung ditambah dengan metanol sampai volume total 600 μ L, kemudian ditambahkan 400 μ L DPPH dan kocok hingga homogen, setelah itu ditambahkan lagi 1 ml metanol dikocok kembali hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang $\lambda = 515$ nm..

Prosentase aktivitas diukur dengan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbans blanko} - \text{Absorbans sampel}}{\text{Absorban blanko}} \times 100 \%$$

Nilai IC_{50} dapat ditentukan dengan dengan 2 cara :

1. Menarik garis langsung pada nilai % inhibisi =50 dari grafik hubungan antara konsentrasi (ppm) pada sumbu X dengan % inhibisi pada sumbu Y.
2. Menghitung data menggunakan persamaan garis linier $y = ax + b$. Nilai IC_{50} dihitung menggunakan rumus persamaan regresi (Blois, 1958)

3.3.8. Uji Aktivitas Terhadap Sel Leukemia L1210

Salah satu cara uji pendahuluan dalam penentuan senyawa yang berkhasiat sebagai anti kanker adalah uji daya hambat terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210. Sel leukemia L1210 yang menjadi target percobaan aktivitas anti kanker ini adalah satu galur (strain) sel leukemia tikus yang secara rutin telah digunakan untuk uji senyawa anti kanker, baik *in vitro* maupun *in vivo* menggunakan tikus percobaan. Sel leukemia L1210 diperoleh dari *The Institute of Physical and Chemical Research Japan* (RIKEN). Sel leukemia L1210 tersebut kemudian disuspensikan ke dalam formula media *RPMI-1640* yang mengandung larutan *Bovine Calf Serum*. Pengujian aktivitas antikanker dilakukan pada senyawa murni ECH 1A dan ECH 5.

Pembuatan media

RPMI-1640 seberat 10,4 g yang mengandung L-glutamin dilarutkan dalam 1 L air steril (A). Kemudian 1,3 g $NaHCO_3$ dilarutkan dalam 50 mL air steril (larutan B). Sebanyak 25 mL larutan B ditambahkan ke dalam 475 ml larutan A, maka diperoleh 500 ml media (C). Untuk keperluan uji, 15 ml *calf bovine serum* ditambahkan ke dalam 85 mL larutan C. Semua pekerjaan dilakukan di ruang steril. Sel leukemia L1210 disuspensikan ke dalam media yang telah mengandung *calf bovine serum* sehingga jumlah sel sekitar 2×10^5 sel/mL. Sel leukemia L1210 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *The institute of Physical and Chemical Research Jepang*.

Pengujian aktivitas terhadap isolat ECH 1A dilakukan dalam metanol sedangkan terhadap isolat ECH 5 dilakukan dalam DMSO. Pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak dilakukan dengan variasi dosis 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL DMSO atau metanol). Media yang telah mengandung suspensi sel leukemia L1210 (2×10^5 sel/ml) dan zat uji dimasukkan ke dalam *multi well plate tissue's culture* sehingga volume totalnya 1 mL dalam setiap sumuran. Sebagai kontrol digunakan 10 µL DMSO (metanol bila pelarut zat uji metanol) yang telah ditambahkan 990 µL suspensi sel. Percobaan dilakukan duplo, selanjutnya suspensi sel yang telah diisi zat uji diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator 5% CO₂. Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer Neubauer improved*. Untuk membedakan antara sel hidup dengan sel mati maka sebelum dilakukan penghitungan, 90 µL suspensi dimasukkan ke dalam *sero cluster plate* (96 sumuran) dan ditambah 10 µL larutan 1% *tryphan blue* dan dihomogenkan. Sebanyak 10 µL larutan dialirkan ke dalam *haemocytometer Neubauer improved*. Setelah itu jumlah sel yang masih hidup dihitung di bawah mikroskop. Sel hidup terlihat sebagai bulatan bening dengan bintik biru inti sel di tengah bulatan, sedangkan sel mati terlihat sebagai bercak biru pekat yang bentuknya tidak teratur.

Persentase penghambatan zat uji terhadap pertumbuhan sel leukemia L1210 dihitung sebagai berikut:

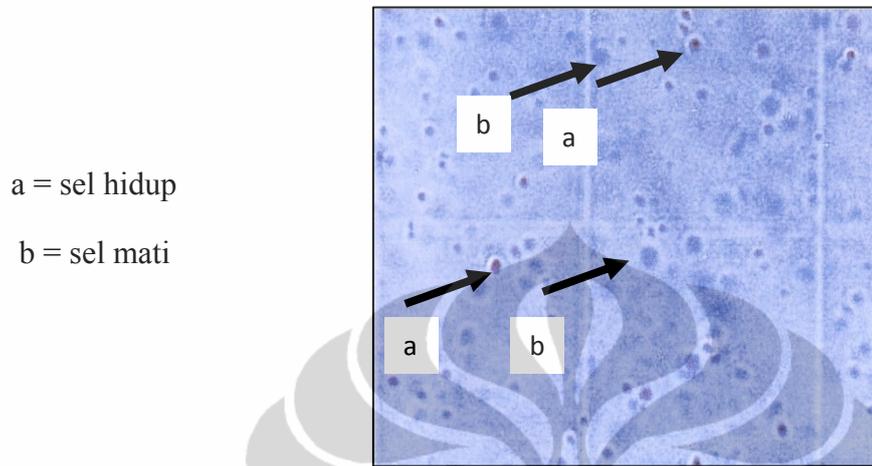
$$\% \text{ inhibisi} = (1 - A/B) \times 100\%$$

A : jumlah sel hidup dalam media yang mengandung zat uji

B : jumlah sel hidup dalam media yang tidak mengandung zat uji (kontrol)

Selanjutnya data persentase inhibisi diplotkan ke tabel probit untuk memperoleh nilai probit. Kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi (x) dan probit (y) sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = a + bx$. Dengan memasukkan nilai $y = 5$ (probit dari 50%), maka diperoleh nilai x (log konsentrasi), nilai IC₅₀ dengan mengkonversikan nilai log konsentrasi ke bentuk

anti log. IC_{50} yaitu konsentrasi zat uji yang dapat menghambat perkembangbiakan sel sebanyak 50% setelah masa inkubasi 48 jam.



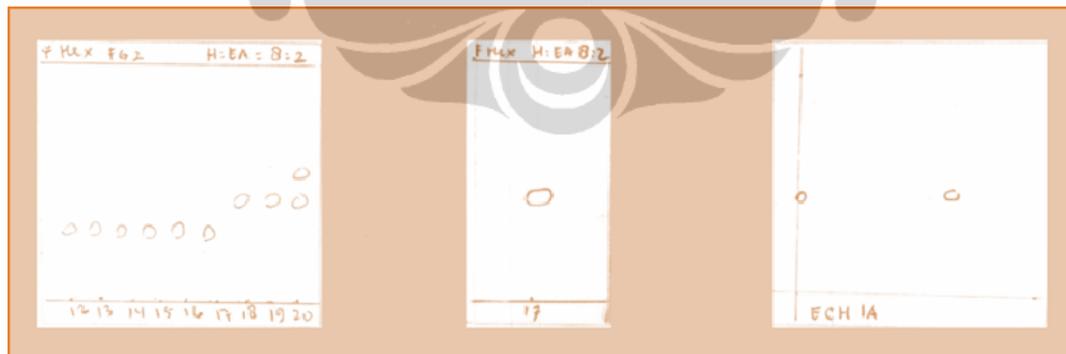
Gambar 4: Sel Leukimia yang hidup dan yang mati

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi

1. Hasil partisi ekstrak kental dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol berturut-turut diperoleh fraksi *n*-heksana 144,6gram, fraksi etil asetat 231,8 gram.
2. Dari fraksi *n*-heksana diisolasi senyawa murni ECH 1A. Senyawa ECH 1A berwarna kuning dan beraroma khas dengan titik leleh 185-187°C. ECH 1A yang dihasilkan adalah sebanyak 8,2 mg yang memiliki R_f 0,38 menggunakan fase gerak *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 98 : 2.. Dari fraksi etil asetat, diisolasi senyawa murni ECH 5. Molekul ECH 5 berupa kristal berwarna putih dengan titik leleh 210-212°C. Senyawa ini dihasilkan sebanyak 11,4 mg yang memiliki R_f 0,29 menggunakan fase gerak *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 9 : 1. KLT isolat ECH 1A dapat dilihat pada Gambar 6, sedangkan isolat ECH 5 dapat dilihat pada gambar 7.

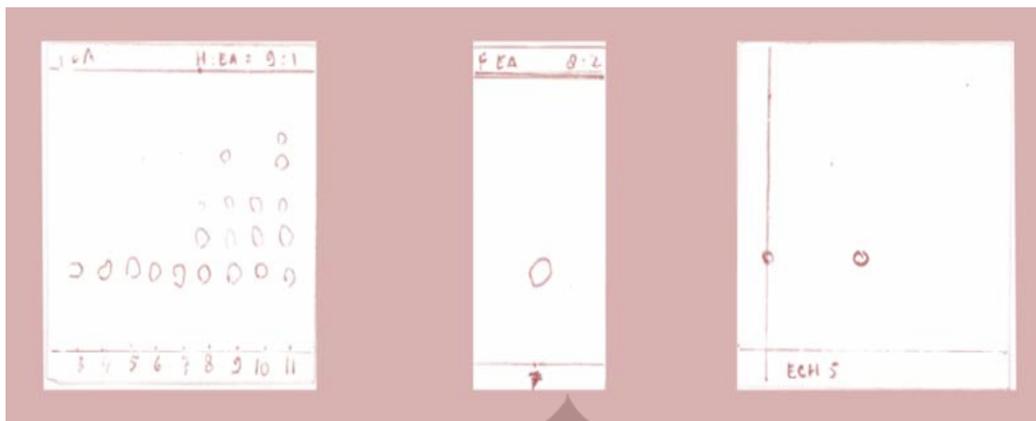


KLT sebelum digabung

KLT gabungan

KLT 2 dimensi

Gambar 6. KLT isolat ECH 1A



KLT sebelum digabung

KLT gabungan

KLT 2 dimensi

Gambar 7. KLT isolat ECH 5

4.2. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *A. salina* Leach

Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva (ekor)								Mortalitas (%)	LC ₅₀ (µg/mL)
		Awal			Total	Mati			Total		
		I	II	III		I	II	III			
Fraksi <i>n</i> -heksana	10	10	10	10	30	5	5	5	15	50	10,00
	100	10	10	10	30	7	7	10	24	80	
	500	10	10	10	30	10	9	10	29	96,67	
	1000	10	10	10	30	10	10	10	30	100	
Fraksi etil asetat	10	10	10	10	30	1	3	3	7	23,33	300,00
	100	10	10	10	30	4	5	4	13	43,33	
	500	10	10	10	30	5	6	6	17	56,67	
	1000	10	10	10	30	7	6	9	22	73,33	
Senyawa ECH 1A	10	10	10	10	30	0	0	0	0	0	1291,48
	100	10	10	10	30	2	0	1	3	10	
	500	10	10	10	30	2	3	2	7	40	
	1000	10	10	10	30	5	4	5	14	46,67	
Senyawa ECH 5	10	10	10	10	30	0	0	0	0	0	281,27
	100	10	10	10	30	3	5	5	13	43,33	
	500	10	10	10	30	4	7	8	19	63,33	
	1000	10	10	10	30	9	9	10	28	93,33	

Dalam uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach, diamati tingkat mortalitas larva udang yang disebabkan oleh ekstrak atau senyawa uji. Senyawa yang aktif akan menghasilkan tingkat mortalitas yang tinggi. Menurut Meyer, ekstrak/fraksi dengan $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ dikatakan bersifat aktif. Sedangkan untuk senyawa murni dikatakan aktif bila LC_{50} nya $\leq 30 \mu\text{g/mL}$. Makin kecil nilai LC_{50} nya, makin aktif senyawa tersebut

Dari hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach diketahui bahwa semua fraksi yang diuji yaitu fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, mempunyai nilai LC_{50} dibawah $1000 \mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi-fraksi tersebut aktif dan bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Dari fraksi-fraksi tersebut, fraksi *n*-heksana memiliki nilai LC_{50} paling kecil ($10 \mu\text{g/mL}$), yang berarti fraksi ini lebih toksik dibandingkan fraksi etil asetat. Hasil uji toksisitas isolat terhadap larva udang *A. salina* Leach menunjukkan bahwa kedua isolat kurang toksik terhadap larva udang *A. salina* Leach.

4.3. Uji Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan penurunan serapan larutan DPPH, akibat adanya ekstrak atau senyawa uji yang dibandingkan dengan larutan DPPH kontrol. Dalam uji antioksidan ini, digunakan senyawa yang telah dikenal sebagai antioksidan yaitu vitamin C dan quercetin sebagai standar.

Hasil uji antioksidan dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji antioksidan dengan metode DPPH

No	Nama sampel	Absorban	Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi	IC 50 ($\mu\text{g/mL}$)
1	Blanko	2,237			
	Vit C	0,081	20	96,38	9,19
		0,169	15	92,45	
		1,052	10	52,97	
		2,055	5	8,14	
2	Quercetin	0,111	15	99,45	4,79
		0,139	10	99,31	
		1,162	5	94,19	
3	F Heksan	0,203	200	90,93	58,29
		0,66	100	70,50	
		1,125	50	49,71	
		1,996	10	10,77	
4	F.Etil asetat	0,2	100	99,00	9,39
		0,169	50	99,16	
		1,045	10	94,78	
		1,523	5	92,39	

Dari hasil uji antioksidan didapatkan, bahwa fraksi etil asetat mempunyai nilai IC_{50} paling kecil (9,39 $\mu\text{g/mL}$) dibanding fraksi *n*-heksana.. Nilai IC_{50} fraksi ini mendekati nilai IC_{50} vitamin C (9,19 $\mu\text{g/mL}$). Dengan demikian, dapat dinyatakan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang mendekati vitamin C. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan cukup tinggi, hal ini diduga karena di dalam fraksi etil asetat terdapat senyawa-senyawa semipolar yang mengandung gugus-gugus yang bisa menangkap radikal (*radikal scavenger*) sehingga meredam reaksi radikal bebas DPPH.

4.4. Uji Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Leukemia L1210

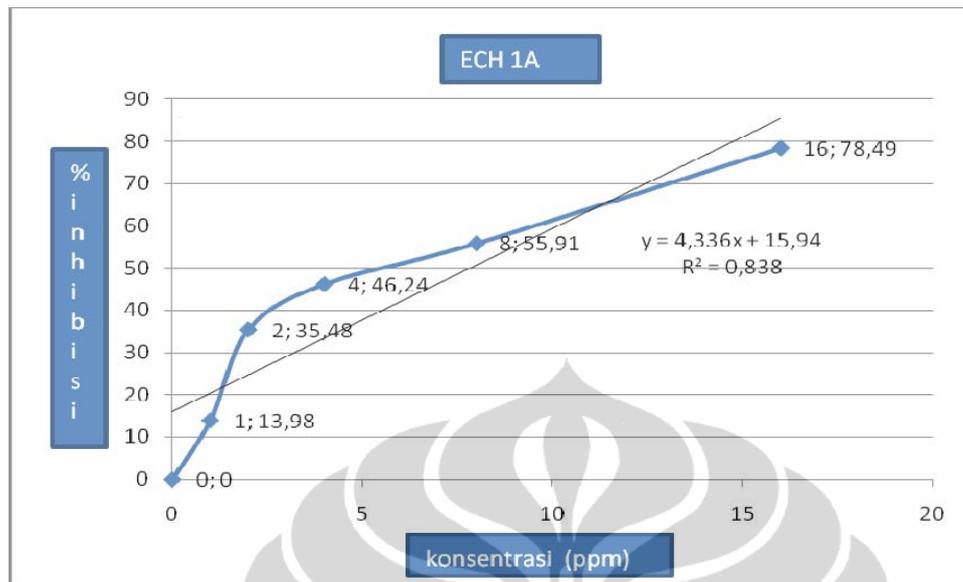
Hasil uji antikanker isolat ECH 1A dalam metanol dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji antikanker isolat ECH 1A dalam metanol

Konstr (ppm)	Sel hidup					Jml sel $\times 10^5$	Rata-rata $\times 10^5$	% Sel hidup	% Inhibisi
	I	II	III	IV	V				
0	9	8	9	11	10	23,5	23,25	100	
	8	10	9	10	9	23,0			
1	7	8	7	9	8	19,5	20,00	86,02	13,98
	8	8	7	9	9	20,5			
2	5	7	6	7	6	15,5	15,00	64,52	35,48
	6	6	5	5	7	14,5			
4	5	4	6	5	5	12,5	12,50	53,76	46,24
	4	6	4	5	6	12,5			
8	3	5	3	4	5	10,0	10,25	44,09	55,91
	5	4	5	3	4	10,5			
16	2	3	2	2	1	5,0	5,00	21,51	78,49
	2	2	1	3	2	5,0			

Tabel 5. Hubungan antara % inhibisi isolat ECH 1A dan IC_{50}

No.	Konsentrasi ppm	% Inhibisi	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$
1.	0	0	4,82
2.	1	13,98	
3.	2	35,48	
4.	4	46,24	
5.	8	55,91	
6.	16	78,49	



Gambar 8. Hubungan konsentrasi isolat ECH1A dengan % inhibisi

Pengujian aktivitas antikanker terhadap isolat ECH 1A dan isolat ECH 5 dilakukan dengan menggunakan sel leukemia L 1210. Aktivitas kristal (isolat) dikatakan sangat aktif sebagai anti kanker bila nilai $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ dan aktif bila nilai IC_{50} nya $4 - 8 \mu\text{g/mL}$. Uji aktivitas sitotoksik terhadap isolat ECH 1A, memperlihatkan bahwa isolat tersebut aktif sebagai antikanker, dengan harga IC_{50} $4,82 \mu\text{g/mL}$. Disini terlihat bahwa isolat ECH 1A dapat menghambat 50% perkembangbiakan sel leukemia dengan konsentrasi kurang dari 8 ppm.

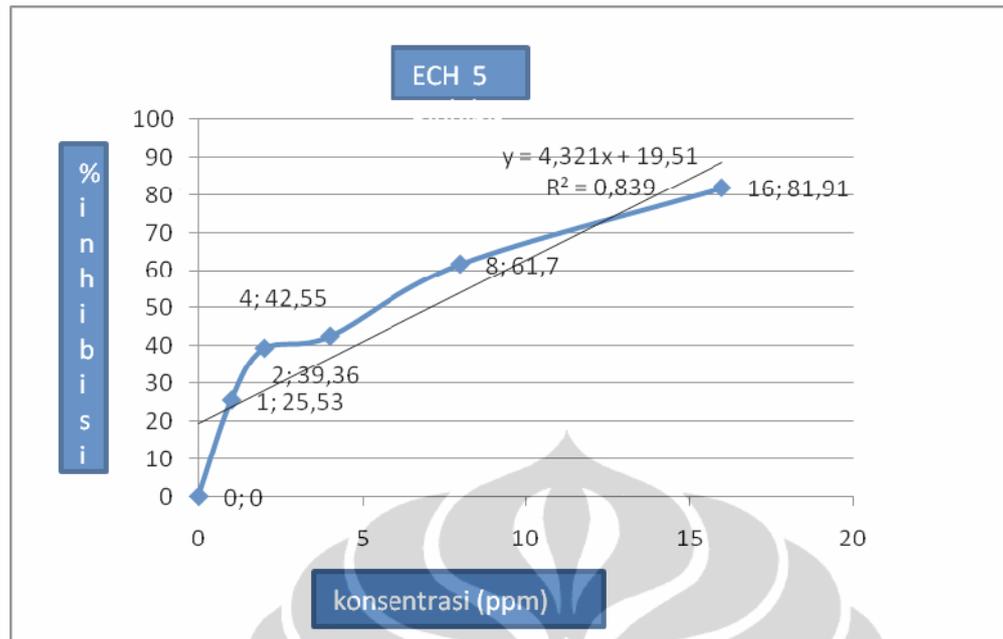
Hasil uji antikanker isolat ECH 5 dalam DMSO dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil uji antikanker isolat ECH 5 dalam DMSO

Konstr (ppm)	Sel hidup					Jml sel x 10 ⁵	Rata-rata x 10 ⁵	% Sel hidup	% Inhibisi
	I	II	III	IV	V				
0	10	10	9	9	8	23,0	23,50	100	
	9	10	9	11	9	24,0			
1	7	7	8	5	8	17,5	17,50	74,47	25,53
	8	7	7	6	7	17,5			
2	5	6	5	5	6	13,5	14,25	60,64	39,36
	6	7	7	5	5	15,0			
4	6	6	4	5	6	13,5	13,50	57,45	42,55
	5	5	4	6	7	13,5			
8	4	4	2	3	3	8,0	9,00	38,30	61,70
	4	3	4	5	4	10,0			
16	2	2	1	1	3	4,5	4,25	18,09	81,91
	3	1	2	1	1	4,0			

Tabel 7. Hubungan % inhibisi isolat ECH 5 dengan IC₅₀

No.	Konsentrasi ppm	% Inhibisi	IC ₅₀ µg/mL
1.	0	0	5,76
2.	1	25,53	
3.	2	39,36	
4.	4	42,55	
5.	8	61,70	
6.	16	81,91	



Gambar 9. Hubungan konsentrasi isolat ECH 5 dengan % inhibisi

Uji aktivitas isolat ECH 5 memperlihatkan bahwa isolat tersebut aktif sebagai antikanker, dengan harga IC_{50} 5,76 $\mu\text{g/mL}$. Isolat ECH 5 dapat menghambat 50% perkembangbiakan sel leukemia dengan konsentrasi kurang dari 8 ppm.

4.5. Penentuan Struktur Molekul Senyawa Murni

Isolasi dari ekstrak *n*-heksana dan etil asetat menghasilkan 2 senyawa yaitu ECH 1A dan ECH 5. Penentuan struktur senyawa tersebut dilakukan dengan menganalisis data spektroskopi yang meliputi spektroskopi massa (MS), inframerah (IR), UV-Vis, resonansi magnetik inti proton ($^1\text{H-NMR}$), resonansi magnetik inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$) dan spektroskopi NMR-2D meliputi DEPT, HMQC dan HMBC.

4.5.1. Senyawa ECH 1A

Senyawa ECH 1A berupa kristal kuning, memiliki titik leleh 185-187°C. Data LC-MS (Lampiran 2) menunjukkan puncak ion molekul (M^{+1}) pada

$m/z = 379,1$ Ini menunjukkan bahwa senyawa yang didapat mempunyai berat molekul 378,1

Dari spektrum IR (Lampiran 3) menunjukkan adanya gugus OH dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang 3417 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 2924 cm^{-1} dan $2852,72\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan vibrasi ulur asimetris gugus C-H alifatis, sedangkan bilangan gelombang pada 1728 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus (C=O), dan 1566 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C aromatis. Pita serapan pada 1294 dan 1220 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C-O, dan pada 972 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tekuk ikatan C-H.

Data dari spektrum UV-Vis (Lampiran 4) menunjukkan bahwa senyawa ini mempunyai serapan pada λ_{maks} 253,0; 332,0 dan 377,0 nm. Serapan pada λ_{maks} 253 nm menunjukkan adanya kromofor (ikatan rangkap terisolasi). Hal ini disebabkan adanya eksitasi elektronik dari π ke π^* . Serapan pada λ_{maks} 332 nm menunjukkan adanya kromofor (ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin aromatis). Hal ini dapat terjadi karena adanya eksitasi elektron dari π ke π^* . Serapan pada λ_{maks} 377 nm menunjukkan adanya kromofor (ikatan rangkap terkonjugasi) yang berkonjugasi dengan gugus C=O. Peristiwa yang terjadi adalah adanya eksitasi elektronik dari π ke π^* dan dari n ke π^* .

Data pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$ dan HMBC senyawa ECH1A dapat dilihat pada Tabel 8 di bawah ini..

Tabel 8. Data pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$ dan HMBC senyawa ECH1A

No	$^{13}\text{C NMR}$	$^1\text{H-NMR}$	HMBC
1	156,3		
2	101,9		
3	<u>159,3</u>		
4	112,2		
5	<u>146,9</u>		
6	<u>121,8</u>	<u>7,37 (1H, dd J 1,8 : 7,95)</u>	116,6; 146,8
7	125	<u>7,28 (1H, dd J: 7,95)</u>	116,6; 156,6; 121,8
8	116,6	<u>7,69(1H, dd J 1,25 : 7,95)</u>	181,9; 156,6; 146,8; 121,8
9	181,9		

Tabel 8. Data pergeseran kimia ^{13}C -NMR, ^1H -NMR dan HMBC senyawa ECH1A (lanjutan)

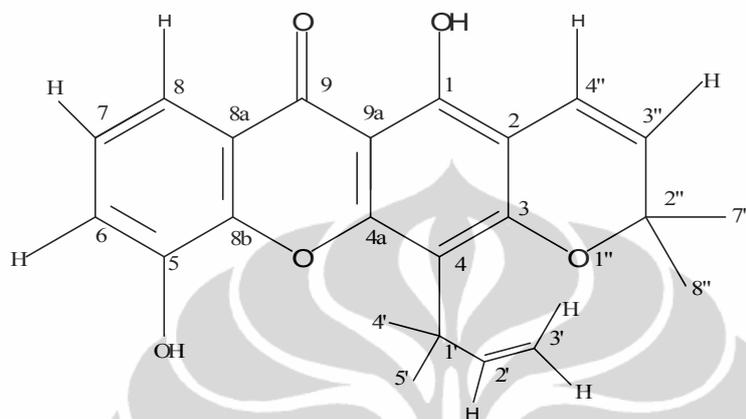
No	^{13}C NMR	^1H -NMR	HMBC
4a	160,8		
8a	138,1		
9a	123,5		
8b	146		
1'	33,3		
2'	123,1	5,23(1H, <i>m</i>)	21,82; 112,2
3'	122,3	3,33 (2H, <i>d J</i> 7,35)	123; 112,2; 159,3
4'	18,1	1,81 (3H, <i>s</i>)	123; 131,8
5'	25,9	1,66 (3H, <i>s</i>)	123; 131,8
2''	78,8		
3''	128	5,76(1H, <i>d, J</i> , 9,75)	101,9; 79,1
4''	116,2	7,06 (1H, <i>d J</i> 9,75)	79,1; 159,3
7''	28,44	1,5 (3H, <i>s</i>)	79,1; 128
8''	28,44	1,5 (3H, <i>s</i>)	79,1; 128
1-OH	13,43	(1H, <i>d</i>)	116,2; 112,2; 160,8
5-OH	6,51	(1H, <i>d</i>)	156,6

Analisis spektrum resonansi magnetik inti karbon atau ^{13}C NMR (Lampiran 5), ^1H NMR (Lampiran 6), HMBC (Lampiran 7), HMQC (Lampiran 8) dan Tabel 8 diatas, menunjukkan bahwa senyawa ECH 1A mempunyai inti aromatis, 5 buah proton aromatis, mempunyai 1 gugus OH yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus C=O, dibuktikan dengan pergeseran kimia proton pada 13,43 ppm, dan satu gugus OH yang tidak membentuk ikatan hidrogen, mempunyai satu gugus isoprenil, dan satu cincin kromen, mempunyai 7 ikatan rangkap didalam cincin, 4 gugus metil (CH_3), 1 gugus metilen (CH_2), 6 gugus metin (CH), 12 atom C quartener (termasuk didalamnya sebuah karbonil $\delta_{\text{C}} = 181,9$) Diperkirakan bahwa senyawa ECH 1A hanya mengandung atom C, H dan O. Atom C berjumlah 23, atom O berjumlah 5, maka dapat dihitung jumlah atom hidrogen.

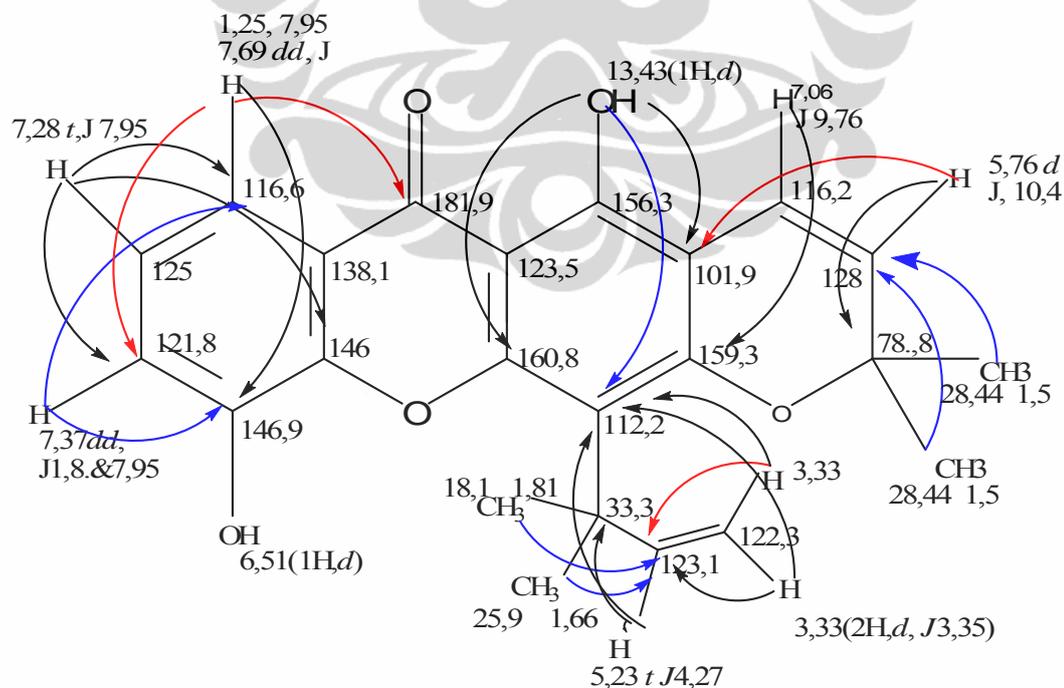
$$\text{Jumlah atom hidrogen adalah } 378 - (23 \times 12) - (5 \times 16) / 1 = 22$$

Diperkirakan rumus molekul senyawa tersebut adalah $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_5$

Dari hasil penelusuran literatur, dan dengan memperhatikan pergeseran kimia pada HMBC, HMQC senyawa tersebut, diperkirakan struktur molekul senyawa ECH 1A seperti gambar 10.



Gambar 10. Struktur molekul senyawa ECH 1A



Gambar 11. HMBC dan HMQC dari senyawa ECH 1A

4.5.2. Senyawa ECH 5

Senyawa ECH 5 berupa kristal jarum berwarna putih. Dari data GC-MS (Lampiran 9) tampak puncak serapan ion molekuler pada $m/z = 426$. Data ini menunjukkan bahwa senyawa ECH 5 mempunyai berat molekul, $[M]^+ = 426$.

Spektrum infra merah (Lampiran 11) memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 2927,9 merupakan vibrasi ulur asimetrik ikatan C – H, dan serapan pada daerah bilangan gelombang (ν , cm^{-1}) 1712,8 merupakan vibrasi ulur gugus C=O.

Spektrum resonansi magnetik inti proton/ ^1H -NMR (lampiran 12) pada pergeseran kimia (masing-masing singlet) $\delta_{\text{H}} = 0,72 ; 0,87 ; 0,88; 0,95; 0,99; 1,01; 1,04; 1,18$ ppm menunjukkan adanya 8 gugus metil (tipe dari triterpen), sedangkan pergeseran kimia antara 1,2 – 1,9 ppm menunjukkan adanya ikatan sp^3 yang diperkirakan berasal dari gugus metilen dan metin.

Dari spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT (Lampiran 13), memberikan gambaran senyawa yang diteliti mengandung 30 karbon yang berupa 8 gugus metil, 11 gugus metilen, 4 gugus metin dan 7 atom karbon kuartener. Delapan gugus metil diperlihatkan oleh sinyal-sinyal karbon pada $\delta_{\text{C}} = 7,02; 14,84; 18,14; 18,85; 20,44; 31,97; 32,27; 35,21$ ppm (hal ini sesuai dengan data ^1H -NMR). Sebelas gugus metilen ditunjukkan pada pergeseran kimia $\delta_{\text{C}} = 18,4; 22,5; 30,7; 32,6; 32,9; 35,5; 35,8; 36,2; 39,4; 41,5; 41,7$ ppm merupakan ikatan sp^3 . Empat gugus metin ditunjukkan pada pergeseran kimia $\delta_{\text{C}} = 42,97; 53,29; 58,41; 59,66$ ppm. Adanya tujuh atom karbon kuartener ditunjukkan oleh puncak-puncak $\delta_{\text{C}} = 28,4; 30,2; 37,6; 38,5; 39,9; 42,3$ dan 213,4 ppm. Pergeseran kimia $\delta_{\text{C}} = 213,40$ ppm ini menunjukkan adanya gugus keton (C=O), hal ini sesuai dengan spektrum IR pada panjang gelombang 1712,8 cm^{-1} .

Dengan asumsi bahwa senyawa ECH 5 hanya mengandung atom C, H dan O dimana jumlah atom C = 30 dan jumlah atom O = 1 (dari gugus keton pada $\delta_{\text{C}} = 213,40$ ppm), maka dapat dihitung jumlah atom hidrogen.

$$\text{Jumlah atom hidrogen} = 426 - (30 \times 12) - (1 \times 16) = 50$$

Dengan demikian rumus molekul senyawa tersebut adalah $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

Untuk mengetahui jumlah cincin dan ikatan rangkap, dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (double bond equivalent) sebagai berikut : (Silverstein et al, 1991)

$$F = X - 0,5 Y + 0,5 Z + 1$$

Dimana : F = jumlah cincin atau ikatan rangkap

X = jumlah atom C atau tetravalent

Y = jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

Z = jumlah atom N, P, atau atom trivalent

Dari rumus tersebut, senyawa ECH 5 mempunyai

$$F = 30 - (0,5 \times 50) + 1 = 6$$

Dari perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa ECH 5 mempunyai jumlah cincin atau ikatan rangkap 6. Dari data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dan dengan melihat jumlah atom karbon, hidrogen dan oksigen serta jumlah cincin mengarah dugaan bahwa senyawa tersebut mengandung triterpen pentasiklik dan satu gugus karbonil ($\text{C}=\text{O}$). Untuk memperkirakan struktur senyawa ECH 5 dilakukan melalui data pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$ dan penelusuran literatur dengan membandingkan profil pergeseran kimia $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa ECH 5 dengan senyawa friedelin, yang dapat dilihat pada Tabel 9 dibawah ini.

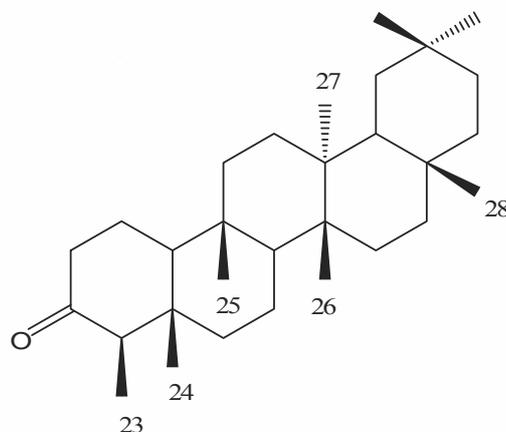
Tabel 9. Perbandingan data pergeseran kimia ^{13}C -NMR senyawa ECH 5 dan friedelin

Atom C	δC Friedelin (ppm) (Mahato et al, 1994)	δC Senyawa ECH 5(ppm)
1	22,3	22,5
2	41,5	41,7
3	213,2	213,4
4	58,2	58,4
5	42,1	42,3
6	41,3	41,5
7	18,2	18,4
8	53,1	53,3
9	37,4	37,6
10	59,4	59,7
11	35,6	35,8
12	30,5	30,7
13	39,7	39,9
14	38,3	38,5
15	32,4	32,6
16	36,0	36,2
17	30,0	30,2
18	42,8	42,9
19	35,3	35,5
20	28,1	28,4
17	30,0	30,2
18	42,8	42,9
19	35,3	35,5
20	28,1	28,4

Tabel 9. Perbandingan data pergeseran kimia ^{13}C -NMR senyawa ECH 5 dan friedelin (lanjutan)

Atom C	δC Friedelin (ppm) (Mahato et al, 1994)	δC Senyawa ECH 5(ppm)
21	32,7	32,9
22	39,2	39,5
23	6,8	7,0
24	14,6	14,8
25	17,9	18,1
26	20,2	20,5
27	18,6	18,9
28	32,1	32,3
29	35,0	35,2
30	31,8	32,0

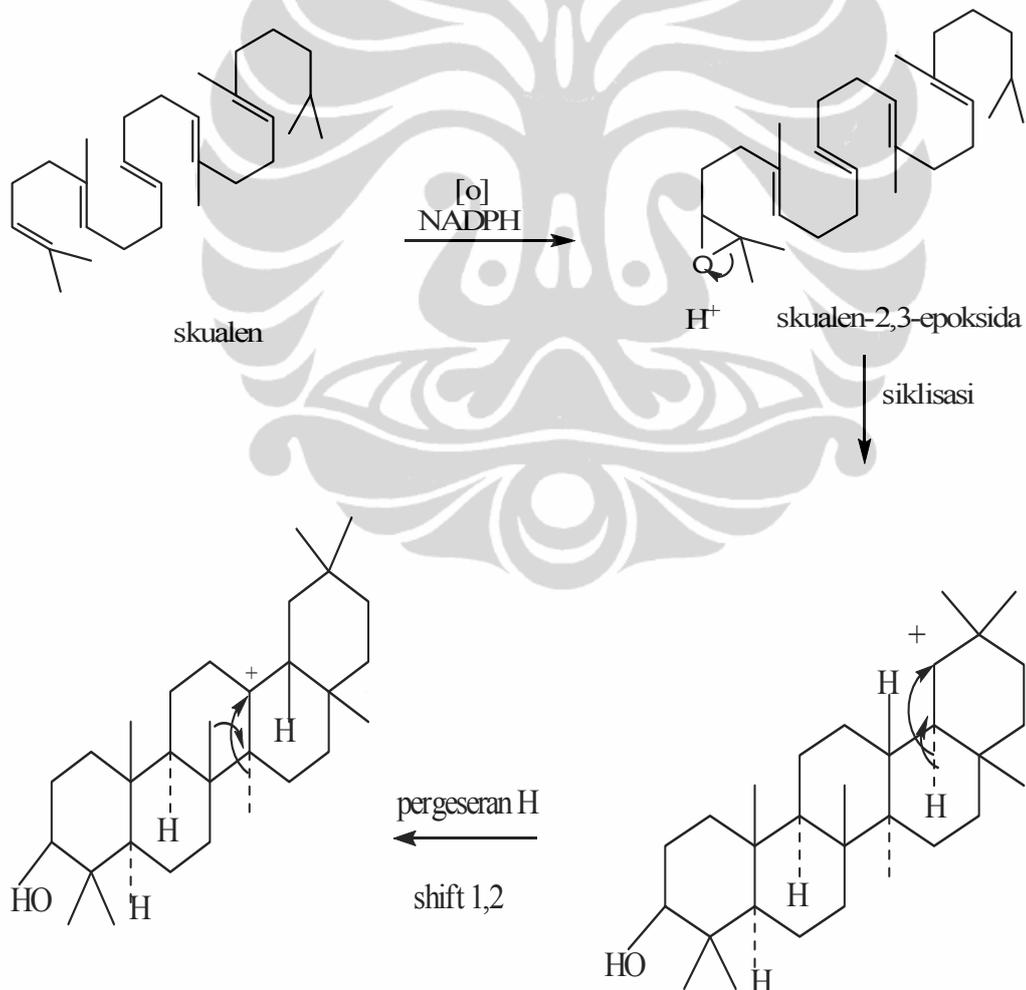
Dari perbandingan harga pergeseran kimia menggunakan data ^{13}C -NMR dan dari data spektrum massa menggunakan GC-MS (Lampiran 9), senyawa ECH 5 sangat mirip dengan friedelin. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa senyawa ECH 5 adalah friedelin.

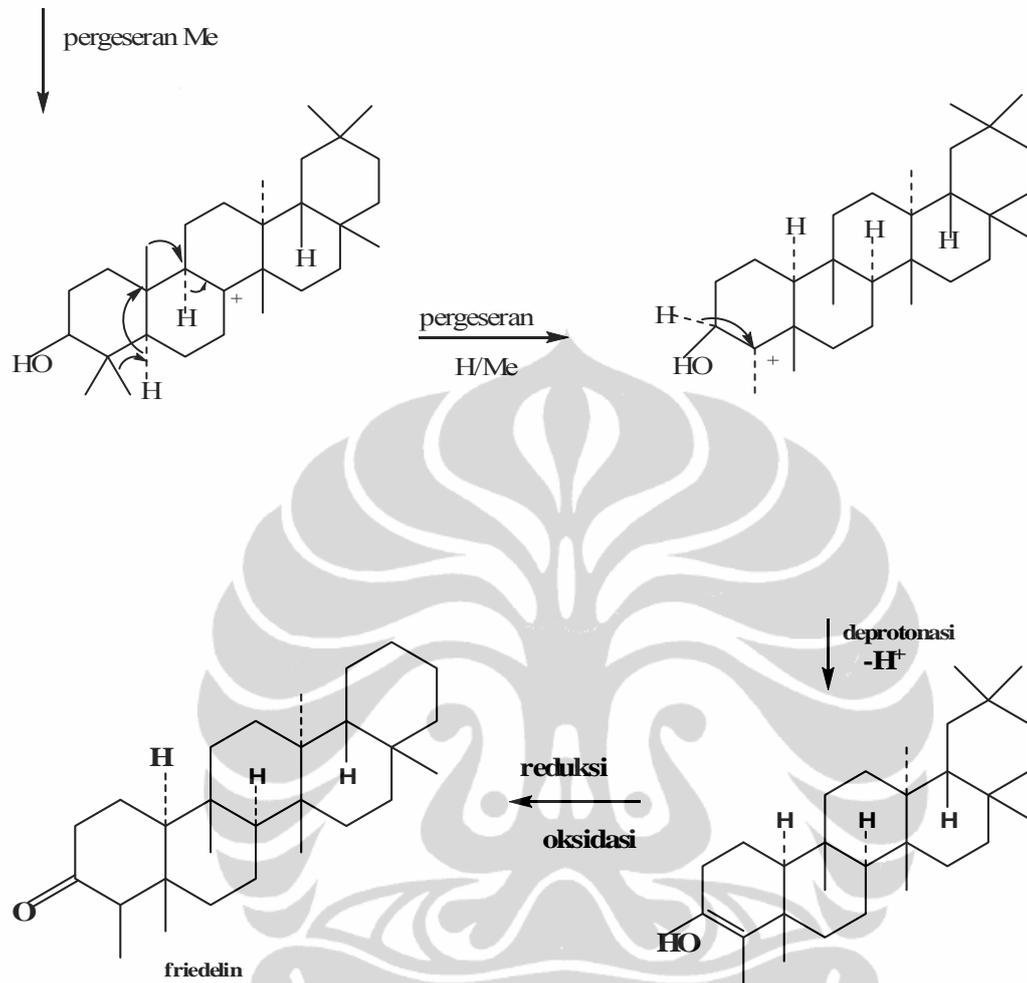


Gambar 12. Struktur molekul senyawa friedelin

4.5.2.1 Biosintesis Friedelin

Senyawa golongan terpenoid diturunkan dari precursor skualen (C_{30}). Senyawa tersebut berasal dari dua satuan farnesilpirofosfat yang bergabung dengan cara yang tidak biasa yaitu kepala-kepala. Skualen mengalami oksidasi menjadi skualen-2,3-epoksida yang selanjutnya mengalami siklisasi menghasilkan zat antara karbokation tipe olean. Zat antara tersebut mengalami beberapa proses enzimatik yaitu penataan ulang gugus H maupun metil yang akhirnya menghasilkan friedelin. Biosintesis friedelin dapat dilihat pada Gambar 13 berikut ini.





Gambar. 13. Biosintesis Friedelin

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

1. Dari fraksi *n*-heksana berhasil diisolasi senyawa ECH 1A, berupa kristal berwarna kuning dengan titik leleh 185-187⁰C sebanyak 8,2 mg yang merupakan turunan santon, sedangkan dari fraksi etil asetat berhasil diisolasi senyawa ECH 5 yang berupa kristal putih dengan titik leleh 210-212⁰C sebanyak 11,4 mg yang merupakan senyawa Friedelin.
2. Uji toksisitas dengan metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach, menunjukkan isolat ECH 1A dan ECH 5 tidak toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan IC₅₀ berturut-turut adalah 1291,48 $\mu\text{g/mL}$ dan 281,27 $\mu\text{g/mL}$.
3. Uji antioksidan dengan metode DPPH pada keempat fraksi menunjukkan fraksi etil asetat lebih tinggi aktivitas antioksidannya dibandingkan fraksi lain dengan IC₅₀ 9,39 $\mu\text{g/mL}$ mendekati nilai IC₅₀ vitamin C yaitu 9,19.
4. Uji antikanker secara *in vitro* terhadap isolat ECH 1A dan ECH 5 diperoleh IC₅₀ masing-masing adalah 4,82 $\mu\text{g/mL}$ dan 5,76 $\mu\text{g/mL}$. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat ECH 1A dan ECH 5 aktif sebagai antikanker.

5.2. SARAN

1. Agar dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kulit batang *Calophyllum hosei* Ridl, dan bagian lain tanaman ini untuk mendapatkan senyawa lain khususnya yang mempunyai aktivitas biologis, baik dari fraksi *n*-heksana maupun fraksi yang lebih polar.
2. Perlu dilakukan pengujian lanjutan terhadap kemungkinan aktivitas biologis yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murgia, A., Butler, J., Halliwell, B., and Ruoma, O.I. (1994). *Toxic. Food Chem*, 32, 31-36.
- Alam, G. (2002). Brine shrimp lethality test (BSLT) sebagai bioassay dalam isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 6(2), 432-435.
- A, Dharma, (1985). *Tumbuhan Obat Tradisional Indonesia*. Jakarta: P.N. Balai Pustaka
- Blois, M.S., In Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y., and Kubo, I. (1998). *Bioorg & Med. Chem*, 5(5), 865-871.
- Chao, S.G., Sim, K.Y., and Goh, S.H. (1997). *J.Nat. Prod*, 60, 1245-1250.
- Chen, Guang-Ying., Zhu, G.Y., Han, C.R., Zhao, J., Song, X.P., Fong, W.F. (2008). A New Pyranoxanthone From The Stems Of *Calophyllum membranaceum*. *Arkivoc*(xiii), 249 – 254.
- Dahanayake, M., Kitagawa, I., Somanathan, R., and Sultanbawa, M.U.S. (1974). *J. C. S. Perkin.*, 2510-2514.
- Dharlimanta, Setiawan. (2007). *Atlas tumbuhan obat Indonesia* (Jilid 2). Jakarta: Pustaka Bunda,
- Dey dan Harborne. 1991. *Methods in plant biochemistry, Assay for bioactivity*. Academic Press Harcourt Brace Javanovich, Volume 6, 47-58.
- Dharma, A.P. (1985). *Tumbuhan Obat Tradisional Indonesia*. Jakarta: P.N. Balai Pustaka
- Dharmaratne, H.R.W. and Wijesinghe, W.M.N. (1997). *Phytochem*, 46(7), 1293-1295.
- Dharmaratne, H.R.W., Sotheeswaran, S., Balasubramaniam, S., and Waight, E.S. (1985). *Phytochem*, 24(7), 1553-1556.

- Deddi P. Putra.,Noveliandi., Husni, Elidahanum. (2008). Friedelin, a Triterpenoid Pentacyclic from The Leaves of *Calophyllum soulattri* Burn.f. (Guttiferae). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*. Vol 13(2), 49-51.
- F,D, Suyatna., S.K. Handoko.(1995). *Farmakologi dan Terapi* (Edisi ke 4). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 368
- Ganiswara, S. dkk. (1995). *Farmakologi dan Terapi*. (Edisi keempat). Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 686-689.
- Goh, S., and Jantan, I. (1991). *Phyto Chem*, 30(1), 366-367.
- Guilet, David., Serapin, Denis., Rondeau, David., Richomme, Pascal., Bruneton, Jean. (2001). Cytotoxic Coumarin from *Calophyllum dispar*. *Phytochemistry*, 58, 571-575.
- Gunatilaka, A.A.L., De Silva, A.M.Y.J., Sotheeswaran. S., Balasubramaniam, S., Wazeer,M.I. (1984), *Phytochem*, 23(2), 323-328.
- Gustafson, K.R., Bokesch, H.R., Fuller, R.W., Cardellina II, J.H., Kadushin, M.r., Soejarto, D.D. and Boyd, M.R. (1994). *Tetrahedron Lett.*, 35(32), 5821-5824.
- Hay, A,E., Helesbeux, J,J.Duval, O.,Labaied, M.,Grellier,P.,Richomme, P. (2004). Antimalarial Xanthenes From *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Science*, 75, 3077 – 3085
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia* (Jilid 2), Terjemahan Balitbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Wanajaya, 1375 - 1378
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia* (Jilid 3), Terjemahan Balitbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Wanajaya
- Iinuma Munekazu., Tosa Hideki., Tanaka T.,Yonemori.S. (1994). Two Xanthenes From Root Bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*, 35(2), 529.

- Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka T., and Yonemori, S. (1995). *Phytochem*, 38(3), 725-728.
- Iinuma, M., Tosa, H., Tanaka T., and Yonemori, S. (1994). *Phytochem*, 35(2), 527
- Iinuma, M., Ho, T., Tosa, H., Tanaka, T., Miyake, R. And Chelladura, V. (1997). *Phytochem.*, 46(8), 1423-1429.
- Ito, Chihiro., Itoigawa., Mishina., Filho., Enjo., Tokuda., Nishino., Furukawa. (2003). Chemical constituent of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *Journal of Natural Product*, 66(3), 368-371
- Jamilah. (2008). *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia serta Uji Aktivitas Biologi Kulit Batang Marga Calophyllum spp.* Depok: Universitas Indonesia.
- Karunanayake, S., Sotheeswaran, S., Sultanbawa, M.U.S., and Balasubramanian, S. (1981). *Phyto Chem*, 20(6), 1303-1304.
- Khan, N.U.D., Parveen, N., Singh, M.P., Achari, B., Dastidar, P.P.G., Dutta, P.K. (1996). *Phytochem*, 42(4), 1181-1183.
- Khasman, Y., Gustafon, K.R., Fuller, R.W., Cardelina II, J.H., McMahon, J.B., Currens, M.J. (1992). *J.Med. Chem*, 35, 2735-2743.
- Ketaren. S. (1986). *Pengantar teknologi minyak dan lemak pangan*. Jakarta: UI-Press Universitas Indonesia.
- Mahato, S.B., Nandy, A.K., and Roy, G. (1992). *Phytochem*, 31(7), 2199-2249.
- Mann, J. (1995). *Secondary metabolism*. (2nd ed). New York: Oxford University Press.
- Meyer, B.N., Ferigni. N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichol, D.E and Mc Laughlin, J.L. (1982). *Med. Plant Res*. 45,31-34.

- Mulyadi. (1996). *Kanker, karsinogen, karsinogenesis dan antikanker*.
Jogyakarta: Tiara Wacana.
- Nigam, S.K., Ranerji, R, Rebuffat, S., Cesario, M., and Pascard, C.B. (1988).
Phyto Chem, 27(2), 527-530.
- Noldin, Vania Floriani., Isaias, Daniela Buffon., Filho, Valdir Cechinel.
(2006). Calophyllum Genus: Chemical and Pharmacological Importance.
Quim. Nova, 29(3), 549-554.
- Patil, A.D., Freyer, A.J., Eggleston, D.S., Haltiwanger, R.C., Bean,
M.F., Taylor, P.B., Caranfa, M.J., Bartus, H.R., Johnson, R.K., Hertzberg,
R.P. and Westley, J.W. (1993). *J. Med. Chem*, 36(26), 4131-4138.
- Pawar, K.D., Joshi, S.P., Bhide, S.R., Thengane, S.R. (2007). Pattern of anti HIV
Dipyranocoumarin Expression in Callus Cultures of Calophyllum
inophyllum Linn. *Journal of Biotechnology*, 130, 346 – 353.
- Prosea. (2000). Plant Resource of South-East Asia (I) Timber trees: Major
Commercial Timbers, 123
- Reyes, Ricardo., Estrada, E., Apan, T.R., Amekraz, B., Aumelas, A., Christofer,
K., Tprres, M.V. (2004). Cytotoxic Effects of Mamea Type Coumarins
From Calophyllum brasiliense. *Life Sciences*, 75, 1635 – 1647.
- Robinson, T. (1995) *Kandungan senyawa kimia tumbuhan tinggi*. (Kosasih
Padmawinata, Penerjemah). Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sastroamidjojo, A. (1987). *Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Dian Rakyat.
- Samaraweera, U., Sotheeswaran, S., Sultanbawa, M., Balasubramaniam, S.
(1983). *Journal Chem Soc Perkin Trans*, 1, 703
- Shen, Ya-Ching., Hung, Meng-Chieh., Wang, Li-Tang., Chen, Ching-Yu.
(2003). *Cem. Pharm. Bull*, 51(7), 802-806.
- Shen, Ya-Ching., Wang, Li-Tang., Khalil, Ashraf Taha., Chiang, Lien Chai.,
Cheng, Pei- Wen. (2005). Bioactive Pyranoxanthenes from The Roots
of Calophyllum blancoi. *Chem. Pharm. Bull*, 53(2), 244-247
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., and Morrill, T.C. (1991). *Spectrometric
identification of organic compounds*. New York: John Wiley & Son Inc.

- Sudarsono, Pudjoanto, A., Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I. A., Drajad, M., Wibowo, S., dan Ngatidjan. (1996). *Tumbuhan obat, hasil penelitian, sifat-sifat dan penggunaan*. Yogyakarta: Pusat Penelitian Obat Tradisional UGM, 44-52
- Shu-Geng., Keng-Yeow Sim., Perera, and Swee-Hook Goh. (1998). Coumarins from *Calophyllum teysmannii* (Guttiferae). *Phytochemistry*, 47(5), 773-777.
- Suwandi, Usman. (1995). *Cermin Dunia Kedokteran*. Jakarta: PT Kalbe Farma, 49-51
- Tjang, Tan Hoan., Rahardja, Kirana. (2007). *Obat-obat penting, khasiat, penggunaan dan efek sampingannya*. Jakarta: Elex Media Komputindo.
- Tjitrosoepomo, G. (1994). *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Tjitrosoepomo, Gembong. (1996). *Taksonomi Tumbuhan Spermathophyta*, Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 266 – 267.
- Wiryowidagdo, S. (2000). *Kimia dan Farmakologi Bahan Alam*. Jakarta: Dirjen Dikti Universitas Indonesia, 255-266.
- Yamdjo, M.C. (2004). *Phytochemistry*, 65, 2789-2795
- Zuhud, E.A.M., Haryanto, (1994). *Pelestarian pemanfaatan keanekaragaman tumbuhan obat hutan tropika Indonesia*. Bogor: IPB dan Lembaga Alam Tropika Indonesia.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Tumbuhan



LIPI

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 7 Agustus 2009

Nomor : 860/IPH.1.02/If.8/VIII/2009
Lampiran : -
Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
Bpk./Ibu/Sdr(i). Dr. Jamilah Abbas
Puspitek Kimia Terapan Serpong

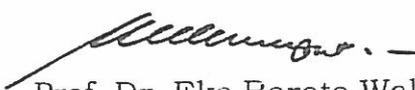
Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

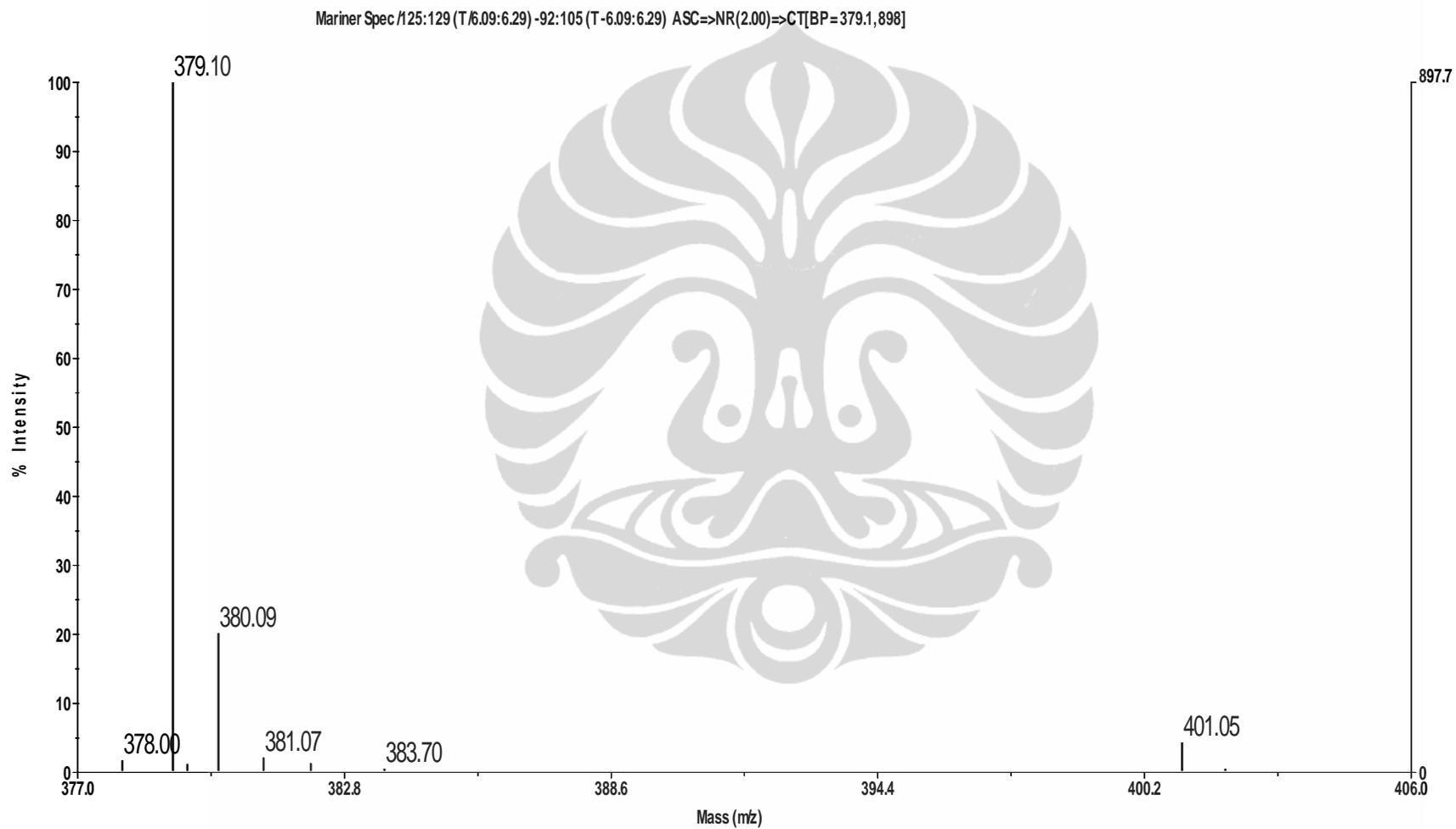
No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	-	<i>Calophyllum hosei</i> Ridl.	Clusiaceae
2	-	<i>Calophyllum canum</i> Hook.f.	Clusiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

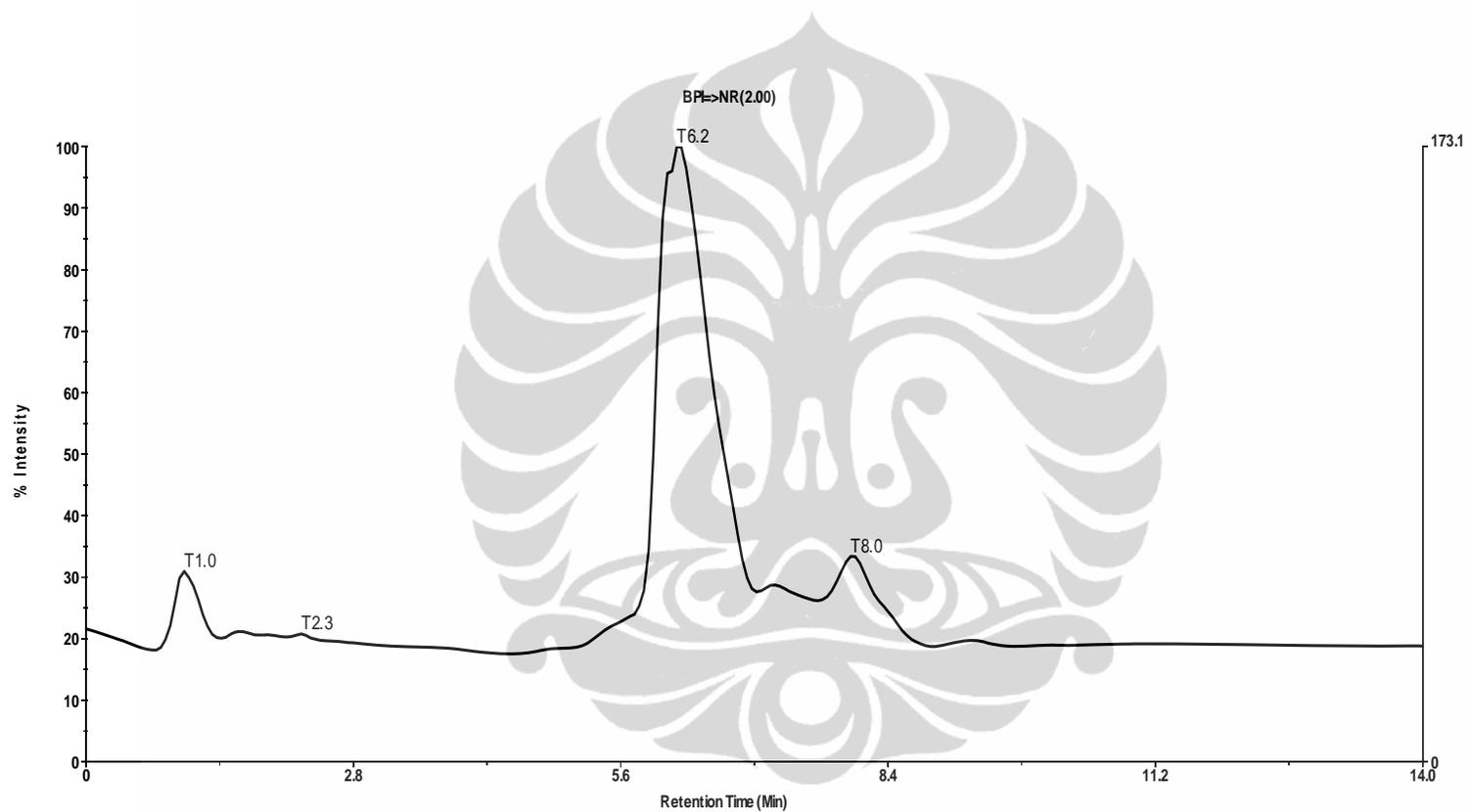
Kepala Bidang Botani
Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
NIP. 195111041975011001

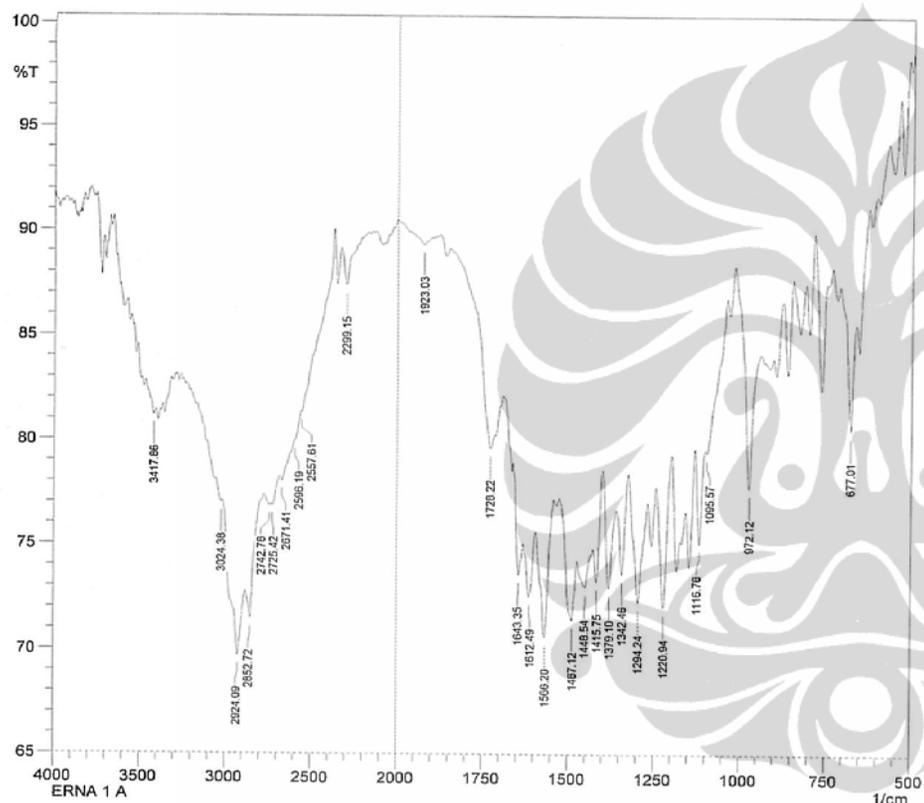
Lampiran 2. Spektrum massa senyawa ECH 1A



Lampiran 2.Lanjutan



Lampiran 3. Spekktrum infra merah senyawa ECH1A

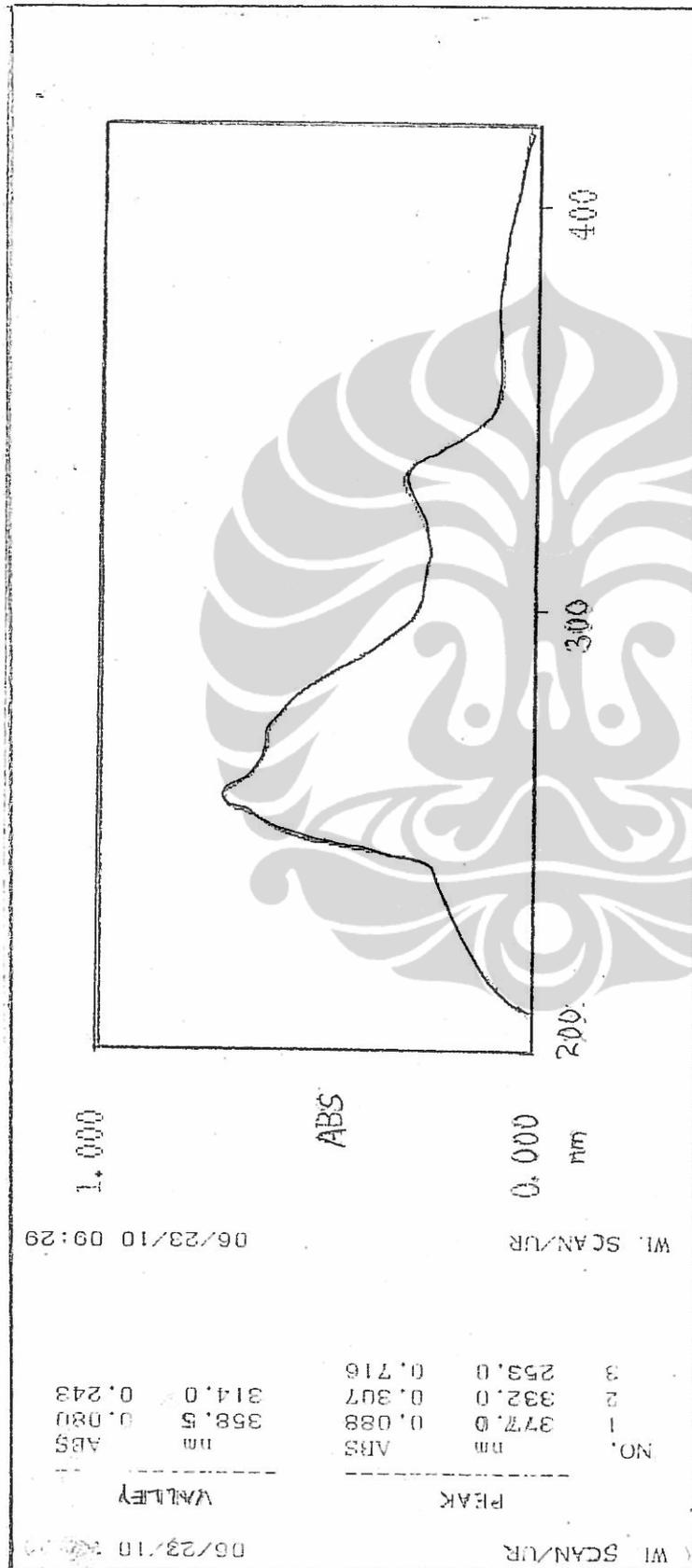


Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are	
1	677.01	80.541	5.65	707.88	661.58	3.429	0.502
2	972.12	77.747	8.145	1014.56	941.26	5.89	1.142
3	1095.57	79.427	0.574	1099.43	1039.63	4.96	0.183
4	1116.78	75.088	4.517	1130.29	1101.35	3.215	0.348
5	1220.94	72.045	6.506	1244.09	1199.72	5.446	0.794
6	1294.24	72.254	5.372	1323.17	1269.16	6.781	0.847
7	1342.46	73.602	3.891	1357.89	1325.1	3.954	0.341
8	1379.1	72.945	4.64	1398.39	1359.82	4.772	0.509
9	1415.75	73.244	2.993	1425.4	1400.32	3.097	0.225
10	1448.54	72.975	1.393	1471.69	1435.04	4.889	0.168
11	1487.12	71.435	3.608	1525.69	1473.62	6.89	0.592
12	1566.2	70.629	5.784	1593.2	1543.05	6.686	0.817
13	1612.49	72.512	2.5	1624.06	1595.13	3.819	0.229
14	1643.35	73.574	2.794	1660.71	1633.71	3.333	0.23
15	1728.22	79.604	1.402	1845.88	1716.65	8.829	0.131
16	1923.03	89.322	0.722	2002.11	1878.67	5.756	0.189
17	2299.15	87.388	1.818	2328.08	2233.57	5.004	0.33
18	2557.61	81.324	0.194	2561.47	2372.44	13.491	0.729
19	2596.19	79.951	0.077	2598.12	2563.4	3.258	0.021
20	2671.41	78.033	0.423	2682.98	2600.04	8.55	0.103
21	2725.42	76.856	0.27	2733.13	2684.91	5.342	0.032
22	2742.78	76.84	0.171	2773.64	2735.06	4.372	0.02
23	2852.72	71.461	2.557	2881.65	2775.57	13.492	0.392
24	2924.09	69.677	4.359	3018.6	2883.58	18.832	1.846
25	3024.38	76.988	0.196	3055.24	3020.53	3.864	0.034
26	3417.86	81.178	0.529	3468.01	3406.29	5.36	0.079

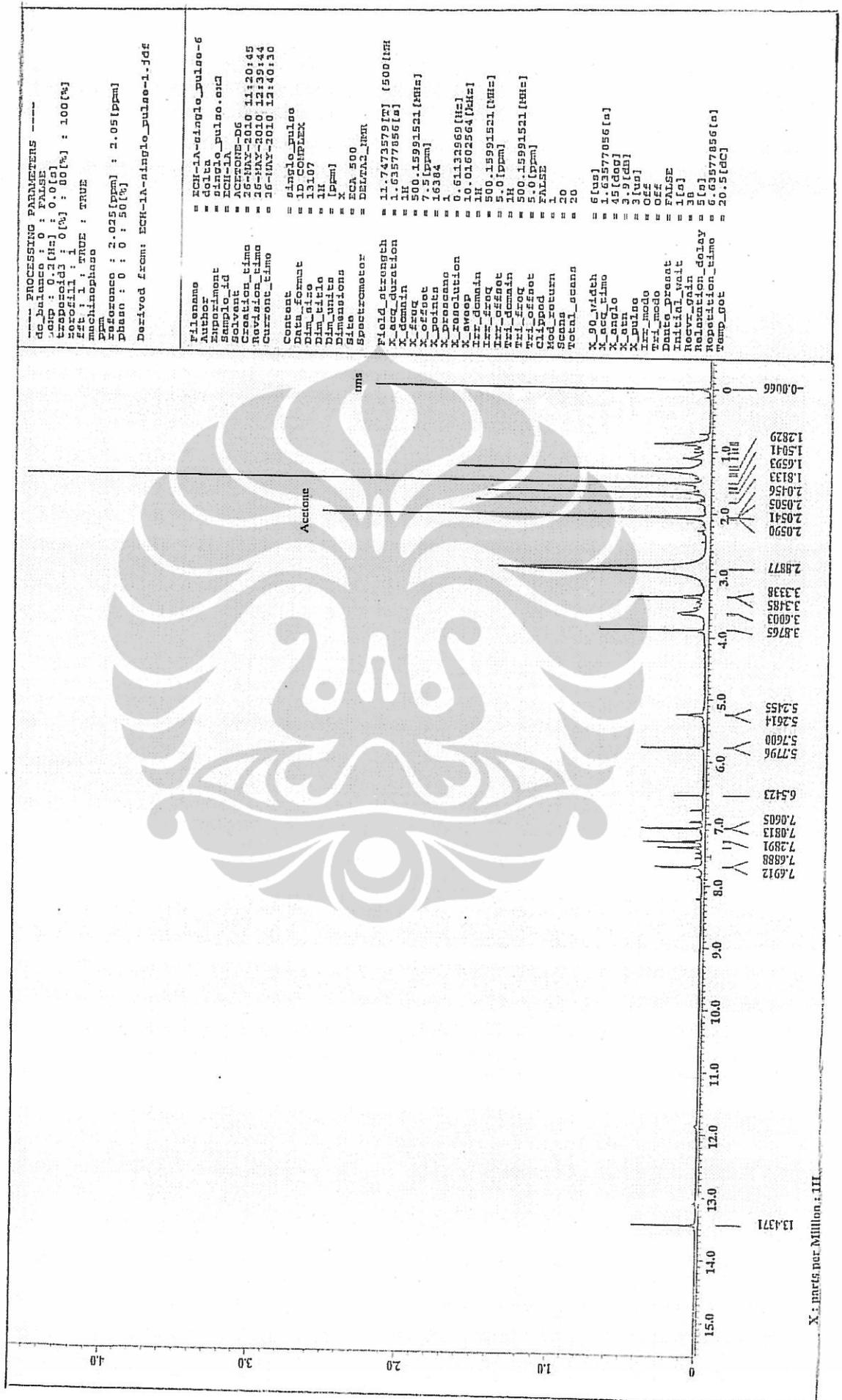
Comment;
ERNA I A

Date/Time; 06/14/2010 02:55:55 PM
No. of Scans;
Resolution;
Apodization;
User; master

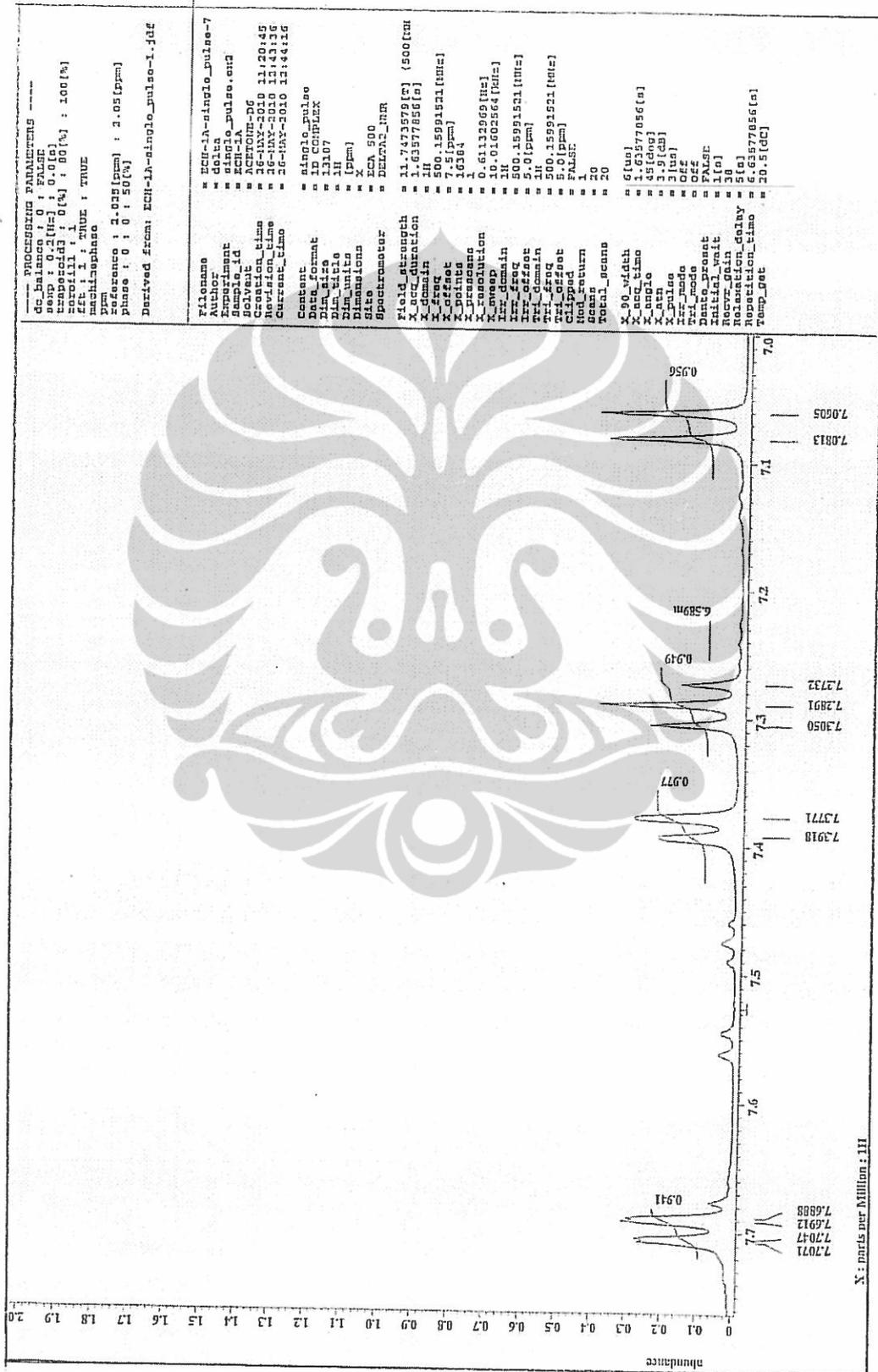
Lampiran 4. Spektrum UV Senyawa ECH1A



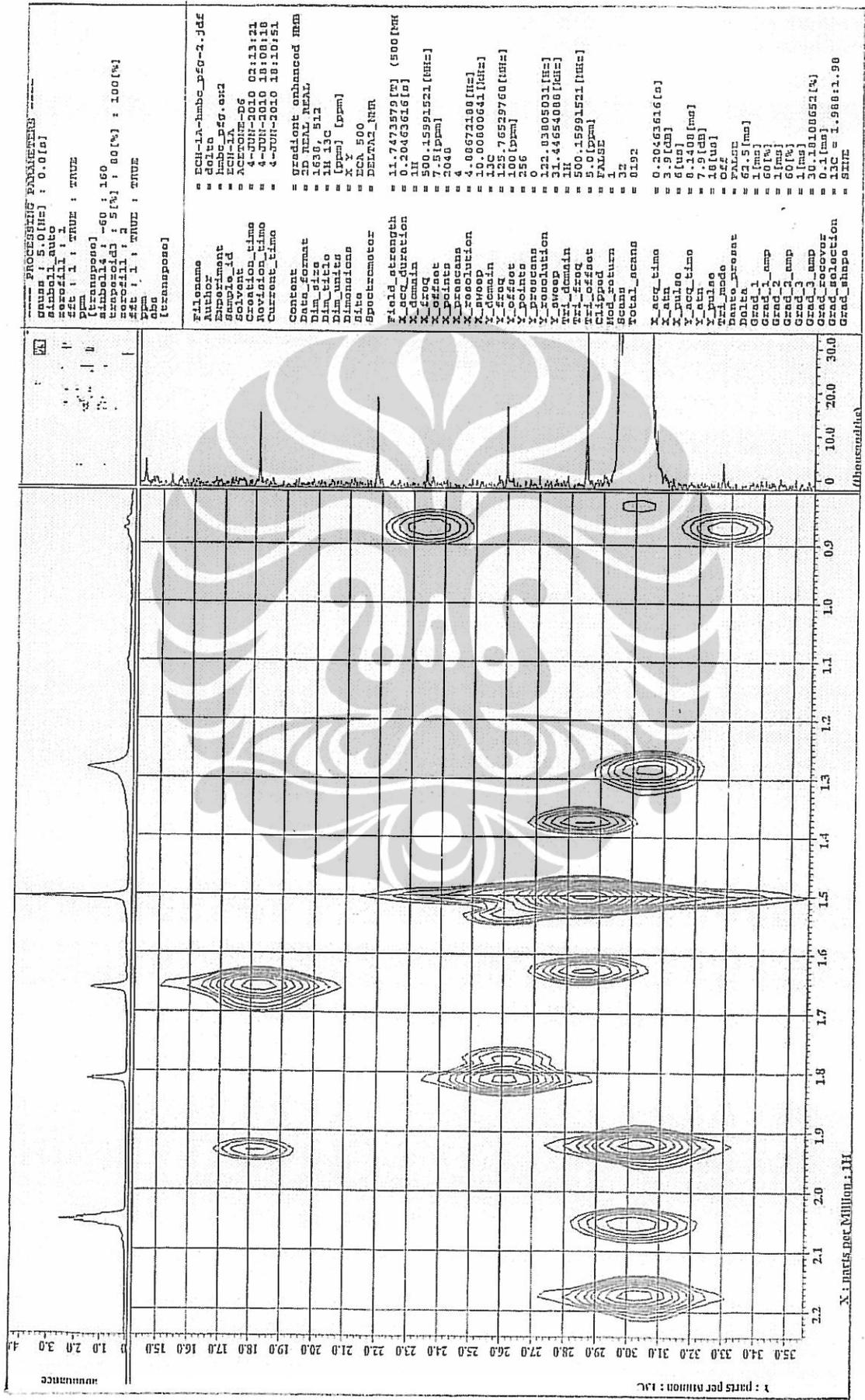
Lampiran 6. Spektrum ¹H-NMR senyawa ECH 1A



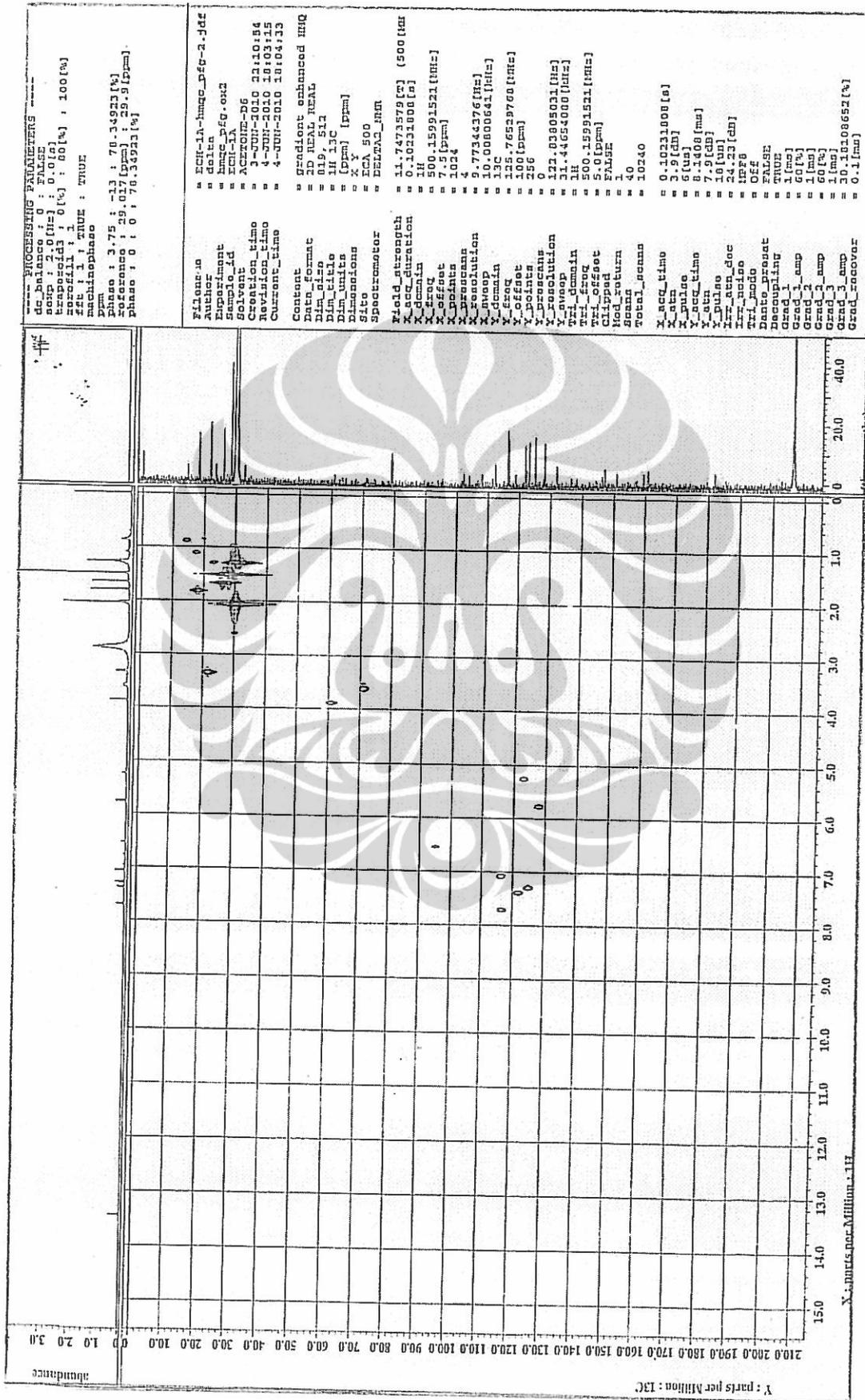
Lampiran 6. Spektrum 1H-NMR senyawa ECH 1A



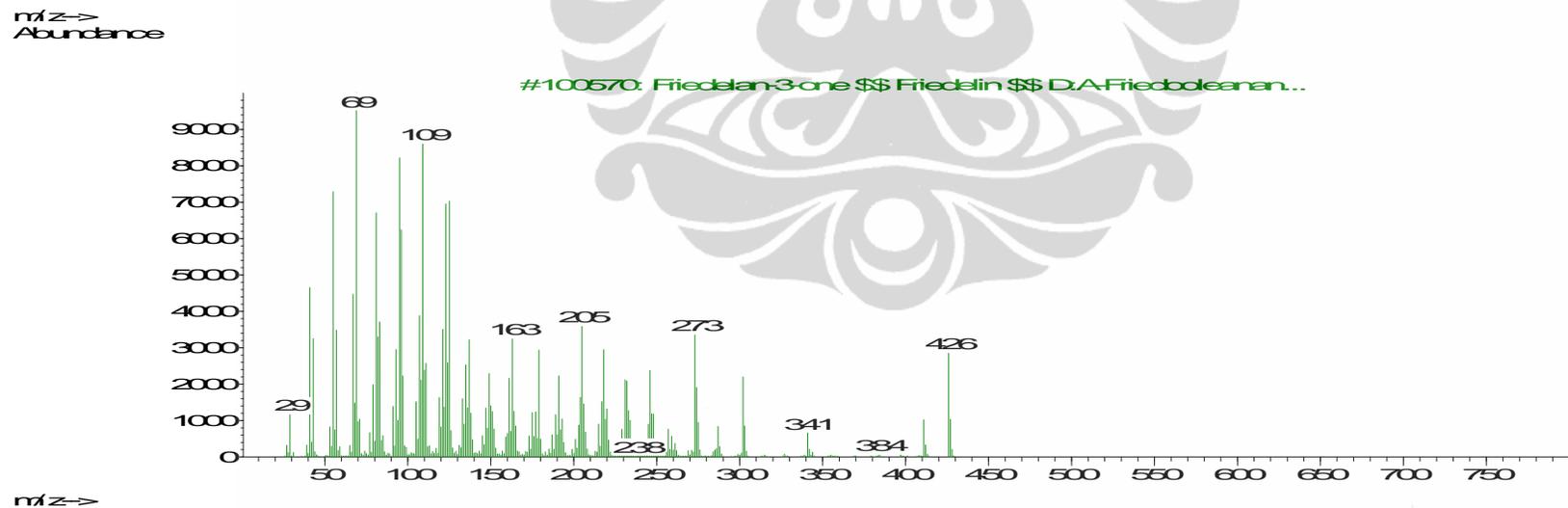
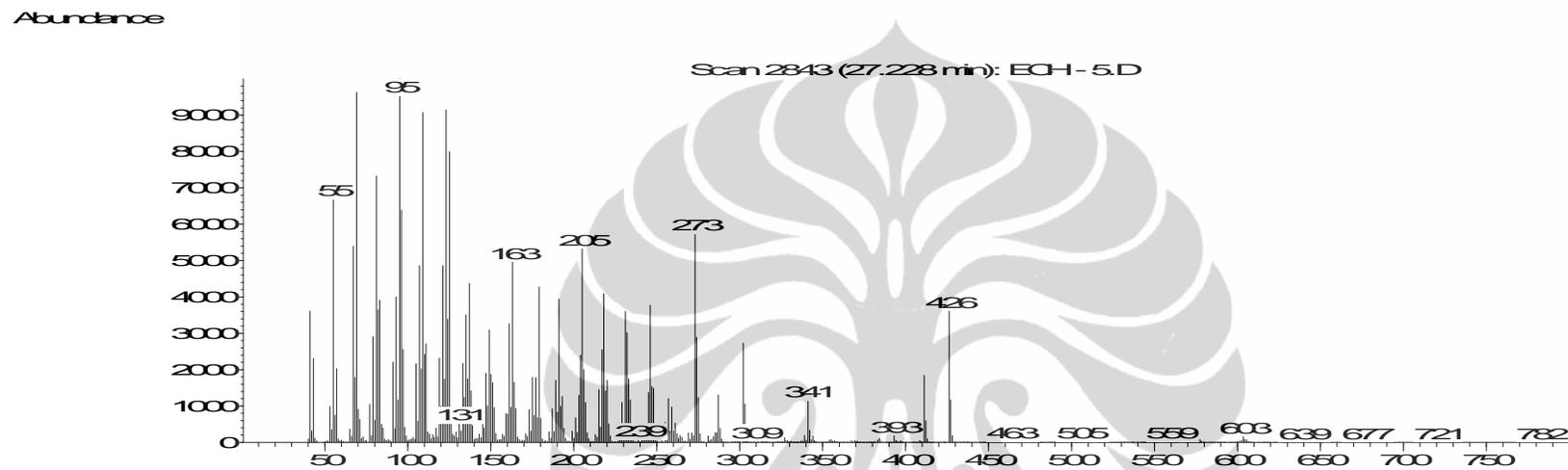
Lampiran 7. Spektrum HMBC senyawa ECH 1A



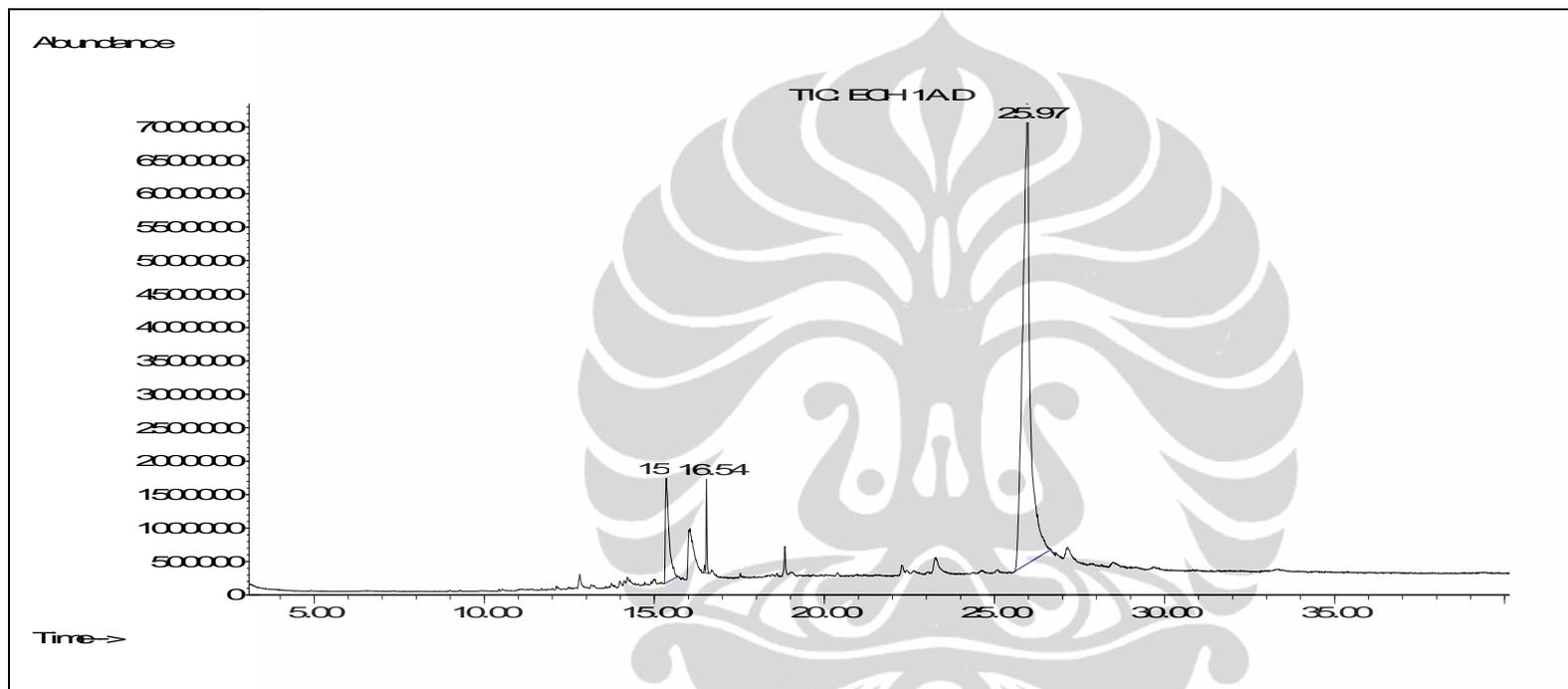
Lampiran 8. Spektrum HMQC dari senyawa ECH 1A



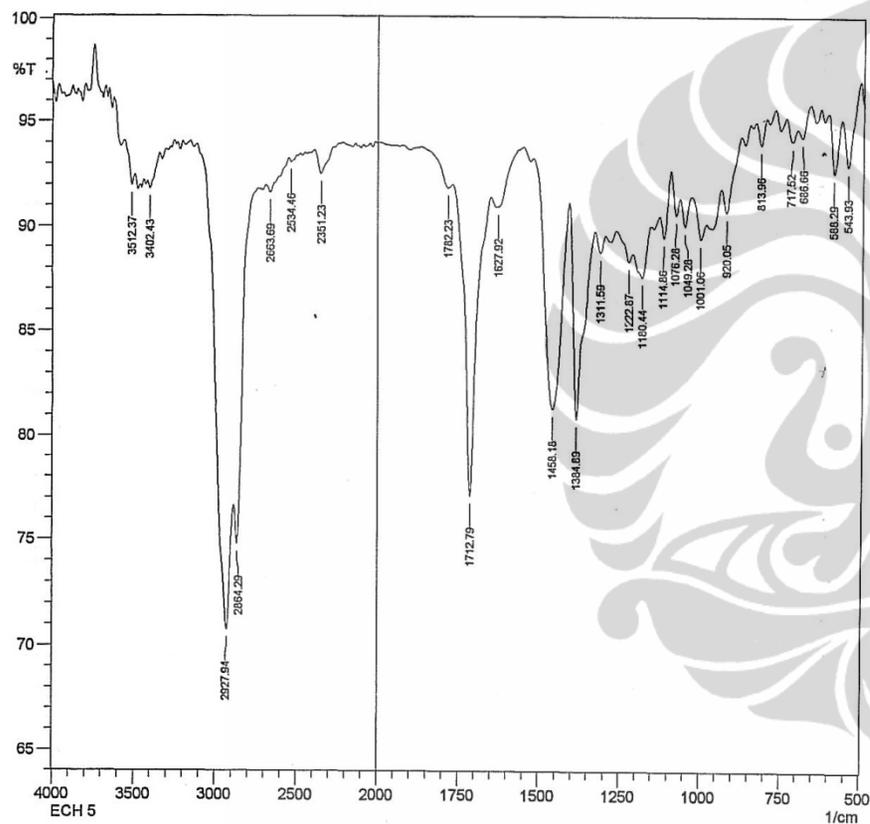
Lampiran 9. Spektrum massa senyawa ECH 5 dan Friedelin.



Lampiran 10. Waktu retensi senyawa ECH1A



Lampiran 11. Spektrum Inframerah senyawa ECH 5

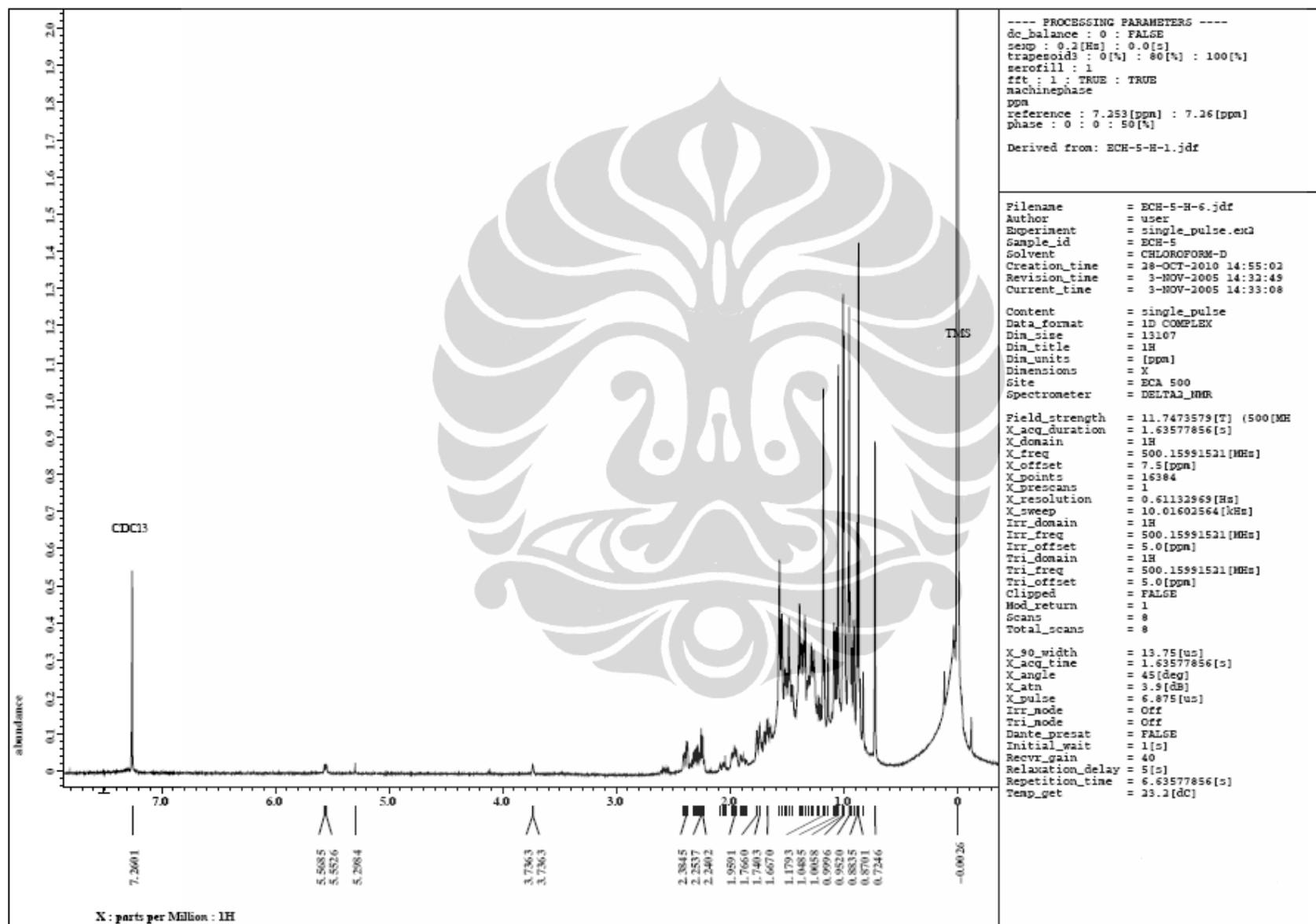


No.	Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Are
1	543.93	92.897	2.918	565.14	507.28	1.356	0.346
2	588.29	92.594	2.712	605.65	565.14	1.1	0.251
3	686.66	94.289	0.839	702.09	661.58	0.919	0.065
4	717.52	94.121	0.81	736.81	702.09	0.852	0.072
5	813.96	93.93	1.173	831.32	798.53	0.803	0.087
6	920.05	90.693	1.837	937.4	875.68	2.148	0.236
7	1001.06	89.421	1.227	1028.06	983.7	1.977	0.11
8	1049.28	90.016	1.366	1064.71	1028.06	1.538	0.105
9	1076.28	90.55	1.33	1093.64	1064.71	1.143	0.097
10	1114.86	89.465	1.888	1128.36	1093.64	1.487	0.163
11	1180.44	87.556	1.653	1209.37	1155.36	2.892	0.259
12	1222.87	88.327	0.626	1261.45	1211.3	2.533	0.053
13	1311.59	88.752	0.924	1327.03	1296.16	1.537	0.077
14	1384.89	80.762	9.972	1406.11	1328.95	5.123	1.747
15	1458.18	81.254	10.861	1517.98	1408.04	6.837	2.95
16	1627.92	90.935	0.142	1631.78	1550.77	2.703	0.022
17	1712.79	77.067	14.651	1768.72	1651.07	7.272	2.844
18	1782.23	91.836	0.374	1865.17	1770.65	3.002	0.036
19	2351.23	92.517	1.172	2391.73	2272.15	3.694	0.32
20	2534.46	93.072	0.236	2549.89	2480.46	2.105	0.038
21	2663.69	91.611	0.483	2688.77	2609.69	2.878	0.078
22	2864.29	74.761	3.855	2883.58	2736.99	9.963	0.565
23	2927.94	54.884	9.125	3113.11	2885.51	19.527	4.006
24	3402.43	91.802	0.59	3415.93	3344.57	2.428	0.12
25	3512.37	91.948	0.951	3558.67	3495.01	2.034	0.103

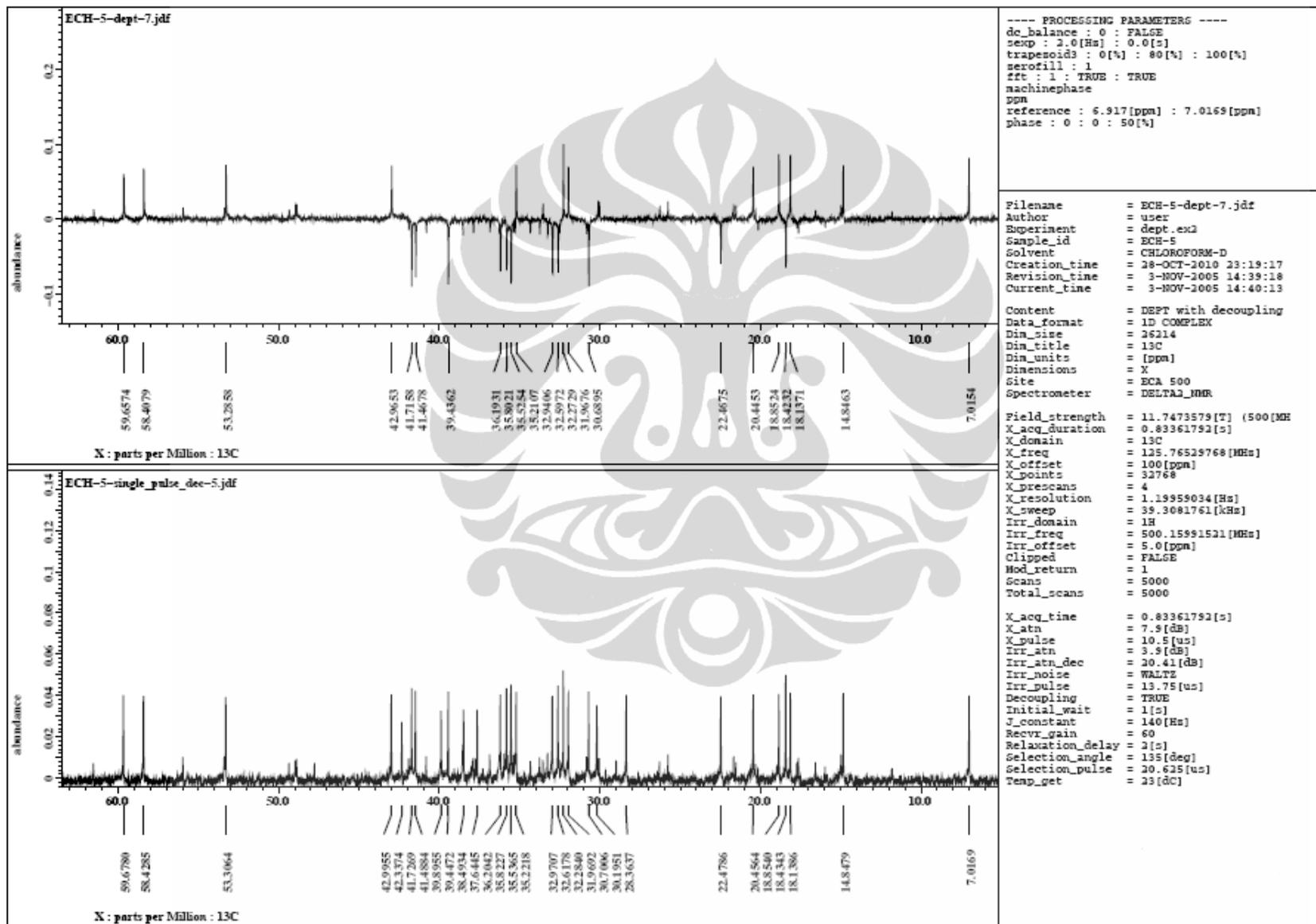
Comment;
ECH 5

Date/Time; 10/28/2010 02:52:26 PM
No. of Scans;
Resolution;
Apodization;
User; master

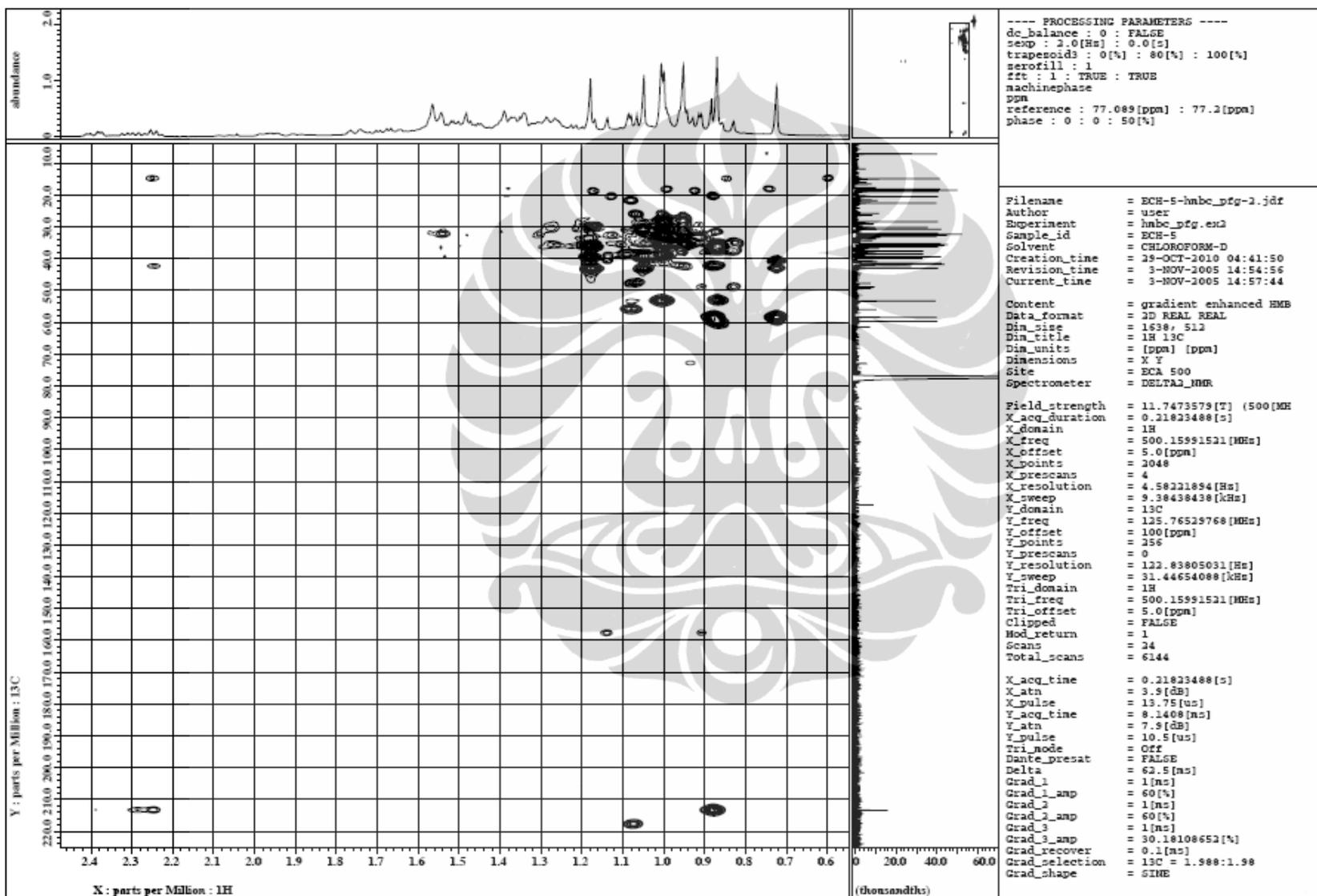
Lampiran 12. Spektrum 1H-NMR senyawa ECH 5



Lampiran 13. Spektrum ¹³C-NMR dan DEPT senyawa ECH 5



Lampiran 14. Spektrum HMBC senyawa ECH 5



Lampiran 16. Spektrum Ultraviolet senyawa ECH5

