

UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN ELUSIDASI SENYAWA KIMIA SERTA UJI
AKTIVITAS BIOLOGI EKSTRAK *n*-HEKSANA KULIT
BATANG *Garcinia eugenifolia* Wall**

TESIS

**I KETUT TRIONO
0806421792**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN
ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
DESEMBER 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI DAN ELUSIDASI SENYAWA KIMIA SERTA UJI
AKTIVITAS BIOLOGI EKSTRAK *n*-HEKSANA KULIT
BATANG *Garcinia eugenifolia* Wall**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains**

**I KETUT TRIONO
0806421792**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA
DEPOK
DESEMBER 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : I Ketut Triono
NPM : 0806421792
Tanda Tangan :
Tanggal : 15 Desember 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :
Nama : I Ketut Triono
NPM : 0806421792
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Judul Tesis : Isolasi dan Elusidasi Senyawa Kimia serta Uji
Aktivitas Biologi Ekstrak *n*-Heksana Kulit Batang
Garcinia eugenifolia Wall

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana (.....)
Pembimbing : Dr. Sri Hartati, M. Si (.....)
Penguji : Prof. Dr. Soleh Kosela, M. Sc (.....)
Penguji : Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS (.....)
Penguji : Dr. Emil Budianto (.....)
Penguji : Dr. Jarnuzi Gunlazuardi (.....)

Ditetapkan di : Depok.
Tanggal : 21 Desember 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Ida Shang Hyang Widhi Wase, Tuhan yang Maha Esa atas segala hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini, sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Studi Magister Ilmu Kimia di Program Pascasarjana FMIPA Universitas Indonesia.

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, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana dan Dr. Sri Hartati, M. Si selaku pembimbing yang telah membimbing dan memberikan arahan serta saran dalam menyelesaikan penelitian ini;
2. Kepala SMA Negeri 96 Jakarta yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan pendidikan S2;
3. Pemda DKI melalui Dinas Pendidikan DKI Jakarta yang telah memberikan biaya dalam mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Indonesia;
4. Drs. Ridla Bakri M. Phil, Ph, D selaku pembimbing akademik yang telah memberikan saran selama mengikuti perkuliahan dan menyelesaikan penelitian ini;
5. Dr. Endang Saefudin dan Dr. Asep Saefumillah, M. Si, selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi beserta seluruh staf pengajar pascasarjana Ilmu Kimia;
6. Bapak Dr. L. Broto S. Kardono, Apt. Apu selaku Pimpinan Puslit Kimia LIPI Serpong yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melakukan penelitian dan menggunakan fasilitas alat di laboratorium Kimia Bahan Alam Puslit LIPI Serpong;
7. Sdr. Lia, Sdr. Megawati, Sdr. Ahmad, Sdr. Sofa yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di Puslit Kimia LIPI Serpong;

8. Seluruh staf karyawan Jurusan Kimia FMIPA UI, serta rekan – rekan mahasiswa pascasarjana yang telah memberi bantuan dan dorongan semangat kepada penulis;
9. Semua pihak yang telah memberikan bantuan selama penelitian dan penyusunan tesis ini;

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan tesis ini, sehingga penulis mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa memberikan balasan atas semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan penulis sangat berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan pada umumnya khususnya pada ilmu kimia.



Penulis

2010

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : I Ketut Triono
NPM : 0806421792
Program Studi : Magister Ilmu Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : FMIPA
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 Kimia serta Uji Aktivitas Biologi Ekstrak *n*-Heksana Kulit Batang *Garcinia eugenifolia* Wall.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan 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 : 15 Desember 2010

Yang menyatakan

(I Ketut Triono)

ABSTRAK

Nama : I Ketut Triono
Program Studi : Kimia
Judul : Isolasi dan Elusidasi Senyawa Kimia serta Uji Aktivitas Biologi Ekstrak *n*-Heksana Kulit Batang *Garcinia eugenifolia* Wall

Garcinia eugenifolia Wall merupakan tumbuhan tropis yang tumbuh di Indonesia, terutama di kawasan Kalimantan dan Kepulauan Riau. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengisolasi senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam kulit batang tanaman *G. eugenifolia* Wall, sampel yang sudah dihaluskan direndam dalam *n*-heksana, setelah residu dipisahkan dari larutannya, selanjutnya residu direndam dengan metanol, kemudian kedua ekstrak diuapkan pelarutnya. Ekstrak *n*-heksana diisolasi lebih lanjut dengan cara kromatografi kolom. Sebagai fasa diam digunakan silika gel, sebagai eluen digunakan *n*-heksana dan etil asetat yang kepolarannya dinaikkan secara gradien. Identifikasi beberapa senyawa dilakukan dengan menggunakan data spektroskopi FT-IR, UV-Vis, LC-MS dan Spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. Hasil isolasi dalam fraksi *n*-heksana ditemukan dua senyawa, yang merupakan triterpen dan turunan xanton yaitu senyawa Geu fh-9 dengan rumus C₂₉H₄₈ O, titik leleh 138-140 °C, BM =412 berbentuk kristal jarum berwarna putih yang identik dengan stigmasterol dan senyawa Geu fh-10 yang berbentuk kristal berwarna kuning dengan rumus molekul C₂₈H₃₂ O₆, titik lelehnya antara 191-192 °C dan BM = 464 yang identik dengan *isobractatin*. Pengujian aktivitas biologinya, menunjukkan senyawa Geu fh-10 kurang aktif sebagai antioksidan dengan IC₅₀ = 86,44 µg/mL dan hasil uji anti kanker dengan menggunakan sel T47D, senyawa Geu fh-10 memiliki IC₅₀ = 17 µg/mL, yang berarti aktif dapat menghambat pertumbuhan sel kanker.

Kata Kunci : *Garcinia eugenifolia* Wall, *Isobractatin*, Antioksidan, Antikanker

xiii + 100 halaman ; 19 gambar; 11 tabel
Daftar Pustaka : 53 (1973-2009)

ABSTRACT

Name : I Ketut Triono
Study Program : Chemistry
Title : Isolation and Elucidation of Chemical Compounds and Test the Biological Activity of *n*-Hexane Extract of Stem Bark of *Garcinia eugenifolia* Wall

Garcinia eugenifolia Wall is a tropical plant that grows in Indonesia, particularly in the areas of Kalimantan and Riau Islands. This research was conducted to isolate the chemical compounds contained in stem bark of *G. eugenifolia* Wall plant, after sample were crushed, soaked in *n*-hexane, after the residue is separated from the solution, then residue soaked with methanol. Bouth extracts soluet were evaporated. The *n*-hexane extract further isolated by column chromatography. Used as stationary phase silica gel, as the eluent used *n*-hexane and ethyl acetate as gradient polarity elevated. Identification of compounds using FT-IR spectral data, UV-Vis, LC-MS and ¹H-NMR spectrometer and ¹³C-NMR. The isolation in *n*-hexane fraction was found two compounds, which is triterpen and derivative of xanton compound are Geu fh-9 with the formula C₂₉H₄₈ O, melting point 138-140 ° C, molecular weight = 412 white needle-shaped crystals are identical with compounds stigmasterol and Geu fh-10 in the form of yellow crystals with the molecular formula C₂₈H₃₂ O₆, melting point between 191-192 °C and molecular weight = 464 which is identical with *isobractatin*. Tests for biological activity, indicates a compound Geu fh-10 is less active as an antioxidant with IC₅₀ = 86.44 µg / mL and anti-cancer test results using T47D cells, compound Geu fh-10 showed IC₅₀ = 17 µg / mL, which means that current can inhibit cancer cell growth.

Key words : *Garcinia eugenifolia* Wall, *Isobractatin*, Anti Oxidant, Anti-cancer
xiii +100 pages ; 19 pictures; 11 tables
Bibliography : 53 (1973-2009)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Hipotesis Penelitian.....	2
1.4 Tujuan Penelitian	2
1.5 Manfaat Penelitian	2
2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Klasifikasi <i>Garcinia</i>	3
2.2 Asal dan Penyebaran Tanaman <i>Garcinia</i>	3
2.3 Morfologi Tanaman.....	4
2.4 Khasiat dan Kegunaan Tanaman <i>Garcinia</i>	4
2.5 Kandungan Kimia beberapa <i>Spesies Garcinia</i>	5
2.6 Aktivitas Biologi Senyawa Kimia.....	18
2.6.1 Toksisitas terhadap <i>Brine Shrimp</i>	18
2.6.2 Antioksidan.....	19
2.6.3 Kanker Payudara.....	26
2.7 Beberapa Spektrum untuk Elusidasi Senyawa Murni.....	28
2.7.1 Spektrometri Massa.....	28
2.7.2 Spektrofotometri Ultraviolet-cahaya tampak.....	29
2.7.3 Spektrofotometri Inframerah	30
2.7.4 Spektrometri Magnetik Inti.....	31
3. METODE PENELITIAN	35
3.1 Pengumpulan dan Pengidentifikasian Sampel.....	35
3.2 Rancangan Penelitian.....	35

3.3	Elusidasi Senyawa Murni.....	38
3.4	Uji Aktivitas Biologi.....	39
3.4.1	Uji Toksisitas terhadap <i>Brine Shrimp</i>	39
3.4.2	Uji Aktivitas Antioksidan	40
3.4.3	Uji Antikanker <i>in-vitro</i> sel Breast cancer (T47D)....	41
3.5	Tempat dan Waktu Penelitian.....	42
3.6	Bahan Penelitian	42
3.7	Peralatan Penelitian.....	43
3.8	Peralatan Spektroskopi	43
3.9	Bagan Pelaksanaan Penelitian.....	44
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.		
4.1	Hasil Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Ekstrak <i>n</i> -Heksana <i>G. eugenifolia</i> Wall.....	45
4.2	Penentuan Struktur Molekul.....	46
4.2.1	Penentuan Struktur Molekul Senyawa Geu fh-9.....	46
4.2.2	Penentuan Struktur Molekul Senyawa Geu fh-10.....	51
4.3	Hasil Uji Aktivitas Biologi.....	69
4.3.1	Uji <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	69
4.3.2	Uji Aktivitas Antioksidan.....	70
4.3.3	Hasil Uji Antikanker <i>in-vitro</i> dengan sel T47D.....	77
5. KESIMPULAN DAN SARAN		79

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Herbarium daun <i>Garcinia eugenifolia</i> Wall	4
Gambar 2.2 Mekanisme reaksi <i>Radical Scavenger</i>	21
Gambar 2.3 Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan	22
Gambar 2.4 Keseimbangan oksidasi-reduksi antara Kinol dan Kinon....	23
Gambar 2.5 Struktur Antioksidan tipe Fenol.....	23
Gambar 2.6 Mekanisme reaksi Antioksidan tipe Fenolik.....	24
Gambar 2.7 Skema spektroskopi ultraviolet-cahaya tampak.....	30
Gambar 2.8 Skema spektroskopi inframerah.....	32
Gambar 3.1 Bagan pelaksanaan penelitian.....	44
Gambar 4.1 Hasil Kromatogram LC Senyawa Geu fh -10	52
Gambar 4.2 Kromatogram MS Senyawa Geu fh-10	52
Gambar 4.3 Kurva hasil uji BSLT ekstrak <i>n</i> -heksana dan kristal Geu fh-10	70
Gambar 4.4 Kurva persen inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak <i>n</i> -heksana.	72
Gambar 4.5 Kurva hasil analisis aktivitas antioksidan ekstrak metanol dengan metode <i>Radical Scavenger</i>	73
Gambar 4.6 Kurva persen inhibisi dan konsentrasi uji antioksidan senyawa Geu fh- 10.....	74
Gambar 4.7 Kurva hasil analisis aktivitas antioksidan dengan metode <i>Radical Scavenger</i>	75
Gambar 4.8 IC_{50} sampel uji antioksidan.....	76
Gambar 4.9 Reaksi reduksi DPPH	76
Gambar 4. 10 Kurva hasil uji anti kanker T47D dari kristal Geu fh- 10 ...	78

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Hasil Identifikasi Sampel Tanaman	84
Lampiran 2. Spektrum UV-Vis Senyawa Geu fh- 9.....	85
Lampiran 3. Spektrum IR Senyawa Geu fh- 9.....	86
Lampiran 4. Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Geu fh- 9.....	87
Lampiran 5. Spektrum ¹³ C-NMR DEPT 135 Senyawa Geu fh- 9	88
Lampiran 6. Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Geu fh- 9.....	89
Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Senyawa Geu fh- 10.....	90
Lampiran 8. Spektrum IR Senyawa Geu fh- 10.....	91
Lampiran 9. Kromatogram LC- MS Senyawa Geu fh -10.....	92
Lampiran 10. Spektrum ¹ H-NMR Senyawa Geu fh- 10.....	93
Lampiran 11. Spektrum ¹³ C-NMR Senyawa Geu fh -10.....	94
Lampiran 12. Spektrum ¹³ C-NMR DEPT 135 Senyawa Geu fh- 10.....	95
Lampiran 13. Spektrum HMQC Senyawa Geu fh- 10.....	96
Lampiran 14. Spektrum HMBC Senyawa Geu fh- 10.....	97
Lampiran 15. Data Analisa Hasil Uji Antioksidan ekstrak dan isolat murni.	98
Lampiran 16. Analisa Hasil <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	99
Lampiran 17. Hasil Analisis Uji Antikanker <i>in-vitro</i> dengan sel T47D.....	100

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 4.1 Hasil kromatografi kolom vakum.....	45
Tabel 4.2 Perbandingan dari pergeseran kimia (δ ^{13}C -NMR) Senyawa Geu fh- 9 dengan stigmasterol.....	50
Tabel 4.3 Pergeseran kimia H (δ_{H} , ppm) ^1H - NMR senyawa Geu fh-10.....	54
Tabel 4.4 Pergeseran kimia karbon (δ_{C} , ppm) ^{13}C - NMR senyawa Geu fh-10...	56
Tabel 4.5 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_{C} , ppm) ^{13}C - NMR , HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10.....	57
Tabel 4.6 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_{C} , ppm) ^{13}C - NMR , HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10 A.....	60
Tabel 4.7 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_{C} , ppm) ^{13}C - NMR , HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10 B.	62
Tabel 4.8 Perbandingan pergeseran kimia karbon (δ_{C} , ppm) senyawa Geu fh-10 dengan <i>Isobractatin</i>	68
Tabel 4.9 Analisa hasil <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	69
Tabel 4.10 Data analisa hasil uji antioksidan ekstrak dan isolat murni.....	71
Tabel 4.11 Hasil analisis uji anti kanker <i>in-vitro</i> dengan sel T47D.....	77

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Akhir-akhir ini semakin banyak masyarakat Indonesia menggunakan obat tradisional untuk menyembuhkan penyakit, karena selain lebih murah juga memiliki efek samping yang lebih aman bila dibandingkan dengan obat modern. Kecendrungan masyarakat saat ini mulai kembali ke pengobatan dengan bahan alam, seiring dengan naiknya harga obat-obatan dan semakin banyaknya obat-obatan palsu. Penggunaan tanaman obat pada awalnya didasarkan pada pengalaman empiris nenek moyang kita, sehingga perlu dilakukan penelitian ilmiah untuk membuktikan khasiatnya.

Indonesia adalah negara yang memiliki sumber daya alam bahan obat, tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal oleh bangsa Indonesia, dengan beragamnya flora Indonesia yang tersebar di seluruh wilayah Nusantara, merupakan peluang yang sangat baik untuk ditemukan dan dikembangkannya bahan alam yang dapat digunakan sebagai obat pada pengobatan modern. Obat-obat ini semestinya menunjukkan peran farmakologi yang jelas dan tidak menunjukkan efek negatif, baik pemakaian sementara maupun dalam waktu yang lama, secara medis dapat dipertanggung jawabkan.

Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai bahan obat alternatif adalah tanaman *Garcinia* (Guttiferae). *Garcinia eugenifolia* Wall merupakan tumbuhan tropis yang tumbuh di Indonesia, terutama di kawasan Kalimantan dan Kepulauan Riau. Di Indonesia tanaman ini dikenal sebagai tanaman sejenis manggis. Tanaman ini tersebar di daerah sub tropis seperti Jepang, Korea, dataran Cina, untuk daerah tropis yang lembab adalah Indonesia, semenanjung Malaysia dan Thailan (Burkill, 1935).

Sebagian besar bagian dari tumbuhan *Garcinia* dapat dimanfaatkan. Buah dari spesies tumbuhan ini dapat dimakan seperti buah manggis (*G. mangostana*), munda (*G. dulcis*), dan asam kandis (*G. parvifolia*). Dari beberapa penelitian yang

dilakukan terhadap tanaman *Garcinia* menunjukkan bahwa secara umum kandungan kimia dari tumbuhan familia *Garcinia* adalah adanya senyawa xanton dan turunannya. Beberapa senyawa xanton dilaporkan memiliki aktivitas biologi antara lain : sitotoksik dan mempunyai efek antioksidan sebagai contoh adalah xanton terprenilasi dari *G. gaudichaudii* bersifat sitotoksik terhadap beberapa jaringan sel kanker (Cao, 1998) sedangkan mangostin dari *G. Mangostana* (Yoshikanwa, 1996) dan empat xanton dari *G. subeliptica* (Minami, H.,1994) mempunyai efek antioksidan.

1.2 Rumusan Masalah

Kulit batang *Garcinia eugenifolia* Wall pada ekstrak *n*-heksana mengandung senyawa kimia dan diduga mempunyai aktivitas biologi.

1.3 Hipotesis Penelitian

Garcinia eugenifolia Wall diduga mengandung senyawa-senyawa yang dapat ditentukan struktur molekulnya dan memiliki aktivitas biologi.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan, bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam kulit batang *G. eugenifolia* Wall dalam ekstrak *n*-heksana serta menguji aktivitas biologinya, diantaranya uji toksisitas, antioksidan, dan antikanker. Elusidasi senyawa dengan menggunakan spektrum UV-Vis, FT-IR, LC-MS dan spektrum ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, satu dan dua dimensi.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi kandungan kimia *G. eugenifolia* Wall, serta menambah khasanah Ilmu Pengetahuan khususnya Kimia Bahan Alam.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi *Garcinia*

Garcinia termasuk dalam famili *Guttiferae* di Indonesia dikenal sebagai tanaman sejenis manggis. Sebagian besar bagian tanaman *Garcinia* dapat dimanfaatkan, Tumbuhan *Garcinia eugenifolia* Wall termasuk familia *Guttiferae*, dari hasil klasifikasi menurut (Keng, 1978 dan Whitmore, 1973) tumbuhan tersebut :

Devisio : *Spermatophyta*
Sub divisio : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledone*
Ordo : *Guttiferales*
Familia : *Guttiferae*
Sub Famili : *Clusiaceae*
Genus : *Garcinia*
Species : *Garcinia eugenifolia* Wall

Tanaman *G. eugenifolia* Wall diambil dari desa Kalampangan, Kecamatan Sebangau, Kabupaten Palangka Raya, Kalimantan Tengah, nama daerah dikenal dengan nama manggis putih atau manggis hutan.

2.2 Asal dan Penyebaran Tanaman *Garcinia*

Tanaman *Garcinia* dapat tumbuh pada daerah 10⁰ ke utara dan ke selatan dari equator, jenis ini banyak tumbuh di daerah tropis, banyak terdapat dikawasan Asia Tenggara misalnya di Indonesia, Malaysia, Thailand, Kamboja, Philipina, Burma dan Vietnam serta beberapa terdapat di negara Srilangka, India bagian selatan, Brasil dan Amerika Tengah.

Tanaman *Garcinia* tumbuh pada daerah ketinggian 1000 meter di atas permukaan laut, tetapi pertumbuhannya akan lebih cepat pada dataran yang lebih rendah. Pertumbuhan tanaman ini juga dipengaruhi oleh faktor suhu, dimana pada suhu dibawah 20⁰C pertumbuhannya lambat. Mempunyai pertumbuhan yang lebih cepat pada suhu 38-40⁰ C (Ahmad, 1983).

2.3 Morfologi Tanaman

Tanaman *Garcinia* merupakan suatu pohon kecil atau sedang yang dapat mencapai tinggi 15 meter. Tanaman ini mempunyai batang yang berkayu berbentuk bulat, tegak, percabangan simpodial dan berwarna coklat halus, getahnya berwarna kuning. Bentuk daun tanaman ini tunggal, lonjong, ujung runcing, pangkal tumpul, tetapi rata, pertulangan menyirip serta mempunyai panjang 5-7 cm, lebar 3-5 cm, tebal, tangkai berbentuk silindris dan berwarna hijau. Bunga tanaman ini mempunyai ciri-ciri seperti tunggal, berkelamin 2 (dua), terletak di ketiak daun, tangkai silindris 1-2 cm, benang sari berwarna kuning, putik satu berwarna putih dan kuning. Akar tanaman ini merupakan akar tunggang berwarna putih kecoklatan (Tjitrosoepomo, 1996).



Gambar 2.1 Herbarium daun *Garcinia eugenifolia* Wall

2.4 Khasiat dan Kegunaan Tanaman *Garcinia*

Tanaman *Garcinia* telah dikenal mempunyai beberapa khasiat untuk pengobatan. Hal ini karena hampir semua bagian tumbuhannya mengandung zat kimia. Khasiat tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L) yang sudah dikenal untuk pengobatan antara lain:

Akarnya untuk pengobatan disentri dan haid yang tidak teratur. Buahnya dapat digunakan untuk obat diare, radang, amandel, ambient dan keputihan. Dinding buahnya untuk menguatkan gigi, membersihkan plak gigi dan obat diare. Kulit buahnya untuk obat sariawan, radang usus, keputihan, radang tenggorokan dan amandel. Kulit batangnya untuk obat sakit perut (Medical Herb, 1986).

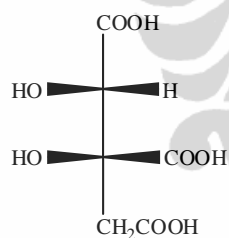
2.5 Kandungan Kimia Beberapa Spesies *Garcinia*

Familia *Guttiferae* merupakan tanaman yang kaya akan xanton, terutama genus *Garcinia*. Genus *Garcinia* memiliki sekitar 400 spesies, hampir setengahnya mengandung senyawa aromatik, sebagian besar mengandung xanton. Beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas biologi dan farmakologis.

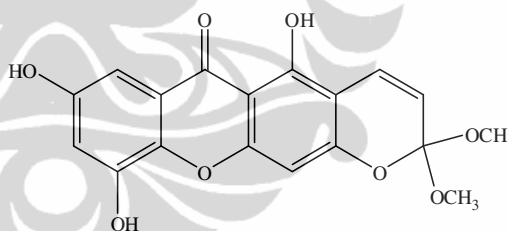
Beberapa spesies *Garcinia* yang telah diteliti kandungan kimia dan bioaktivitasnya antara lain adalah:

2.5.1 *Garcinia atroviridis* Griff

Buckingham, et al., (1992) telah mengisolasi Asam garcinia (1). Menurut Kosin, et al., (1992) rebusan daun dan akar tumbuhan ini dipergunakan sebagai obat sakit telinga, dengan cara meneteskan air rebusan tersebut. Dari hasil penelitiannya telah ditemukan xanton baru yang diisolasi dari kulit batang *G. atroviridis*, yaitu Atroviridin-1 (2)



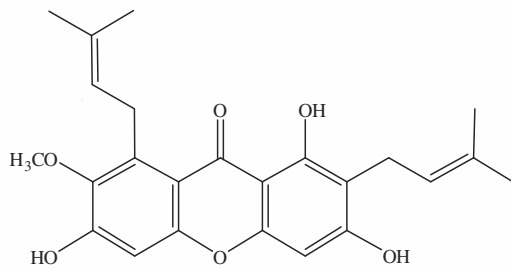
(1) Asam garcinia



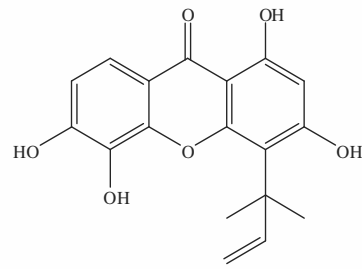
(2) Atroviridin-1

2.5.2 *Garcinia assigu*

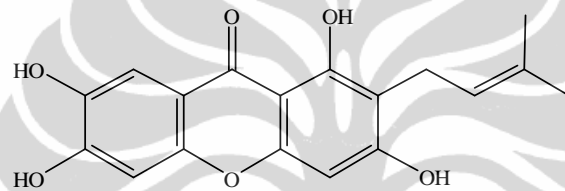
Ito, et al., (1977) melaporkan telah mengisolasi dan mengelucidasi struktur kimia dari kulit batang *G. assigu*, yaitu suatu senyawa depsidon baru yang dinamai Garcinidon (3) dan dua xanton baru yang diberi nama Assiguxanton-A (4), Assiguxanton-B (5)



(3) Garcinidone



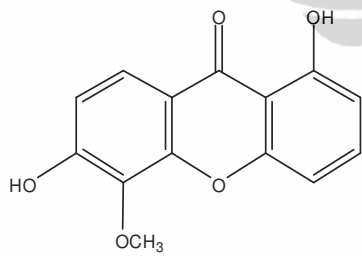
(4) Assiguxanton-A



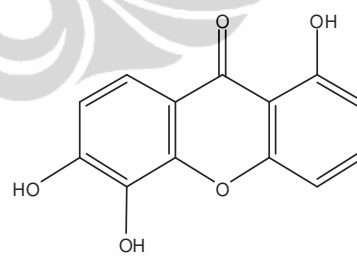
(5) Assiguxanton-B

2.5.3 *Garcinia buchananii*

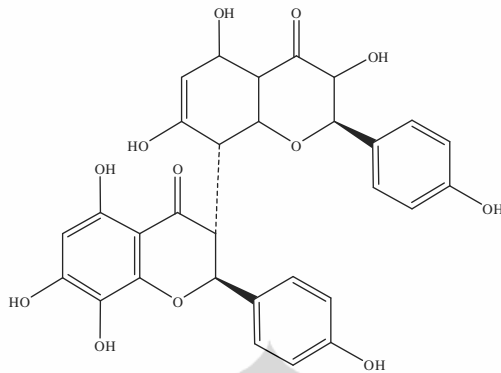
Iwu, (1990) telah melaporkan bahwa dalam *G. buchananii* mengandung Buchanaxanton (6), Mexuxanton (1,5,6- trihidroksixanton) (7) GB-1, GB-2, Gb-1a (8)



(6) Buchanaxanton



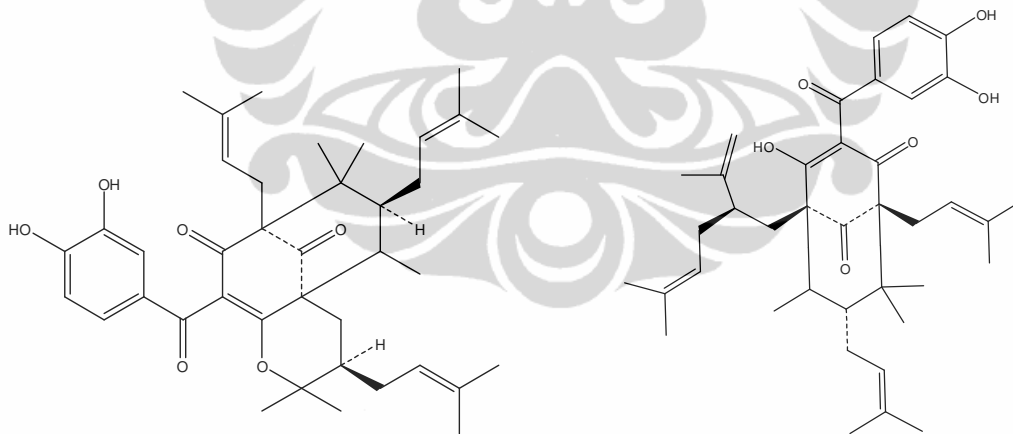
(7) Mexuxanton



(8) Konfigurasi absolut 3'',4'',4'',5,5'',7,7'', heptahidroksi 3,8''biflavanon

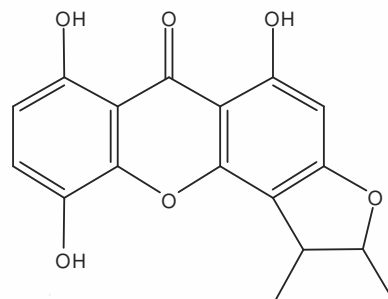
2.5.4 *Garcinia cambogia*

Buckingham pada tahun 1992, menemukan bahwa getah dari *G. cambogia* mengandung Camboginol, Asam garcinia (1), Isoxantochymol bentuk (-) (9) Garcinol (10). Inuma, et al., 1998, telah melakukan penelitian terhadap ekstrak akar *G. cambogia* dan telah menemukan xanton baru yang diberi nama Garbogiol (11) dan dari batangnya juga telah ditemukan Garcinol dan Isogarcinol.



(9) Iso xantochymol

(10) Garcinol

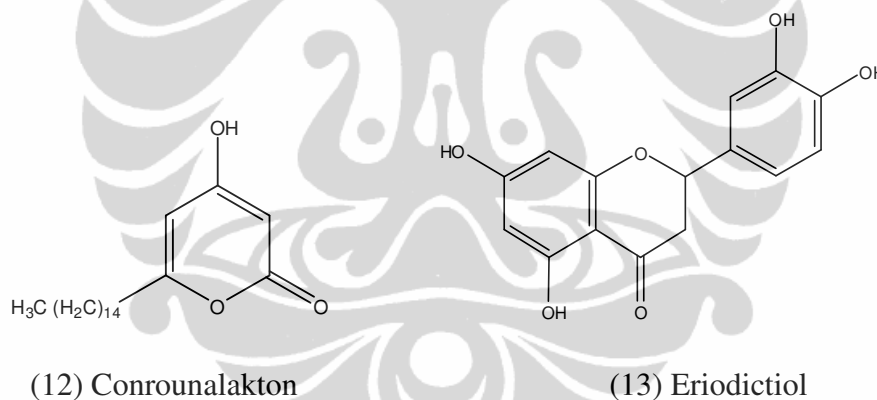


(11) Garbogiol

Renato, L., 1997 telah melakukan penelitian terhadap *G. cambogia* sebagai bahan campuran untuk pengobatan anti obesitas (kegemukan) yang mempunyai efek *lypocholestemic*. Oliver tahun 1996 telah membuat paten dari ramuan ekstrak *G. cambogia* dengan chitosan untuk diet pengurangan lemak dan hasilnya dapat menurunkan *cholesterol* sampai 10,7%, LDL *cholesterol* 15,2%, trigliserida 13,2% dan HDL *cholesterol* 6,3%.

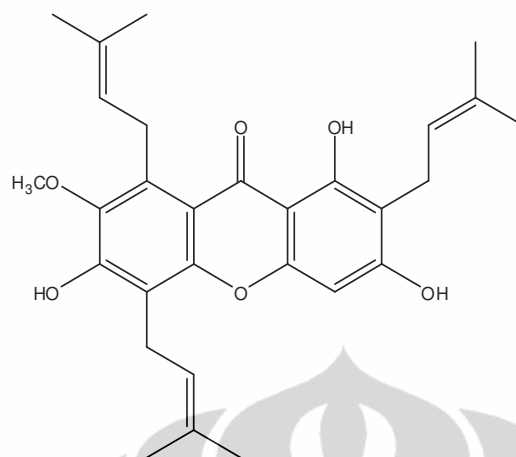
2.5.5 *Garcinia conrouna*

Waterman, et al., 1980 telah melaporkan bahwa dalam kulit batang dan kulit biji *G. conrouna* mengandung Conrounalakton (12). Waterman dan Elisabeth tahun 1980 telah mengisolasi senyawa Eriodictiol (13) dan 5,7 Dihidroksi kromenon dari kulit kayu *G. conrouna*.



2.5.6 *Garcinia cowa* Roxb

Dari ekstrak etanol kulit batang *G.cowa* ditemukan dua xanton baru yaitu 1,5,6-trihidroksi-3-metoksi-4-(3-hidroksi-3-metilbutil) xanton dan 1,5-dihidroksi-3-metoksi-6'-6' dimetil-2H-pyrano (2,3,6,7)-4-(metilbut-2-enil) xanton bersama enam xanton yang telah diketahui diantaranya adalah dulxanton A (Jie-Shen, et al., 2006) *G. cowa* oleh masyarakat Thailand dikenal sebagai obat tradisional yang memiliki sifat antipiretik, Kitisak, et al., 1997 telah menemukan senyawa xanton baru dari akstrak *G. cowa* yaitu 7-O Metil garcinon- E (14) dan sebelumnya telah ditemukan senyawa xanton lain yaitu diberi nama Cowain, Cowanol, Norcowanin; Cowaxanton; dan 1,3,6 trihidroksi-7-metil-2,5-bis (prenil) xanton,



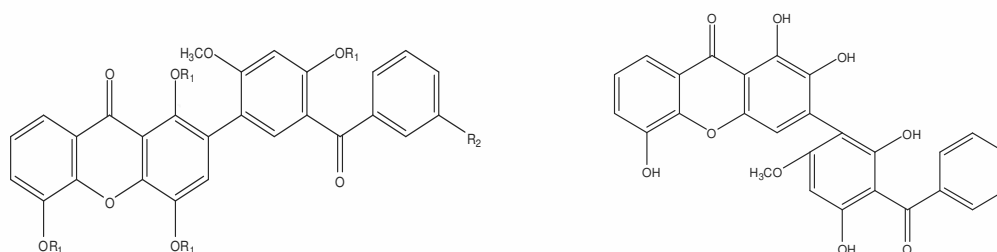
(14) 7-O-metil garcinon-E

2.5.7 *Garcinia dioica*

Inuma, 1996 telah mengisolasi Rubaxanton dari *G. dioica* yang strukturnya identik dengan α -Mangostin memiliki aktivitas yang tinggi terhadap *Strain Staphylococcus* (MIC = 0,31-1,25 $\mu\text{g/mL}$) dimana aktivitasnya lebih besar dari aktivitas antibiotik *vancomycin* (3,13-6,25 $\mu\text{g/mL}$).

2.5.8 *Garcinia dulcis* Kurz (Roxb)

Buckingham, 1992 telah melaporkan bahwa dalam *G. dulcis* mengandung 2,3-dihidro-5,5,7,7-tetrahidroksi-2-(4-hidroksiphenil)-3-8-bi-4H-1-benzopyran-4,4-dione. Inuma, et al., 1996 telah menemukan benzophenon xanton dimer dari akar *G. dulcis* yang diberi nama Garciduol A (15), B (16), C(17). Selain itu juga ditemukan senyawa lain yaitu 1,3,6-trihidroksi-7-metoksi xanton; 2,5-dihidroksi-1-metoksi xanton; 1,4,5-trihidroksi-xanton dan 1,3,6-trihidroksi xanton. Dari ekstrak *n*-heksana akar *G. dulcis* Inuma, 1996 juga telah menemukan xanton yang diberi nama Dulciol B, Dulciol D, Garinoxanton A dan Garinoxanton B, dari ekstrak aseton ditemukan Dulcis A, Dulcis E, Globuxanton, Subeliptenon C,

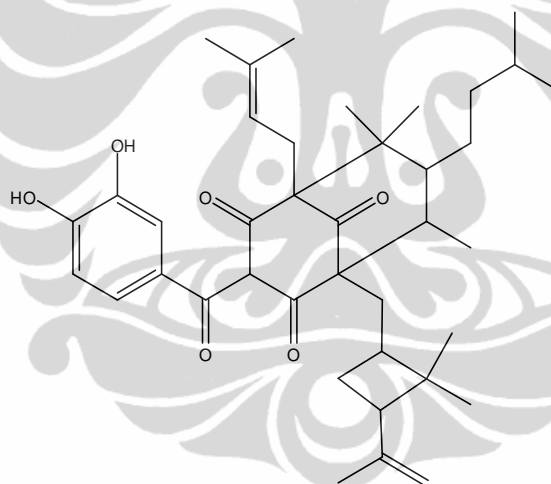
(15) Garcidul-A $R_1 = H, R_2 = H$

(17) Garcidul- C

(16) Garcidul-B $R_1 = H, R_2 = OH$

2.5.9 *Garcinia eugeniaefolia* Wall

Hartati, 2007 menyatakan dari kulit batang *G. eugeniaefolia* Wall telah ditemukan eugeniaefenon (18)



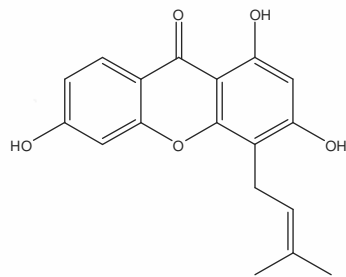
(18) Eugeniaefenon

2.5.10 *Garcinia indica*

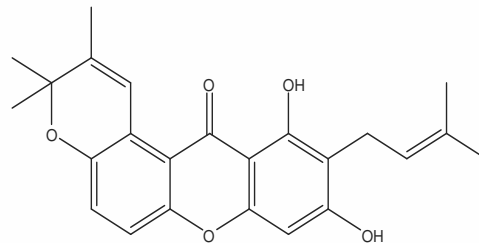
Suhu, et al., 1989 telah melaporkan bahwa dalam *G. indica* mengandung Asam garcinia (1) dan Garcinol (10) Garcinol juga mampu menghambat aktivitas xantin oksidase secara kompetitif dengan $IC_{50} = 52 \mu M$ (Chiung-Ho, et al., 2005)

2.5.11 *Garcinia mangostana* Linn

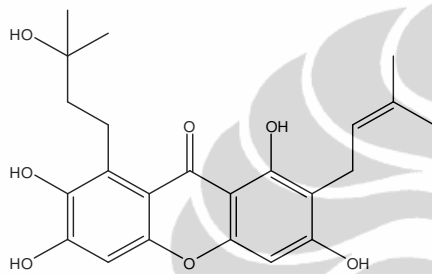
Ashis, et al., 1982 telah mengekstraksi xanton baru dari ekstrak kloroform kulit buah *G. mangostana*, yaitu Garcinon A, B, C. (19, 20, 21) Balasubranian dan Rajagopalan, 1988 mengatakan bahwa kulit buah *G. mangostana* dipergunakan sebagai obat tradisional, sangat luas dipergunakan sebagai anti inflamasi dan obat diare. Mereka telah mengisolasi xanton baru BR-xanton-A (22) dan BR-xanton-B (1-metoksi-2,4,5-trihidroksi xanton). Parven dan Khan tahun 1988 juga telah mengisolasi xanton baru dari ekstrak daun *G mangostana*, yaitu : 1,5,8-trihidroksi-3-metoksi-2-(3 metil-butenil) xanton dan xanton lain, yaitu Gartanin (23). Praven, et al., Tahun 1991 telah menemukan triterpen-triterpen baru dalam *G. Mangostana*, yaitu 4- β -hidroksi-26-nor-9, 19 siklolanos-23-en-25-on (24). Buckingham tahun 1992 mengatakan bahwa *G. Mangostana* mengandung Br-xanton-A; Br-xanton-B-(1-metoksi-2,4,5-trihidroksi xanton); 8-dihidroksi-3-metoksi-2-fenilxanton; 1,7-dihidroksi-3-metoksi-2-fenilxanton, Garinon A-E (19,20,21,26,27); Gartanin; 3-hidroksi-27-nor-23-siklo25-on (dalam bentuk 3- β -23); Macklurin (28); α , β mangostin (29, 30); 1,5,8-trihidroksi-3-metil renlxanton. Moeryati S., tahun 1998 dalam bukunya menyatakan bahwa kulit buah *G. Mangostana* sebagai obat amandel, keputihan, nyeri tenggorokan, radang usus, dan obat kumur (sariawan). Subagio, et al., telah melakukan perbandingan efek ekstrak kulit buah manggis dengan diazepam terhadap susunan saraf pusat tikus putih. Hasil penelitian tersebut ternyata 100 mg ekstrak/kg bb dapat meningkatkan pentobarbital sleeping time 1,12 kali lebih besar daripada diazepam dengan takaran 0,2 mg/kg bb. Dalam *G. mangostana* ditemukan 12 senyawa xanthone lama dan dua senyawa xanton terprenilasi baru salah satunya yaitu 8-hydroxycudraxanthone G yang dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode peroxynitrite –scavenging dengan nilai $IC_{50}=4.6 \mu M$ (Hyun, 2006).



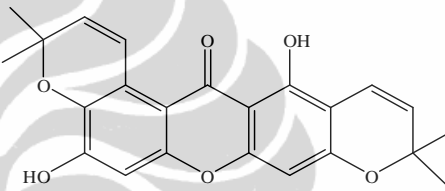
(19) Garcinon- A



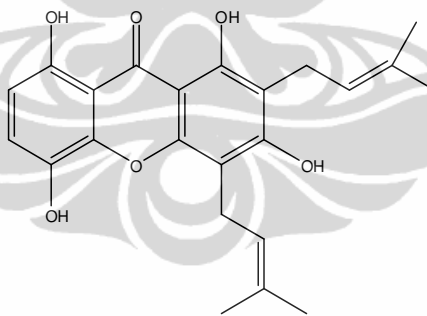
(20) Garcinon- B



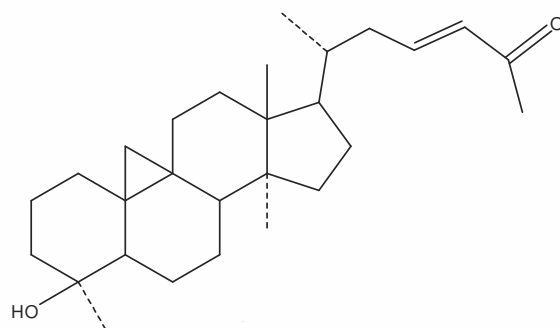
(21) Garcinon-C

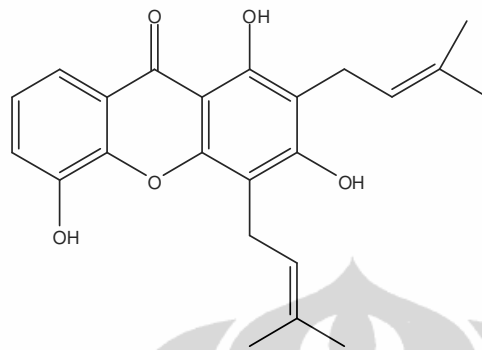


(22) BR-Xanton -A

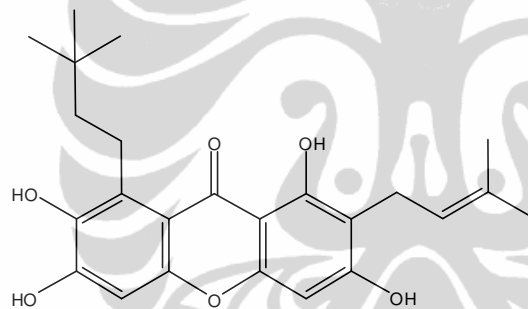


(23) Gartanin

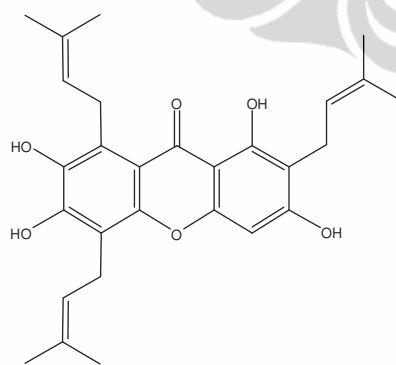
(24) 4- β hidroksi -16 nor-9, 19 siklolanos-23 en-25 on



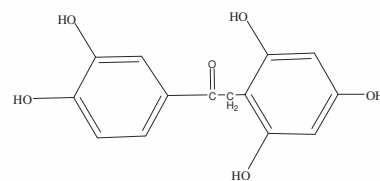
(25) 8-deoksigartinin



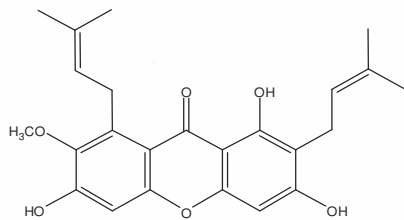
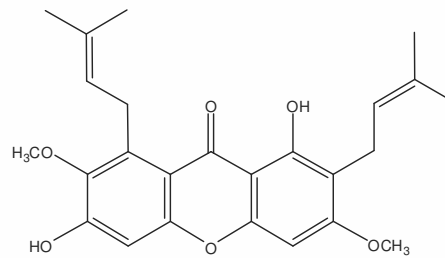
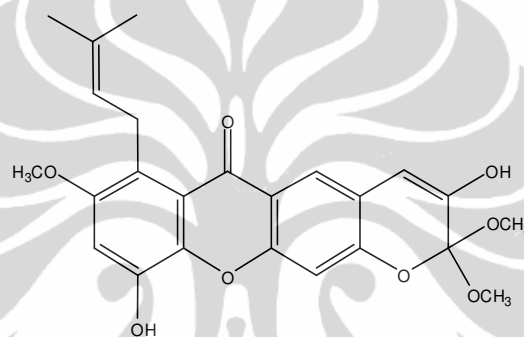
(26) Garcinon -D



(27) Garcinon- E



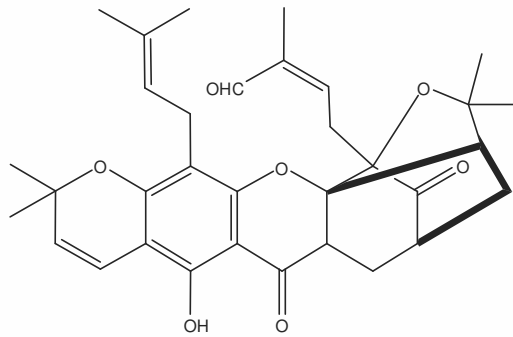
(28) Macklurin

(29) α - mangostin(30) β - mangostin

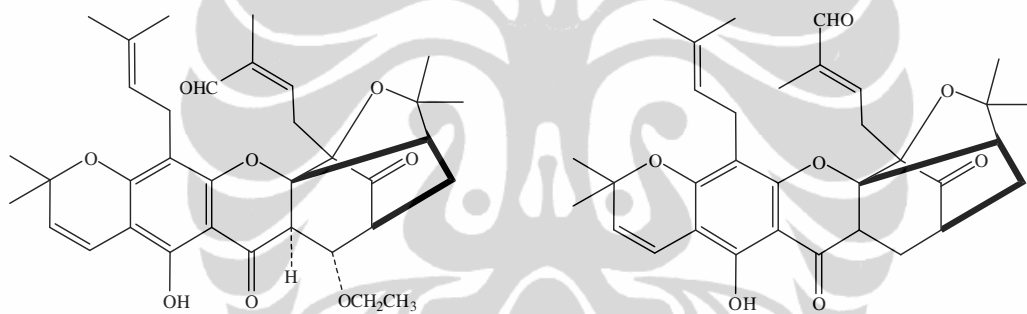
(31) Mangostanol

2.5.12 *Garcinia morella*, Desr

Buckingham J, (1992) telah meneliti kandungan kimia *G. morella*. Dari hasil penelitiannya ditemukan Deoxymorellin, Dihidro isomorellin, Dihidromorella falvon, Asam cambogat, Morellin (32), Moreollin (33), α -Guttiferrin, Asam isomorellat, Asam morellat, Morrelinol dan Dihidroisomorella (34).



(32) Morellin



(33) Moreollin

(34) Dihydroisomorrella

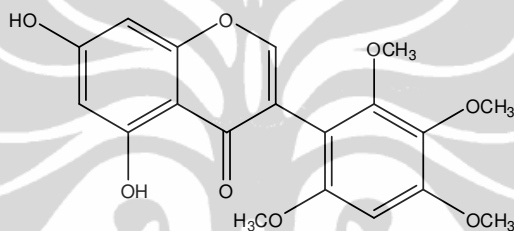
2.5.13 *Garcinia multiflora*, Champ

Jih-Jung Chen, et al., (2009) menyatakan bahwa dalam *G. multiflora* mengandung xantochymosida yaitu 3''-deoksi-3'''hidroksi-7''-O- β -D-glukopyranosida. M. L Yuh, et al., 1997 telah meneliti ekstrak metanol dari ranting dan daun *G. multiflora* Champ, sebagai anti HIV, ternyata setelah difraksinasi dan ditentukan strukturnya, bahwa senyawa sangat aktif terhadap polimerase dari HIV-1RT, merupakan suatu rangkaian flavonoida, yaitu : GB-1a, GB-2°, Volkensiflavon, Morelloflavon, GB-1a-7''-O-glukosida,

GB-2a-O-glukosida, Volkensiflavin 7'-O-glukosida, Morelloflavin-7''-O-glukosida dan 1,3,6,7-tetrahidroksixanton.

2.5.14 *Garcinia nervosa*, Miq

Vikas Babu, et al., 1987 menyatakan bahwa dalam *G. nervosa* mengandung 8-(3, 4, 5, 7- tetrahidroksi flavon-3il)-4, 5, 7-dimetoksi isoflavin. Ilyas, et al., 1994 telah menemukan Nervosin (35) Iregenin (3',5,7-trihidroksi-4', 5'', 6-trimetoksi flavon), Metil-tektorigenin-(4'5-dihidroksi-6,7-dimetoksisflavin), sebelumnya telah mengisolasi Nervoxanton dan flavonil flavon.



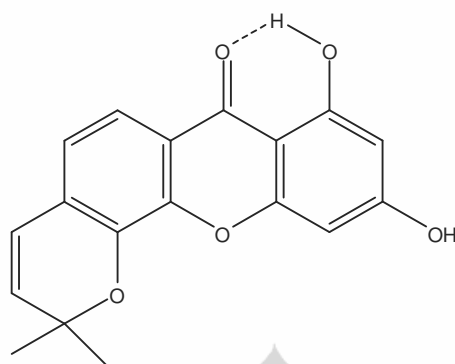
(35) Nervosin

2.5.15 *Garcinia kola*

Quan-Bin, et al., 2005, dari ekstrak akarnya *G. kola* mengandung senyawa (GB 1 (8) yang memiliki aktivitas antibakteri *Methicillin-Resistan Staphylococcus Areus* (MRSA) dan *Vancomysin-Resisten Enterococci* (VRE) aktivitas minimum dengan nilai MIC berturut-turut 32 $\mu\text{g/mL}$ dan 128 $\mu\text{g/mL}$.

2.5.16 *Garcinia tetrandra* Pierre

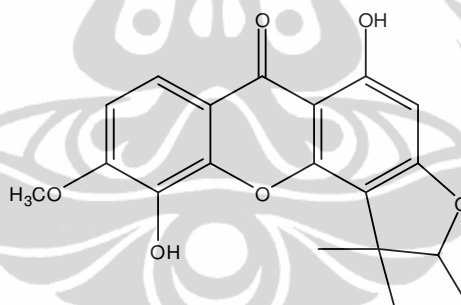
Dari ekstrak aseton *G. tetrandra* Pierre ditemukan senyawa baru dengan nama Tetrandraxanton atau 1,3-dihidroksi,2'2'-dimetilpirano (5',6'5,6) xanton (36) (Hartati, S., 2007)



(36) 1, 3-dihidroksi 2, 2- dimetilpirano (5, 6, 5, 6) xanton

2.5.17 *Garcinia Viellardii*

Dari fraksi diklorometan kulit batang ditemukan 2 xanton baru dan empat xanton lama . Salah satu xanton baru yaitu 6-O-metil-2-deprenilrheediaxanton-B (37) yang memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH hampir sama dengan BHA (Anne, et al., 2004)

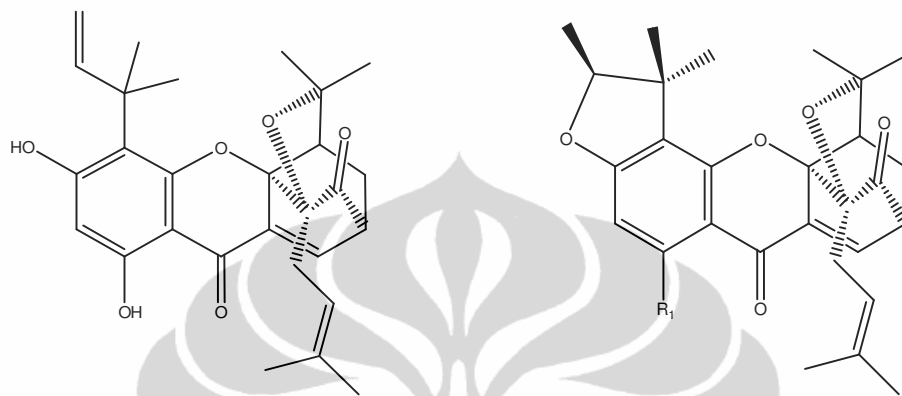


(37) 6-O-metil-2-deprenilrheediaxanton-B

2.5.19 *Garcinia bracteata*

Thoison, et al., (2000), telah melaporkan bahwa ekstrak etil asetat daun *G. bracteata* ditemukan enam jenis xanton treprenilasi baru yaitu: (38) Bractatin, (39) Isobractatin, 1-*O*- methylbractatin, (40) 1-*O*- methylisobractatin, 1-*O*-methyl-8-methoxy-8,8a- dihydrobractatin dan 1-*O*-methylneobractatin, dimana senyawa ini signifikan bersifat sitotoksik terhadap sel kanker KB. Penelitian ini

dilanjutkan pada tahun 2005 dan berhasil mengisolasi Neoisobractatin dalam bentuk dimer serupa dengan Isobractatin, Bracteaxanthonez dan Macluraxanthone.



(38) Bractatin

(39) $R_1 = \text{OH}$, Isobractatin(40) $R_1 = \text{OCH}_3$, 1-*O*-methylisobractatin

2.6 Aktivitas Biologi Senyawa Kimia

Beberapa senyawa bahan alam yang telah diisolasi, dikarakterisasi dan dipublikasikan tanpa pernah diuji suatu bioaktivitasnya. Sehingga kegunaan senyawa aktif biologi tersebut tidak diketahui. Bila suatu tumbuhan diketahui aktif bersifat toksik pada dosis yang ditetapkan, kemungkinan untuk dikembangkan lebih lanjut secara pendekatan untuk mendeteksi awal zat aktif menggunakan bioassay sistem hewan yang sederhana dan efektif. Apabila senyawa diketahui aktif telah diisolasi maka bioassay yang lebih spesifik dan lebih canggih dapat digunakan.

2.6.1 Toksisitas terhadap Larva Udang (*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT))

Suatu cara yang cepat dan murah dalam bioassay untuk skrining dan fraksionasi fisiologi aktif dari ekstrak tanaman, Mayer, et al., 1992 telah melakukan penelitian menggunakan hewan yang sangat kecil berkulit tebal yaitu udang laut (*brine shrimp*) sebagai bahan uji bioassay secara umum.

Telur udang *Artemia salina* Leach dapat diperoleh dengan mudah dan murah di toko hewan peliharaan. Bila ditempatkan di air laut maka telur akan menetas dalam waktu 48 jam menjadi larva. Larva tersebut dapat segera digunakan untuk bermacam-macam sistem bioassay. Aplikasi yang pernah digunakan adalah untuk analisis residu pestisida, mikotoksin, polusi sungai, anestetik, toksindinoflagelat, uji sejenis morfin, dan senyawa-senyawa toksin dalam lingkungan laut.

Cara uji *Brine shrimp* ini cukup sederhana untuk ekstrak crude, fraksi atau senyawa-senyawa murni dibuat konsentrasi 10, 100, 500 dan 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) pada alat uji yang mengandung 100 μL air laut (vial yang mengandung 5 mL air laut) dan 10 ekor udang dengan 3 kali pengulangan. Setelah 24 jam diamati jumlah kematian, kemudian dihitung dengan cara regresi linier atau dimasukkan dalam program untuk menentukan LC_{50} dengan batas/ limit kepercayaan 95 %. Toksisitas suatu senyawa cukup berarti bila $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$.

Bioassay *brine shrimp* sangat menguntungkan karena cepat hanya 24 jam, murah, sederhana karena tidak memerlukan tehnik-tehnik aseptik, mudah dilakukan untuk pengujian dalam jumlah banyak, tidak perlu peralatan khusus, diperlukan sampel yang relatif kecil hanya 2-20 mg, tidak diperlukan serum hewan (Jerry, 1990).

2.6.2 Antioksidan

Banyak definisi telah diberikan untuk menggambarkan “ Antioksidan”. Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, mencegah dan memperlambat proses oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah. Arti khusus antioksidan adalah zat yang dapat mencegah atau menunda terjadinya reaksi oksidasi oleh radikal bebas dalam oksidasi lipid (Kochhar dan Rossell, 1990).

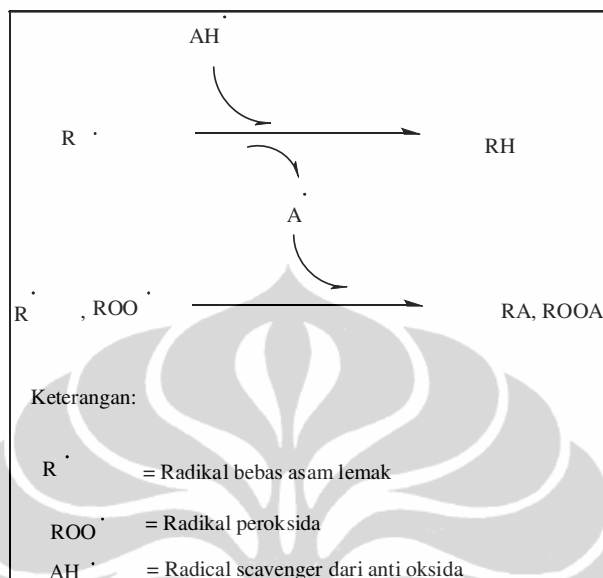
Antioksidan sangat banyak jenisnya, berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alam). Menurut Hudson (1990), senyawa antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang

dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarat, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional, sedangkan antioksidan sintetik yang cukup dikenal adalah BHA (*butylated hydroxyanisole*) dan BHT (*butylated hydroxytoluene*).

Pada dasarnya, senyawa antioksidan menghambat proses oksidasi suatu zat dengan cara bereaksi dengan zat pengoksidasi (seperti radikal peroksida dan hidroksi) membentuk senyawa hasil oksidasi yang lebih stabil daripada zat yang dilindunginya. Senyawa fenolik melindungi suatu zat dari oksidasi dengan cara bereaksi dengan zat pengoksidasi membentuk radikal fenolik yang stabil, dimana radikal yang terbentuk distabilkan dengan delokalisasi elektron pada cincin benzen.

Antioksidan dalam menghambat jalannya reaksi oksidasi dapat melalui beberapa mekanisme, yaitu mekanisme donor proton, *radical scavenger*, *oxygen quencher*, inhibisi dengan enzim dan *synergist*.

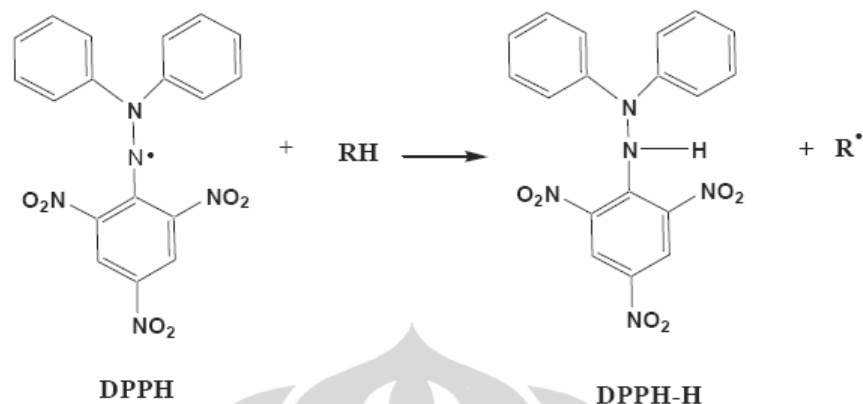
Mekanisme reaksi *radikal scavenger* dapat dilihat pada mekanisme berikut



Gambar 2.2 Mekanisme reaksi *Radical Scavenger*

Pada mekanisme *radikal scavenger*, asam lemak jika diberi inisiator, misalnya cahaya, panas, enzim atau logam berat, maka akan terjadi tahap reaksi inisiasi membentuk radikal bebas (R), selanjutnya radikal bebas ini akan bereaksi dengan oksigen (O_2) membentuk radikal peroksida (ROO) yang sangat reaktif. Radikal-radikal yang terbentuk dapat dideaktifkan dengan jalan mengikatnya dengan senyawa yang dikenal sebagai *radikal scavenger*. Pada tahap permulaan, *radikal scavenger* akan memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas, sehingga dapat menghambat pembentukan radikal peroksida. Penghilangan radikal dengan memberikan senyawa yang merupakan *radikal scavenger* akan memutuskan rantai reaksi. Radikal antioksidan yang terbentuk bersifat stabil dan dapat bergabung langsung dengan radikal lain untuk membentuk senyawa yang inert.

Salah satu metode *radikal scavenger* yang sering digunakan dalam pengujian bahan alam adalah dengan menggunakan larutan DPPH (1,1-difenil-2-hidrazin) dalam metanol. Mekanisme reaksi yang terjadi antara antioksidan dengan DPPH ditunjukkan pada reaksi berikut:



Gambar 2.3 Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan

Peredaman warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin).

2.6.2.1 Klasifikasi Antioksidan

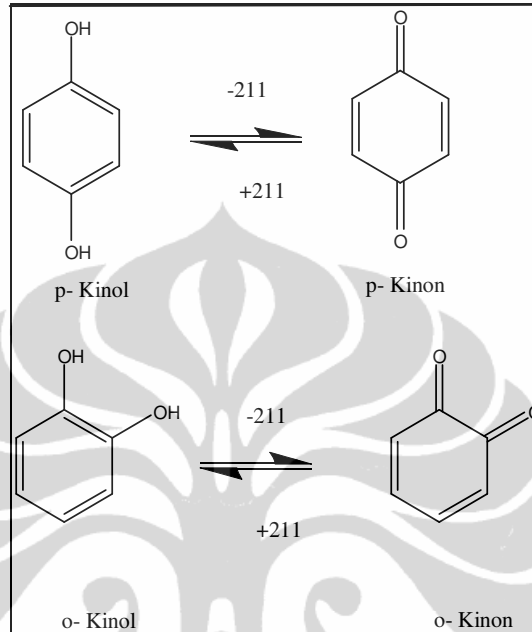
Antioksidan dapat diklasifikasikan berdasarkan beberapa golongan antara lain :

2.6.2.1.1 Berdasarkan Struktur Kimia

Berdasarkan atas struktur kimianya, Mattil dan Olcott membagi antioksidan atas beberapa tipe yaitu tipe asam, tipe inhibitor dan hidrokuinon serta tipe fenol. Klasifikasi ini dapat disederhanakan lagi, yaitu berdasarkan penggabungan sifat *synergist* dari antioksidan, maka penggolongan antioksidan dapat dibagi dalam 2 (dua) kategori, yaitu :

- Antioksidan dengan jumlah fenol yang sangat besar atau disebut sebagai antioksidan primer;
- Antioksidan dengan jumlah asam yang sangat besar atau disebut sebagai *synergist*.

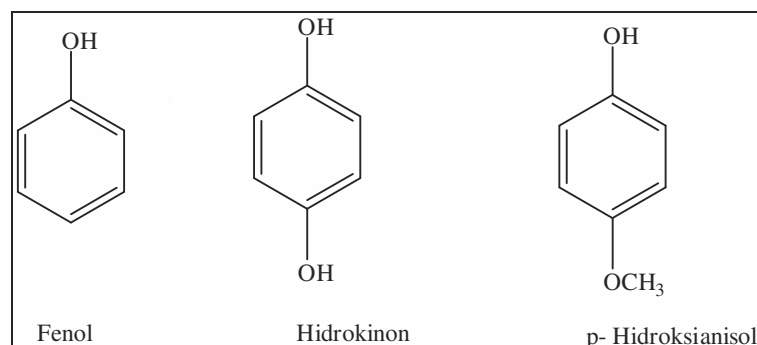
Aktifitas antioksidan tipe fenol mempunyai hubungan dengan proses kesetimbangan oksidasi-reduksi (redoks) antara Kinol dan Kinon



Gambar 2.4 Kesetimbangan oksidasi-reduksi antara Kinol dan Kinon

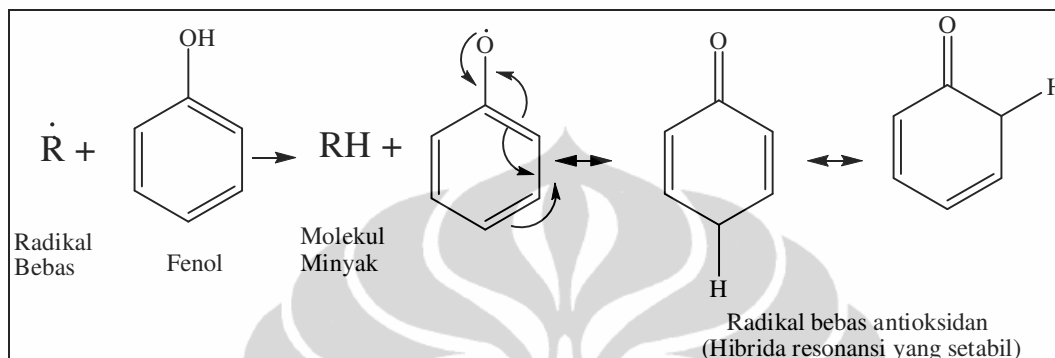
Antioksidan dengan jumlah fenol yang besar biasanya dipergunakan pada minyak dan lemak makanan.

Struktur-struktur antioksidan yang khas dari jenis fenolik yang telah diketahui antara lain yaitu :



Gambar 2.5 Struktur Antioksidan tipe Fenol

Mekanisme antioksidan tipe fenolik di dalam minyak nabati dapat digambarkan seperti reaksi dibawah ini :



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi Antioksidan tipe Fenolik

Antioksidan tipe fenolik ini sering juga sebagai antioksidan primer. Antioksidan primer didefinisikan suatu senyawa yang berfungsi menghambat atau memutuskan mekanisme radikal bebas pada autooksidasi gliserida. Kemampuannya untuk berfungsi seperti itu didasarkan atas struktur fenolik yang dimilikinya. Beberapa antioksidan dari tipe asam biasanya sangat *synergist*, juga apabila tidak *synergist*, antioksidan ini akan mengandung gugusan antioksidan yang aktif seperti orto atau para-kinol. *Synergist* adalah zat-zat yang bila dalam keadaan sendiri-sendiri tidak mempunyai atau kecil sekali daya antioksidannya, tetapi jika dikombinasikan dengan zat antioksidan primer lainnya akan mempunyai daya antioksidan yang sangat efektif. Sejumlah antioksidan dari tipe asam ini antara lain adalah asam askorbat, asam fumarat, asam maleat dan asam sitrat. Sedangkan asam galat adalah tipe asam dan tipe fenol. Gabungan antara *synergist* dengan zat antioksidan primer lainnya disebut *synergism*, yaitu gabungan dari dua aksi zat-zat atau lebih, dengan tujuan untuk menghasilkan pengaruh yang jauh lebih besar dari pada fungsi semula, misalnya *synergism* antara asam askorbat dengan asam palmitat yang pada umumnya digunakan sebagai antioksidan pada minyak kelapa.

Mekanisme dari *synergism* antara lain :

1. Pengekelatan deaktivasi dari logam-logam prooksidasi di dalam minyak.
2. Regenerasi antioksidan primer.
3. Pencegahan dekomposisi peroksida, memutuskan proses autooksidansi.

Tipe inhibitor diwakili oleh tokoferol, yang mungkin juga termasuk dalam golongan fenolik, akan tetapi pada cara penggolongan pertama kinol dan inhibitor dibedakan berdasarkan atas perbedaan strukturnya.

2.6.2.1.2 Berdasarkan mekanisme reaksi

Berdasarkan mekanisme reaksi yang terjadi, antioksidan digolongkan dalam 2 (dua) golongan, yaitu :

2.6.2.1.2.1 Antioksidan Primer

Antioksidan primer merupakan antioksidan yang dapat menghentikan proses oksidasi dengan jalan memutus rantai reaksi oksidasi (*chain-breaking antioxidant*). Antioksidan ini berperan sebagai donor hidrogen (*chain-breaking donor*) atau dapat juga sebagai akseptor electron (*chain-breaking acceptor*). Radikal peroksida merupakan senyawa pengoksidasi, sehingga cepat dapat bereaksi dengan atom hidrogennya ke radikal lemak.

Senyawa fenolik merupakan contoh antioksidan primer yang terbaik. Radikal fenoksil yang dihasilkan bersifat tidak reaktif atau relative stabil, sehingga tidak akan menginisiasi pembentukan radikal baru atau tidak akan teroksidasi lebih lanjut. Selain itu, radikal perantara dari senyawa fenolik bersifat stabil, karena adanya delokalisasi elektro. Antioksidan fenolik lebih efektif dalam memperpanjang waktu induksi, ketika ditambahkan minyak yang belum mengalami kerusakan parah dan tidak efektif jika ditambahkan kedalam minyak yang telah mengalami rusak berat.

2.6.2.1.2.2 Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder merupakan senyawa yang dapat mengurangi kecepatan reaksi autooksidasi lemak dengan mekanisme lain, yaitu mengikat oksigen singlet (*singlet oxygen quencher*); kemampuan penyerapan sinar Ultra Violet (UV absorber), sebagai contoh senyawa flavonoid; dan mengkelat logam berat (metal deactivator) yaitu melalui pembentukan senyawa kompleks, contoh dalam industri farmasi yang sering digunakan adalah etilen-diamin-tetraasetat, asam sitrat, beberapa asam amino dan asam tartrat.

Efektivitas antioksidan ini ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain :

- Radikal inisiator
- Jenis antioksidan
- Konsentrasi antioksidan dan
- Interaksi dengan antioksidan lain (efek *synergist*)

2.6.3 Kanker Payudara

Kanker adalah suatu penyakit dimana terjadi pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal, cepat, dan tidak terkendali. Sel-sel kanker akan terus membelah diri, terlepas dari pengendalian pertumbuhan, dan tidak lagi menuruti hukum-hukum pembiakan. Bila pertumbuhan ini tidak cepat dihentikan dan diobati maka sel kanker akan berkembang terus. Sel kanker akan tumbuh menyusup ke jaringan sekitarnya (invasif), lalu membuat anak sebar (metastasis) ketempat yang lebih jauh melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening. Selanjutnya akan tumbuh kanker baru di tempat lain sampai akhirnya menyebabkan kematian pada penderitanya.

Kanker dapat tumbuh di semua jaringan tubuh, seperti sel kulit, sel hati, sel otak, sel lambung, sel usus, sel paru, sel saluran kemih dan berbagai macam sel tubuh lainnya. Oleh karena itu dikenal bermacam-macam jenis kanker, salah satunya adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan jenis kanker nomor dua terbanyak pada perempuan di Indonesia dan diberitakan sebagai salah satu

penyakit kanker yang menyebabkan kematian nomor lima dari seluruh penjuru dunia setelah ; kanker paru, kanker rahim, kanker hati dan kanker usus.

Kanker ini berasal dari kelenjar, saluran kelenjar, dan jaringan penunjang payudara. Kulit payudaranya sendiri tidak termasuk dalam bagian dari kanker payudara. Pada laki-laki, kanker payudara bisa juga ditemukan walaupun sangat jarang.

Gejala dan tanda dari kanker ini (Dalimarta, 2001) :

1. Ada benjolan pada payudara bila diraba dengan tangan.
2. Bentuk dan ukuran payudara berubah, berbeda dari sebelumnya.
3. Luka pada payudara yang sudah lama, tidak sembuh dengan pengobatan.
4. Eksim pada puting susu dan sekitarnya yang sudah lama, tidak sembuh dengan pengobatan.
5. Keluar darah, nanah, atau cairan encer dari puting atau keluar air susu pada perempuan yang tidak sedang hamil atau tidak sedang menyusui.
6. Puting susu tertarik ke dalam.
7. Kulit payudara mengkerut seperti kulit jeruk (*peau d'orange*).

Sitotoksitas dievaluasi dengan uji hambat pertumbuhan atau *sulforhodamine B (SRB) assay* (Skehan, et al., 1990) . Menggunakan sel kanker payudara manusia (T47D), sel T47D merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi. Sel T47D memiliki morfologi seperti sel epitel. Sel ini dikulturkan dalam media DMEM + 10% FBS + 2 mM L-Glutamin, diinkubasi dalam CO₂ inkubator 5% dan suhu 37⁰C.

2.7 Beberapa Spektrum untuk Elusidasi Senyawa Murni

2.7.1 Spektrometri Massa

Spektroskopi massa adalah penguraian senyawa organik dan perekaman pola fragmentasi menurut massanya. Proses yang terjadi yaitu uap cuplikan berdifusi kedalam sistem spektrometri massa yang bertekanan rendah, lalu diionkan dengan energi yang cukup untuk memutus ikatan kimia. Ion bermuatan positif yang terbentuk dipercepat dalam medan magnet yang menyebarkan ion tersebut dan memungkinkan pengukuran kelimpahan nisbi ion yang mempunyai nisbah massa terhadap ukuran tertentu. Rekaman kelimpahan ion terhadap massa merupakan garis spektrum massa yang terdiri dari sederetan garis yang intensitasnya berbeda-beda pada satuan massa yang berlainan .

Cara memasukkan sampel ke dalam alat dapat melalui GC (GC-MS), LC (LC-MS) atau secara langsung melalui *direct inlet probe* (DIP). GC-MS digunakan untuk sampel yang tidak murni dan dapat menguap pada suhu $\leq 250^{\circ}\text{C}$, LC-MS sampel yang tidak murni dan tidak mudah menguap, sedangkan DIP digunakan untuk sampel murni.

Kromatografi cair adalah suatu cara memisahkan senyawa atsiri dengan meneruskan arus cair melalui fase diam. Kromatografi cair didasarkan atas partisi zat antara dua fase yang saling kontak tetapi tidak bercampur. Pada kromatografi cair ini, cuplikan disuntikkan kedalam injektor yang akan dibawa oleh cairan pembawa pada kecepatan volume konstan melalui kolom pemisah dan akan sampai pada detektor yang akan menimbulkan sinyal yang proporsional dengan jumlah senyawa yang datang dengan cairan pembawa .

Spektroskopi massa seringkali digabung dengan kromatografi cair atau gas. Spektroskopi massa, karena memiliki sensitivitas dan kecepatan scan yang tinggi sehingga merupakan tehnik yang paling sesuai untuk memperoleh informasi struktur dari sejumlah kecil material yang dipisahkan oleh kromatografi gas. Hal ini menguntungkan karena dengan sekali kerja kita akan memperoleh hasil identifikasi kualitatif dan kuantitatif dari sejumlah komponen yang

strukturnya rumit, yang mungkin terdapat bersama-sama dalam ekstrak tumbuhan. Selain itu kombinasi dua tehnik ini juga memberikan peranan yang penting dalam identifikasi struktur untuk komponen-komponen alam dan campuran organik buatan .

2.7.2 Spektrofotometri Ultraviolet Cahaya Tampak

Analisis dengan spektroskopi ultraviolet dan cahaya tampak (UV-Vis) dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 190-380 nm pada daerah UV dan 380-780 nm pada daerah cahaya tampak menggunakan sumber cahaya yang mendekati monokromatis.

Spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada pengukuran absorbansi dalam daerah UV-Vis menyebabkan eksitasi elektron, sehingga sering disebut spektrofotometri serap. Absorpsi cahaya ini terjadi disebabkan adanya suatu sistem atau gugus atom yang dapat menyerap cahaya yang disebut gugus kromofor .

Komponen spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak terdiri dari:

a. Sumber cahaya

Sumber cahaya yang biasa digunakan adalah lampu wolfram. Lampu hidrogen atau lampu deuterium digunakan untuk sumber pada daerah ultraviolet.

b. Monokromator

Digunakan untuk memperoleh sumber cahaya yang monokromatis. Dapat berupa prisma atau grating.

c. Sel absorpsi

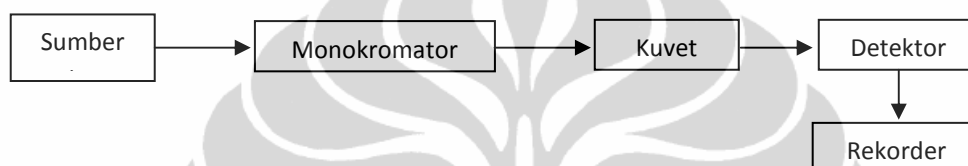
Pada daerah cahaya tampak dapat digunakan kuvet kaca tetapi pada daerah UV harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini.

d. Detektor

Detektor memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

e. Rekorder

Secara skematis komponen spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak ditunjukkan sebagai berikut:



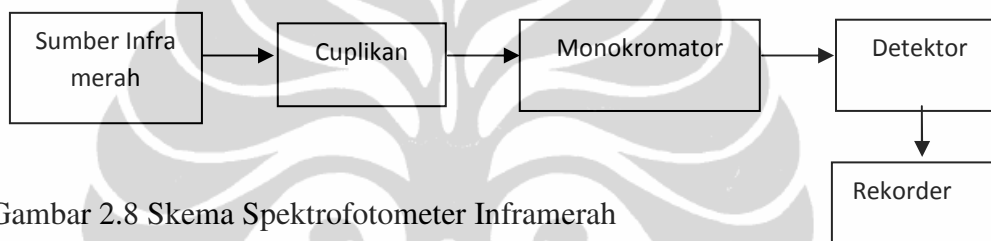
Gambar 2.7 Skema Spektrofotometer Ultraviolet Cahaya Tampak

2.7.3 Spektrofotometri Inframerah

Daerah inframerah berkisar pada bilangan gelombang $12800-10\text{ cm}^{-1}$ atau panjang gelombang $0,78-1000\text{ }\mu\text{m}$. Spektrum IR yang lazim dengan panjang gelombang antara $2,5-15\text{ }\mu\text{m}$, dimana sesuai dengan bilangan gelombang antara $4000-667\text{ cm}^{-1}$. Sinar inframerah mengeksitasi bagian molekul menjadi getaran mekanik, dan garis absorpsi melalui eksitasi cahaya rotasi molekul dipertebal dan dengan demikian diregistrasi sebagai pita. Setiap molekul mempunyai spektrum IR yang karakteristik pada konsentrasi ukur tertentu, yang dapat dibedakan dari spektrum molekul lainnya dan melalui posisi serta intensitas pita absorpsi dapat digunakan untuk penjelasan struktur, pemeriksaan kemurnian, identifikasi dan penentuan kuantitatif.

Spektrum IR senyawa tumbuhan dapat diukur dengan spektrofotometri IR yang merekam secara otomatis dalam bentuk larutan (dalam kloroform, karbontetraklorida, 1-5%), bentuk gerusan dalam minyak nujol, atau bentuk padat yang dicampur dengan kalium bromida dimana cakram tipis dibuat dari serbuk yang mengandung kira-kira 1 mg bahan dan 300-400 mg kalium bromida dalam kondisi tanpa air, dibuat dengan menggunakan pengempa.

Spektrofotometer inframerah pada dasarnya sama dengan spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak tetapi sumber cahaya, detektor, dan komponen optiknya sedikit berbeda. Pada spektrofotometer IR, sumber cahaya yang paling umum digunakan adalah Nernest atau lampu Glower, detektor yang banyak digunakan adalah detektor termal dan tempat sampel (sel kuvet) diletakkan sebelum diantara sumber cahaya dan monokromator untuk menghilangkan hamburan sinar yang berasal dari sampel dan untuk mencegah terjadinya penguraian secara fotokimia. Secara skematis komponen spektrofotometer inframerah ditunjukkan sebagai berikut:



Gambar 2.8 Skema Spektrofotometer Inframerah

Spektrofotometer Inframerah *Fourier Transform* (FT-IR) merupakan metode baru untuk pengukuran spektrum inframerah dengan rentang frekuensi $5000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Beberapa keuntungan menggunakan *Fourier Transform* antara lain pengukuran yang lebih cepat, resolusi yang tinggi, dan dapat menggunakan sampel yang lebih sedikit. Selain itu, data yang diperoleh dalam bentuk digital dapat langsung discaning oleh komputer. Spektrum FT-IR dapat memberikan informasi jenis gugus fungsi dari suatu senyawa seperti hidroksi (-OH), amida (CONH), karbonil (keton, karboksilat, ester, amida), aromatik dan ikatan rangkap (CH=CH).

2.7.4 Spektrometri Magnetik Inti

Sejumlah kecil energi terabsorpsi atau teremisikan apabila inti pindah dari satu tingkat energi ke tingkat energi yang lain. Hal ini dapat dimanfaatkan sebagai suatu cara analisis spektrometri yang disebut resonansi magnetik inti atau teknik RMI. Spektroskopi RMI proton pada hakikatnya adalah sarana untuk menentukan struktur senyawa organik dengan mengukur momen magnet atom hidrogennya. Pada kebanyakan senyawa, atom hidrogen terikat pada gugus yang berlainan

(seperti $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CHOH}$, dan sebagainya) dan spektrum RMI proton merupakan rekaman sejumlah atom hidrogen yang berada dalam keadaan lingkungan yang berlainan tersebut. Pelarut untuk pengukuran RMI harus tidak mengandung proton, karena dapat mengganggu. pelarut yang lazim digunakan adalah karbontetraklorida (CCl_4), deuterokloroform (CDCl_3), deuterium oksida (D_2O), atau deuterioaseton (CD_3COCD_3). Paling sedikit diperlukan 5-10 mg untuk analisis ini.

Spektrometri RMI- ^{13}C merupakan pelengkap RMI proton dan untuk analisis struktur diperlukan paling sedikit 10 mg. Pelarut yang digunakan serupa dengan RMI proton, tetapi jangka resonansi C jauh lebih besar, yaitu 0-200 ppm medan bawah dari TMS bila dibandingkan dengan 0-10 ppm pada resonansi proton. Kombinasi kedua spektroskopi ini merupakan alat yang kuat pada penentuan struktur terpenoid, alkaloid, atau flavonoid baru spektroskopi ini berguna pada analisis glikosida, pada penentuan ikatan berbagai bagian gula dan konfigurasi.

Instrumen RMI dapat berupa RMI resolusi tinggi atau model puncak lebar. RMI resolusi tinggi dapat menguraikan struktur halus yang sesuai dengan puncak absorpsi. Sedangkan instrumen berpuncak lebar digunakan untuk analisis unsur secara kuantitatif dan menelaah lingkungan fisis suatu inti.

Instrumen RMI terdiri atas komponen-komponen utama:

a. Magnet

Akurasi dan kualitas suatu alat RMI tergantung pada kekuatan magnetnya. Resolusi akan bertambah dengan kenaikan kekuatan medannya.

b. Generator medan magnet untuk *sweeping*

Suatu pasangan kumparan terletak sejajar terhadap permukaan magnet, digunakan untuk mengubah medan magnet pada suatu range yang sempit.

c. Sumber frekuensi radio

Sinyal frekuensi oskilasi radio disalurkan pada sepasang kumparan yang posisinya 90° terhadap jalur dan magnet.

d. Detektor sinyal

Sinyal frekuensi radio yang dihasilkan oleh inti yang beresonansi dideteksi dengan kumparan yang mengitari sampel dan tegak lurus terhadap sumber.

e. Rekorder

Pencatat sinyal RMI disinkronisasikan dengan sapuan medan, rekorder mengendalikan laju sapuan spektrum. Luas puncak dapat digunakan untuk menentukan jumlah relatif inti yang mengabsorpsi. Untuk analisis kuantitatif, luas puncak tidak dapat digantikan oleh tinggi puncak.

f. Tempat sampel dan probe

Tempat sampel merupakan tabung gelas yang berdiameter 5 mm dan dapat diisi cairan sampai 0,4 mL. Probe sampel terdiri atas tempat kedudukan sampel, sumber frekuensi penyapu dan kumparan detektor dengan sel pembanding.

Medan yang berbeda pada RMI dapat mengubah spektrum senyawa yang sama. Perbedaan frekuensi absorpsi proton akibat perbedaan lokasi letak atom H terikat dikenal sebagai efek pergeseran kimia. Nilai pergeseran kimia tergantung pada lingkungan kimia suatu proton, sedangkan lingkungan kimia suatu proton tergantung pada besar kecilnya efek perlindungan oleh elektron-elektron di lingkungan proton tersebut. Pergeseran kimia diukur dalam besaran medan atau frekuensi, dimana perbandingan perubahan frekuensi yang diperlukan terhadap frekuensi suatu standar dinyatakan dalam δ ppm.

Standar yang digunakan adalah zat yang protonnya mempunyai efek perlindungan sebesar mungkin untuk memudahkan perbandingan. Untuk penentuan zat-zat organik biasanya $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, TMS digunakan sebagai standar dengan pelarut CCl_4 . TMS dipilih karena keidentikan lingkungan semua atom hidrogennya dan semua atom tersebut mengalami efek perlindungan yang sangat kuat dibandingkan dengan senyawa organik pada umumnya. Pergeseran kimia digunakan untuk identifikasi gugus fungsi dan dapat digunakan sebagai penolong untuk menentukan letak suatu gugus dalam penentuan struktur molekul. Penguraian (*splitting*) puncak terjadi akibat medan lokal yang ditimbulkan oleh inti hidrogen yang terikat pada atom terdekat.

Interaksi lain yang dapat diamati pada RMI adalah interaksi spin suatu proton dengan spin proton lainnya yang terikat pada atom tetangga. Akibat interaksi ini puncak-puncak yang dihasilkan pergeseran kimia akan terpecah menjadi puncak-puncak yang lebih halus secara berganda. Tetapan coupling makin kecil bila jarak interaksi semakin jauh dan tetapan coupling bernilai sama dalam sepasang proton yang berinteraksi.

Spektrometer resonansi magnetik inti (*Nuklear Magnetic Resonance = NMR*) Spektrum satu dimensi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT (*Distortionless Enhancement of NMR Signals by Polarization Transfer*) dapat memberikan banyak informasi seperti $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi adanya gugus-gugus fungsi yang dinyatakan dalam bentuk khas seperti jumlah dan posisi gugus fungsi (orto, meta, para) dengan melihat nilai pergeseran kimia (δ) dan konstanta koplengnya (J), jumlah proton dapat dilihat dari hasil integrasinya, dan dapat menentukan bentuk konformasinya seperti *cis* atau *trans*, *aksial* atau *equatorial*. Pengukuran spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT dapat memberikan jenis karbon primer, sekunder, tersier dan kwartener (CH_3 , CH_2 , CH , C , O-C , C=O , H-C=O , $-\text{CONH}$, $-\text{COOH}$ dan $-\text{COOR}$).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Pengumpulan dan Pengidentifikasian Sampel

Sampel diambil dari desa Kalampangan, Kecamatan Sebangau, Kabupaten Palangka Raya, Kalimantan Tengah, berupa kulit batang *G. eugenifolia* Wall, dipilih kulit batang agar tidak merusak perkembangan tanaman, dan lebih mudah pengolahannya serta tidak terjadi kerusakan sampel pada saat pengiriman. Misalkan diambil buahnya, tanaman ini berbuah musiman, tentunya harus menunggu saat yang tepat untuk mendapatkan jumlah buah yang memenuhi untuk penelitian. Kalau diambil akarnya, hal ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian pada tanaman *G. eugenifolia* Wall, jika diambil daunnya, akan membutuhkan tempat yang sangat banyak untuk mendapatkan sampel yang cukup untuk penelitian ini dalam daunnya banyak terdapat klorofil yang sangat sukar untuk proses isolasi. Identifikasi/determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi - LIPI Bogor, (Lampiran .1).

3.2 Rancangan Penelitian

3.2.1 Strategi Penyelesaian Masalah

Untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat pada kulit batang *G. eugenifolia* Wall dilakukan isolasi dengan maserasi dalam *n*-heksana yang merupakan pelarut non polar untuk menarik senyawa-senyawa kimia yang bersifat non polar dan kemudian untuk senyawa yang polar dimaserasi dalam metanol. Pemisahan lebih lanjut dilakukan kromatografi kolom cepat dengan vakum sebagai fasa diamnya dipergunakan silika gel dan sebagai fasa geraknya dipergunakan *n*-heksan : etil asetat yang perbandingannya dinaikkan secara gradien agar terjadi pemisahan yang sempurna sehingga diperoleh isolat yang memiliki perbedaan yang cukup signifikan.

Uji aktivitasnya sebagai penghambat reaksi kimia menggunakan DPPH, sebagai pembanding digunakan larutan *Quersetin*. Aktivitas yang lainnya yaitu toksisitas diuji terhadap larva udang, uji antikanker *in-vitro* mempergunakan Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara.

3.2.2 Prosedur Perlakuan Sampel

Kulit *G. eugenifolia* Wall yang sudah dipotong-potong, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dalam suhu kamar, agar tidak terjadi oksidasi oleh sinar matahari, untuk menurunkan kadar airnya dikeringkan di dalam oven pada temperatur 50 °C selama 24 jam. Setelah kering diangin-anginkan di udara selama 2 jam, kemudian digiling halus dengan grinder, proses penggilingan dilakukan pengulangan dengan alat giling yang lebih kecil sehingga diperoleh bubuk kulit batang yang halus sebanyak 2,507 kg. Bubuk halus ini dimasukkan dalam karung kain dan diikat dengan tali kain, selanjutnya dilakukan proses perendaman dengan 3 liter *n*-heksana selama 7 X 24 jam, perendaman diulangi sebanyak 6 kali, sampai diperoleh ekstrak agak bening, kemudian larutan dipisahkan dari residu. Ulangi perendaman residu dengan 3 liter metanol selama 7 X 24 jam sebanyak 6 kali, setelah residu dan ekstrak dipisahkan masing-masing ekstrak dipekatkan dengan penguap *vacum* yang berputar pada suhu 40 °C dengan putaran 70 rpm, ekstrak kental yang diperoleh berwarna coklat kehitaman semuanya ditampung dalam botol yang sudah ditimbang, untuk mengetahui jumlah ekstrak yang diperoleh timbang kembali ekstrak dalam botol, berat bersih ekstrak yang diperoleh pada perendaman dengan *n*-heksana adalah 23 gram. 20 gram ekstrak kental agak lengket dalam *n*-heksana ditambahkan silika gel kasar kemudian digerus sampai homogen yaitu berupa bubuk yang kering dan tidak lengket lagi, selanjutnya diisolasi dengan kolom kromatografi vakum. Sebelum dilakukan fraksinasi, terlebih dahulu dilakukan orientasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan komposisi eluen yang tepat untuk memfraksinasi ekstrak *n*- heksana. Cara melakukan KLT ambil ekstrak *G. eugenifolia* Wall dalam *n*-heksana satu spatula masukkan ke dalam botol kecil kemudian dilarutkan

dalam metanol, selanjutnya totolkan ke dalam plat kromatografi lapis tipis menggunakan pipa kapiler kemudian di elusi dengan *n*-heksana 100 % di dalam chember. Hasil KLT dilihat menggunakan sinar ultra violet Shimadzu λ 254 dan λ 366 nm, diberi tanda noktahnya, untuk memperjelas noktah yang tidak kelihatan pada sinar ultra violet dapat dilakukan penyemprotan dengan asam sulfat 10 %, dari hasil KLT ternyata noktahnya belum bergerak ke atas kemudian dilakukan KLT dengan perbandingan eluen *n*-heksan : etil asetat = 95: 5, 90 : 10 dan 80 : 20, dari analisa hasil KLT maka dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan kolom kromatografi vakum. Kolom silika dibuat dengan mencampurkan 400 gram silika gel 60 (70-230 mesh ASTM) dengan eluen pertama *n*- heksana hingga menjadi seperti bubur, kemudian dituang ke dalam kolom yang sudah berisi 50 mL eluen pertama tanpa putus sambil diketuk – ketuk agar padat dan tidak terdapat gelembung udara. Selanjutnya eluen dialirkan sehingga permukaan eluen sekitar 2 cm di atas permukaan silica. Ekstrak *n*-heksana sebanyak 20 gram dihomogenkan dengan cara menggerus bersamaan dengan 17 gram silika gel kasar hingga menjadi serbuk halus. Selanjutnya ekstrak *n*- heksana yang telah dihomogenkan dimasukkan kedalam kolom dengan menggunakan corong secara perlahan-lahan. Bagian atas diberi kapas secukupnya agar sampel tidak bergeser pada saat ditambahkan eluen.

Fraksinasi dilakukan dengan cara elusi secara gradien yaitu perbandingan eluennya *n*-heksana : etil asetat dinaikkan perbandingannya bertahap, menggunakan eluen berturut-turut *n*- heksana 100 % sebanyak 1 liter, *n*-heksana: etil asetat (95:5) 1 liter, *n*-heksana : etil asetat (85:15) sampai (4:6) masing-masing 0,5 liter, etil asetat 1 liter dan metanol 1 liter. Eluat ditampung setiap 100 mL dalam erlenmeyer selanjutnya diuapkan dengan evaporator vakum dan dikelompokkan berdasarkan pola kromatografi lapis tipisnya. Hasil penggabungan tersebut ada beberapa fraksi yang terbentuk kristal yaitu fraksi 2 (botol ke 24-30), fraksi 3 (botol ke 31-35) dan fraksi 4 (botol ke 36-48). Pemurnian senyawa dari hasil kolom dilakukan dengan menggunakan cara rekristalisasi dan menggunakan KLT preparatif hingga diperoleh senyawa murni.

Senyawa murni yang didapat, diukur titik leleh, dan ditentukan struktur molekulnya, serta diuji bioaktivitasnya.

3.3 Elusidasi Senyawa Murni

3.3.1 Pengukuran Spektroskopi UV-Visibel

Pengukuran spektroskopi ultra violet-visibel dilakukan dengan melarutkan 1 mg senyawa uji dalam 10 mL pelarut metanol sehingga terbentuk larutan yang homogen. Larutan tersebut ditentukan panjang gelombangnya pada daerah 200 - 400 nm. Panjang gelombang dari absorbansi maksimum adalah nilai karakteristik suatu serapan oleh senyawa sampel dinyatakan sebagai λ_{\max} .

3.3.2 Pengukuran titik leleh

Sampel yang akan diuji 0,1 mg dimasukkan kedalam alat uji titik leleh (Fisher Scientific) tutup dengan kaca kemudian nyalakan alatnya, amati sampai senyawa uji meleleh catat suhu yang ditunjukkan oleh alat uji tersebut pada suhu kamar.

3.3.3 Pengukuran Spektroskopi infra merah (FT-IR)

Sebanyak 1 mg senyawa uji digerus dengan 50 mg KBr dalam mortal sampai homogen selanjutnya diletakkan dalam cetakan pelet, pelet KBr diukur pada rentang bilangan gelombang 4000-660 cm^{-1} .

3.3.4 Pengukuran Spektroskopi LC-MS

Satu mg senyawa uji dilarutkan dalam metanol 98 %, kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μL kedalam LC- MS Mariner Biospectrometry (Hitachi L 6200, Asquire 3000 plus-01073, Shimadzu) Sistem ESI (Electrospray Ionisation) model ion positif, kolom C 18 (RP 18) superco, panjang kolom 150 mm, diameter dalam kolom 2 mm, ukuran partikel 5 μm dengan kecepatan alir diatur 1 mL/ menit, dengan rentang waktu selama 30 menit. Hasil pengukuran disajikan dalam bentuk grafik LC dan MS.

3.3.5 Pengukuran Spektroskopi resonansi magnetik inti (Nuklear Magnetic Resonance = NMR)

Menentukan proton ($^1\text{H-NMR}$) 2 mg senyawa uji dilarutkan dalam 0,6 - 0,75 mL pelarutnya CDCl_3 dan tetra metil silikon sampai kira-kira setinggi 4 cm dimasukkan ke dalam tabung kemudian dimasukkan kedalam tube khusus atur posisinya agar tepat di tengah-tengah, tube dilap dengan tisu kemudian dimasukkan kedalam reaktor. Sebelum memasukkan sampel, gas nitrogen dalam reaktor harus dihidupkan agar sampel yang terlebih dahulu keluar atau reaktor dalam keadaan kosong, baru sampel yang akan diuji dimasukkan, kemudian gas nitrogennya ditutup sehingga sampel masuk kedalam reaktor, selanjutnya diatur gelombangnya dengan cara menyesuaikan tuningnya, setelah sesuai baru diruning kira-kira 30 menit. Untuk runing $^{13}\text{C-NMR}$ membutuhkan sampel yang lebih banyak dan waktu yang lebih lama dari pada $^1\text{H-NMR}$. Frekuensi yang dipergunakan 500 MHz untuk $^1\text{H-NMR}$ dan 125 MHz untuk $^{13}\text{C-NMR}$.

3.4 Uji Aktivitas Biologi

Senyawa hasil isolasi diuji aktivitas biologinya, yaitu : sifat toksisitas, sifat antioksidan dan sifat anti kanker.

3.4.1 Uji Toksisitas terhadap *Brine Shrimp*

Pengujian sifat toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethal Test*) melalui beberapa tahapan sebagai berikut :

1. Penetasan Larva Udang

Kira-kira 50 mg telur udang ditetaskan di dalam tempat persegi panjang (10 X 20 cm) yang dilengkapi pembatas berlubang 2 mm dan sudah diisi air laut, ditutup dengan kertas alumunium pada bagian yang ada telurnya, biarkan selama 48 jam di bawah sinar lampu 14 Watt, maka telur akan menetas kemudian diambil larva-larva udang yang akan diuji dengan pipet dari sisi yang terang.

2. Persiapan Larutan yang akan Diuji

Ekstrak dan senyawa murni yang akan diuji dibuat konsentrasi 1000, 500, 100 dan 10 $\mu\text{g/mL}$ dalam air laut, apabila sampel tidak larut tambahkan 2 tetes DMSO (Dimetil sulfoksida).

3. Uji Toksisitas Metode Mayer

Larva udang yang hidup sebanyak 10-15 ekor dimasukkan ke dalam vial uji yang berisi 100 μL air laut, tambahkan larutan contoh yang akan diuji masing-masing 10, 100, 500 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$. Larutan diaduk sampai homogen, untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan dengan tidak menambahkan sampel, kemudian didiamkan selama 24 jam, selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati dan yang masih hidup. Kemudian dihitung tingkat kematiannya atau mortalitas dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dibagi dengan jumlah larva udang.

Dibuat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai LC_{50} didapat dengan cara menarik garis pada nilai 50 % dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik, perpotongan garis ditarik ke garis konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50 % larva yang disebut LC_{50} . Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$. (Jerry, 1990; Mayer, 1992).

3.4.2 Uji Aktivitas Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan terhadap fraksi – fraksi, selajutnya zat tersebut baru dikarakterisasi.

Langkah – langkah pengujian aktivitas antioksidan meliputi: Pembuatan larutan DPPH 0,5 mM, menimbang dengan teliti 3,9 mg DPPH ($M_r : 394,32$), kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL metanol p.a. Larutan disimpan dalam botol gelap dan untuk setiap pengujian dibuat larutan baru.

Persiapan larutan dan uji aktivitas antioksidan, ditimbang sebanyak 4 mg sampel kemudian dilarutkan dalam 4 mL metanol (1000 µg/mL). Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL dan 20 µg/mL, dengan cara memipet 2,5 µL, 12,5 µL, 25 µL dan 50 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi, kemudian masing – masing ditambahkan 500 µL larutan DPPH 0,5 mM dan diencerkan dengan methanol sampai 2,5 mL. Sebagai standar dipergunakan quercetin dengan konsentrasi yang sama dengan sampel. Absorbansi DPPH diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm, setelah diinkubasi sampai dengan 30 menit, pada suhu 37°C. Aktivitas antioksidan diukur sebagai penurunan serapan larutan DPPH akibat adanya penambahan konsentrasi sampel. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sample tersebut dinyatakan dengan persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{sampel}})}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Keterangan : $\text{Abs}_{\text{kontrol}}$ = Absorbansi kontrol setelah 30 menit

$\text{Abs}_{\text{sampel}}$ = Absorbansi sampel setelah 30 menit

Selanjutnya nilai hasil perhitungan dimasukkan ke dalam persamaan linier dengan konsentrasi (µg/mL) sebagai absis (sumbu X) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu Y). Nilai IC_{50} dari perhitungan artinya pada saat persentase inhibisi sebesar 50 %.

3.4.3 Uji Antikanker *in-vitro* sel *Breast cancer* (T47D)

Uji antikanker dilakukan di Pusat Penelitian Kimia – LIPI Jl. Cisitu, Sangkuriang, Bandung. Metode uji antikanker yang digunakan berdasarkan metode SRB (Sulforhodamin B) yang dikembangkan oleh National Cancer Institute (Skehan, et al., 1990). Sel yang telah siap uji sebanyak 100 µL ditambah dengan sampel uji sebanyak 10 µL kemudian diinkubasi selama 24 jam pada

Universitas Indonesia

suhu 37°C. Setelah itu, sel difiksasi dengan Tricloro asetat (TCA 50%) dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 4°C. Pewarnaan menggunakan Sulforhodamin B (SRB) 0,4 % dalam asam asetat 1 % kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Warna SRB yang tidak terikat dibilas dengan asam asetat 1 % sedangkan yang terikat diekstraksi dengan basa tris (pH 10). Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan menggunakan ELISA plate reader pada panjang gelombang 515 nm. Persen viabilitas dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\frac{\text{OD (sel + sampel)} - \text{OD (kontrol negatif)}}{\text{OD (sel)} - \text{OD (kontrol negatif)}} \times 100 \% = \% \text{ Viabilitas} \quad (3.2)$$

OD = Optical Density

Sedangkan IC₅₀ dihitung dengan cara analisis regresi nonlinier antara persen viabilitas dan konsentrasi (Skehan, et al., 1990), sebagai standar digunakan doxorubicin, IC₅₀ doxorubicin = 16 µg/mL.

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Nopember 2009 sampai dengan Juli 2010 di Laboratorium LIPI Serpong.

3.6 Bahan Penelitian

Kulit batang *Gacinia eugenifolia* Wall, etil asetat (Bratachem), metanol teknis, *n*-heksana teknis, acetone yang didestilasi, asam sulfat, etanol, CH₂Cl₂, HCl pekat, H₂O, H₂SO₄ 10 %, lempeng silika gel G₆₀ F₂₅₄ siap pakai dari produk E. Merck 05554, silika gel 60 G untuk kromatografi lapisan tipis, silika gel halus untuk kromatografi kolom cepat, 1,1-difenil-2-hidrazin (DPPH), telur udang, DMSO (dimetil sulfoksida)

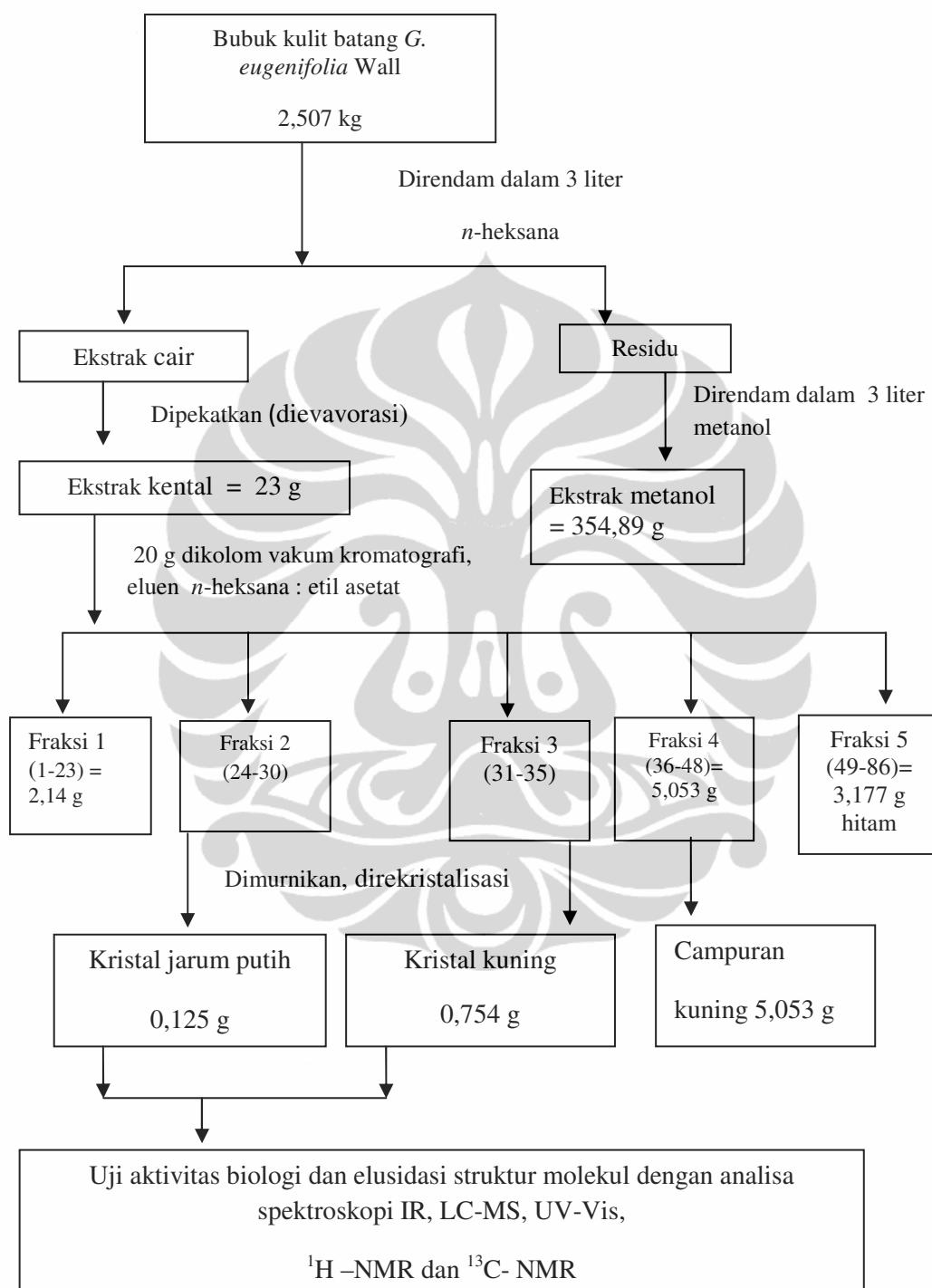
3.7 Peralatan Penelitian

Alat-alat gelas kimia yang biasa dipergunakan di laboratorium, alat penggiling miller untuk menghaluskan bahan, alat maserasi, botol 100 mL, botol balsem dan botol jam, botol kecil 5 mL (vial), neraca teknis Mettler Pc 2000, neraca analitik Mettler Tuledo AB 204 (e = 1 mg) (d= 0,1 mg), vacum evaporator Buhcii, pengukur titik leleh Merk Fisher Scientific, kolom kromatografi kaca dengan berbagai ukuran, inkubator 37 °C, lampu UV Shimadzu λ 254 nm dan λ 366 nm, pemanas listrik.

3.8 Peralatan Spektroskopi

1. Spektrofotometer ultra violet, Merk Hellet Packard (HP) 8453.
2. Spektroskopi massa (LC-MS), Hitachi L 6200, Asquire 3000 plus-01073, Shimadzu.
3. Spektrofotometer Infra Merah, Perkin Elmer 16 PC, FTIR Prestige-21, Shimadzu.
4. Spektrometri Resonansi Magnetik Inti (^1H - NMR 500MHz dan ^{13}C - NMR 125 MHz), Varian, Inova Plus.

3.9 Bagan Pelaksanaan Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Pelaksanaan Penelitian

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil isolasi dan pemurnian senyawa dari ekstrak *n*-heksana *G. eugenifolia* Wall.

Kulit batang *G. eugenifolia* Wall yang dikumpulkan dari hutan penelitian Desa Kalamangan, Kecamatan Sebangau, Kabupaten Palangka Raya, Kalimantan Tengah, setelah dikeringkan dan digiling diperoleh 2,507 kg bubuk. Hasil maserasi dengan 6 X 3 liter *n*-heksana diperoleh 23,00 g (0,92 %) ekstrak berupa cairan kental berwarna coklat kehitaman.

Ekstrak *n*-heksana sebanyak 20,00 g dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom vakum dengan fase diam silika gel (E. Merck; 7331) larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat yang derajat kepolarannya dinaikkan secara gradien (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil kromatografi kolom vakum

No	Fraksi	<i>n</i> -Heksana (mL)	Etil Asetat (mL)	Hasil (keterangan, berat)
1	1	100	0	Campuran; 2,14 g
2	2	95	5	Kristal putih jarum; 0,125 g Geufh- 9
3	3	85	15	Kristal kuning; 0,754 g Geufh- 10
4	4	80	20	Campuran kuning; 5,053 g
5	5	70	30	Campuran hitam; 3,177 g

Dari hasil kromatografi kolom vakum tersebut berhasil dimurnikan lebih lanjut dari fraksi 2 perbandingan eluen *n*-heksana : etil asetat (95: 5) berupa kristal berwarna putih (Geu fh-9) sebanyak 125 mg (0,005 %) dan dari fraksi 3 pada eluen *n*-heksana : etil asetat (85:5) diperoleh kristal berwarna kuning (Geu fh-10) sebanyak 754 mg (0,03 %).

4.2 Penentuan Struktur Molekul

Hasil isolasi senyawa dari ekstrak *n*-heksana kulit batang *G. eugenifolia* Wall diperoleh dua senyawa murni Geu fh-9 dan Geu fh-10. Untuk menentukan struktur molekul senyawa murni dilakukan analisis spektroskopi yang sesuai antara lain :

- Spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan adanya kromofor, yaitu gugus yang menyerap radiasi di daerah UV yang merupakan ikatan tidak jenuh.
- Spektroskopi infra merah (IR) untuk mengidentifikasi adanya gugus-gugus fungsional.
- Spektrometer Massa (MS), untuk menentukan data berat molekul dan pola fragmentasinya, dapat berupa GC- MS untuk senyawa yang volatil atau LC- MS untuk senyawa yang non volatil.
- Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti Proton ($^1\text{H-NMR}$) dan karbon ($^{13}\text{C NMR}$) untuk menentukan jumlah atom hidrogen dan atom karbon dalam senyawa.

4.2.1 Penentuan Struktur Molekul senyawa Geu fh-9

Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis, senyawa Geu fh-9 dalam pelarut metanol menunjukkan puncak serapan panjang gelombang (λ) maksimum 229 nm (Lampiran .2), hal ini menunjukkan bahwa senyawa Geu fh-9 tersebut memiliki gugus fungsi ikatan tak jenuh (C=C), karena adanya transisi elektron dari $\pi \longrightarrow \pi^*$, diperkuat oleh hasil FT-IR dengan adanya pita serapan pada daerah 1463 cm^{-1} (tajam), merupakan daerah vibrasi ulur ikatan karbon rangkap dua (C=C), serta didukung hasil $^{13}\text{C NMR}$ ikatan rangkap C=C dapat diamati pada pergeseran kimia (δ_{C}) 121,90 dan 140,90 ppm yang diperkuat oleh data $^1\text{H-NMR}$ pada pergeseran kimia (δ_{H}) 5,16 ppm (*dd*, $J=7,30; 10,70$ Hz) dan 5,02 ppm (*dd*, $J= 9,15; 11,65$ Hz) ikatan rangkap C=C berikutnya dapat diamati pada pergeseran kimia (δ_{C}) $^{13}\text{C-NMR}$ 129,50 dan 138,60 ppm yang didukung

oleh data $^1\text{H-NMR}$ pergeseran kimia (δ_{H}) 5,01 (1H, *t*). Puncak-puncak spektrum IR senyawa Geu fh-9 terdapat serapan pada daerah bilangan gelombang (ν) $3402,43\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan vibrasi ulur dari gugus hidroksi (-OH), hal ini dikuatkan dengan adanya vibrasi tekuk pada $1379,10\text{ cm}^{-1}$. Senyawa Geu fh-9 juga menunjukkan oksi metin pada pergeseran kimia 3,49 (*m*) axial, mengarah orientasi (β) gugus hidroksi equatorial pada C-3 suatu terpenoida, hal ini didukung oleh puncak sinyal $^{13}\text{C-NMR}$ pada pergeseran 72,04 ppm, hal tersebut adalah sangat umum ditemukan dalam struktur senyawa triterpen pada posisi karbon no. 3 dengan gugus (β) hidroksi.

Pita serapan bilangan gelombang 2935 cm^{-1} dan 2866 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur asimetrik ikatan C-H dari $-\text{CH}_3$ dan $-\text{CH}_2-$ yang diperkuat dengan adanya pita serapan ν pada daerah 1463 cm^{-1} (tajam), yang merupakan vibrasi tekuk dari gugus $-\text{CH}_3$ dan $-\text{CH}_2-$. Dari data-data spektrum IR tersebut, diperkirakan senyawa Geu fh-9 adalah suatu alkohol yang mengandung gugus-gugus CH_3 , CH_2 dan karbon rangkap dua ($\text{C}=\text{C}$).

Hasil pengukuran spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ (dalam CDCl_3 , 500 MHz) (tampilan spektrum disajikan pada Lampiran .4) menunjukkan adanya 6 metil singlet pada pergeseran kimia (δ_{H} , ppm); 0,67 (3H, *s*); 0,69 (3H, *s*); 0,78 (3H, *s*); 0,79 (3H, *s*); 0,83 (3H, *s*); 0,84 (3H, *s*) adanya penumpukan spektrum pada pergeseran kimia (δ_{H}) 1,02- 2,28 ppm yang diperkirakan merupakan daerah pergeseran kimia dari gugus metilen ($>\text{CH}_2$). Adanya gugus metin pada 5,34 ppm (*t*) yang berarti berdekatan dengan metilen atau ($>\text{CH}_2$) 5,16 ppm (*dd*, $J=7,30$; 10,70 Hz) dan 5,02 ppm (*dd*, $J=9,15$; 11,65 Hz) hal ini didukung oleh adanya karbon metin hasil $^{13}\text{C-NMR}$ yaitu pada pergeseran kimia (δ_{C}) = 121,95; 129,49 dan 138,57 ppm. Hasil pengukuran $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT atom karbon (dalam CDCl_3 , 125 MHz) (spektrum ditampilkan pada Lampiran .5 dan 6) diperoleh data pergeseran kimia 6 gugus metil ($-\text{CH}_3$) pada δ_{C} : 12,29; 12,50; 19,23; 19,65; 21,32 dan 21,34 ppm. Memiliki 9 gugus metilen ($>\text{CH}_2$) pada δ_{C} = 21,47; 24,61; 25,65; 28,40; 32,13; 37,49; 39,92; 42,45; 42,54 ppm dan 11 gugus metin ($>\text{CH}-$) pada δ_{C} = 29,18; 31,89; 31,90; 50,39; 51,49; 56,19; 57,10; 72,04; 121,95; 129,49 dan 138,57 ppm. Memiliki 3 karbon kuartener ($>\text{C}<$) pada pergeseran kimia (δ_{C}) = 36,70; 40,70; 140,99 ppm. Apabila dijumlahkan jumlah atom karbon, atom

hidrogen ditambah 1 gugus OH diperoleh ($6 \text{ CH}_3 + 9 \text{ CH}_2 + 11 \text{ CH} + 3 \text{ C} + 1 \text{ OH}$) dapat diperkirakan bahwa rumus molekul $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$, massanya 412 dan mempunyai titik leleh 138-140 °C.

Untuk menentukan jumlah cincin dan ikatan rangkap yang membentuk senyawa Geu fh- 9, maka digunakan rumus indeks kekurangan hidrogen, sebagai berikut :

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

Dimana : F = jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen, misal : C, Si

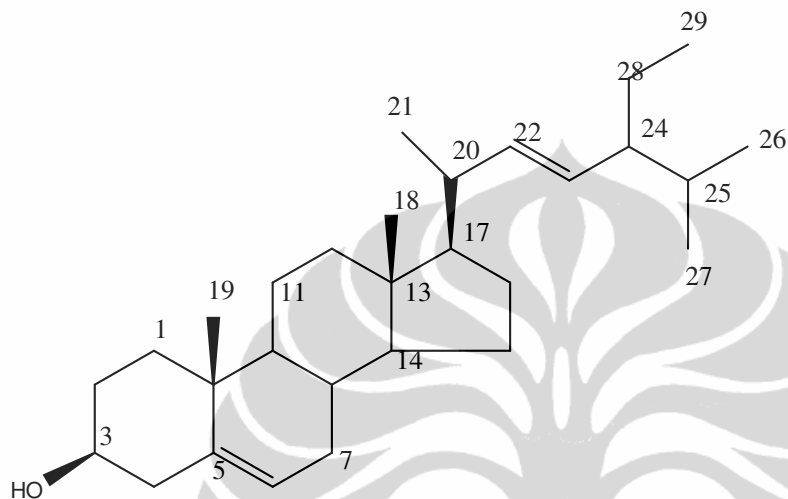
Y = jumlah atom monovalen, misal : H, Cl, Br, F

Z = jumlah atom trivalen, misal : N, P

$$\text{Jadi } F = 29 - (0,5 \times 48) + (0,5 \times 0) + 1 = 29 - 24 + 1 = 6$$

Ini berarti bahwa senyawa Geu fh- 9 dibentuk oleh cincin dan ikatan rangkap yang semuanya berjumlah 6 buah, yaitu dua ikatan rangkap dua $\text{C}=\text{C}$ dan 4 buah cincin. Terlihat dari jumlah atom karbon, hidrogen dan oksigen serta jumlah cincin mengarah dugaan bahwa senyawa tersebut merupakan suatu triterpen.

Berdasarkan hasil pengukuran spektroskopi (UV-Vis, FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) serta didukung oleh studi literatur (dengan membandingkan pergeseran kimia stigmasterol) maka dapat disimpulkan bahwa senyawa Geu fh-9 adalah identik dengan stigmasterol (Goal, 1997).



Struktur molekul senyawa Geu fh-9 = Stigmasterol

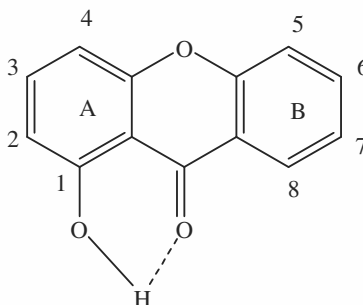
Tabel 4.2 Perbandingan dari pergeseran kimia ($\delta^{13}\text{C-NMR}$) Senyawa Geu fh- 9 (125 MHz, CDCl_3) dengan Stigmasterol (125 MHz, CDCl_3) (Goal, 1997).

No Atom Karbon	$\delta^{13}\text{C-NMR}$ Stigmasterol (ppm)	$\delta^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Geu fh- 9 (ppm)
1	37,2	37,49
2	31,6	29,18
3	71,8	72,04
4	42,5	42,54
5	<u>140,9</u>	<u>140,99</u>
6	<u>121,9</u>	<u>121,95</u>
7	32,8	32,13
8	31,9	31,89
9	50,2	50,34
10	36,6	36,75
11	22,7	21,47
12	39,7	39,92
13	42,3	42,45
14	56,9	57,10
15	24,3	24,61
16	28,9	28,40
17	56,0	56,19
18	12,0	12,29
19	19,3	19,65
20	40,5	40,75
21	21,3	21,34
22	<u>138,3</u>	<u>138,57</u>
23	<u>129,3</u>	<u>129,49</u>
24	51,2	51,49
25	31,8	31,90
26	18,9	19,23
27	21,1	21,32
28	25,4	25,65
29	12,2	12,50

4.2.2 Penentuan Struktur Molekul Senyawa Geu fh-10

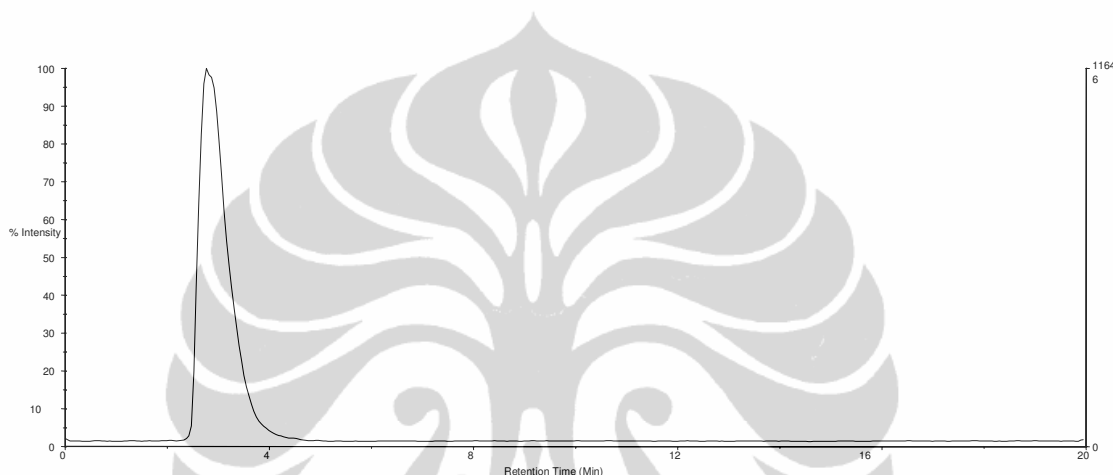
Senyawa Geu fh-10 diperoleh dari ekstrak *n*-heksana pada perbandingan eluen *n*-heksana : Etil asetat (85 : 15) penampungan nomor 30-35 berwarna kuning berbentuk kristal seberat: 754 mg (0,03%), titik leleh antara 191-192 °C.

Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Vis untuk senyawa Geu fh-10 (Lampiran. 7), dalam pelarut metanol menunjukkan λ maksimum 355; 327,5; 259 dan 247 nm, puncak-puncak absorbansi tersebut menunjukkan suatu senyawa yang memiliki kerangka xanton, senyawa xanton memiliki spektrum dengan absorpsi maksimum pada 340-400, 305-330, 250-265, dan 230-245 nm (Harborne, 1984). Didukung oleh data spektrum infra merah pada Lampiran. 8, menunjukkan puncak-puncak absorbansi pada bilangan gelombang 1637 cm^{-1} adalah merupakan vibrasi ulur dari gugus C=O terkelasi dan pada bilangan gelombang 1741 cm^{-1} adalah merupakan vibrasi ulur dari gugus C=O. Pita serapan pada bilangan gelombang 3460 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur dari gugus -OH dan didukung oleh vibrasi tekuk pada bilangan gelombang 1300 cm^{-1} , vibrasi ulur ikatan C-H dari -CH₃ dan -CH₂ ditunjukkan pada pita serapan 2929 dan 2908 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1465 cm^{-1} merupakan vibrasi tekuk dari C-H aromatik, ikatan C-O-C ditunjukkan pada pita serapan dengan bilangan gelombang 1159 dan 1066 cm^{-1} . Berdasarkan hasil analisis data IR dan UV, senyawa Geu fh-10 diketahui mempunyai gugus C-H aromatik, C-O-C, C=O (karbonil) terkonjugasi dan tidak terkonyugasi serta gugus -OH yang membentuk jembatan hidrogen pada kerangka xanton.



Struktur ikatan hidrogen pada kerangka xanton

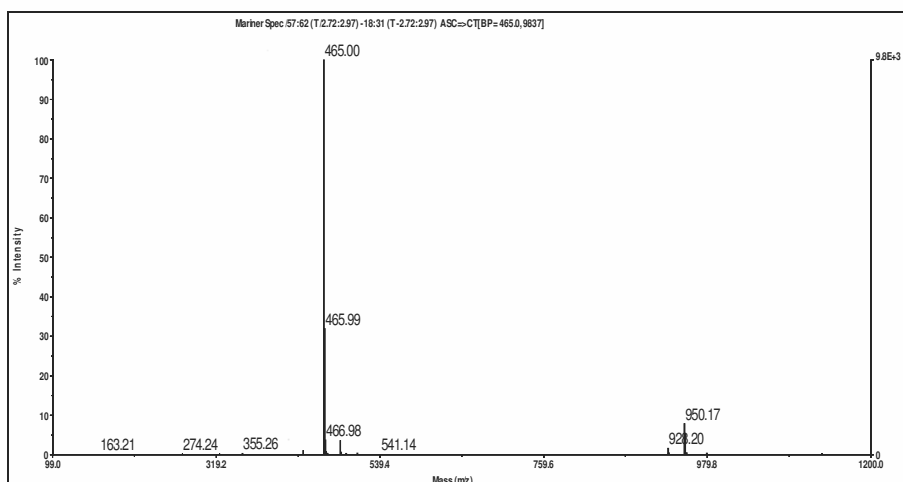
Dengan menggunakan spektroskopi LC-MS (Hitachi L 6200, Asquire 3000 plus 01073, Shimadzu), kristal kuning Geu fh-10 yang dilarutkan dalam metanol, menghasilkan puncak tunggal pada waktu retensi 2-4 menit seperti Gambar kromatogram 4.1 berikut:



Gambar 4. 1 Hasil Kromatogram LC Senyawa Geu fh -10

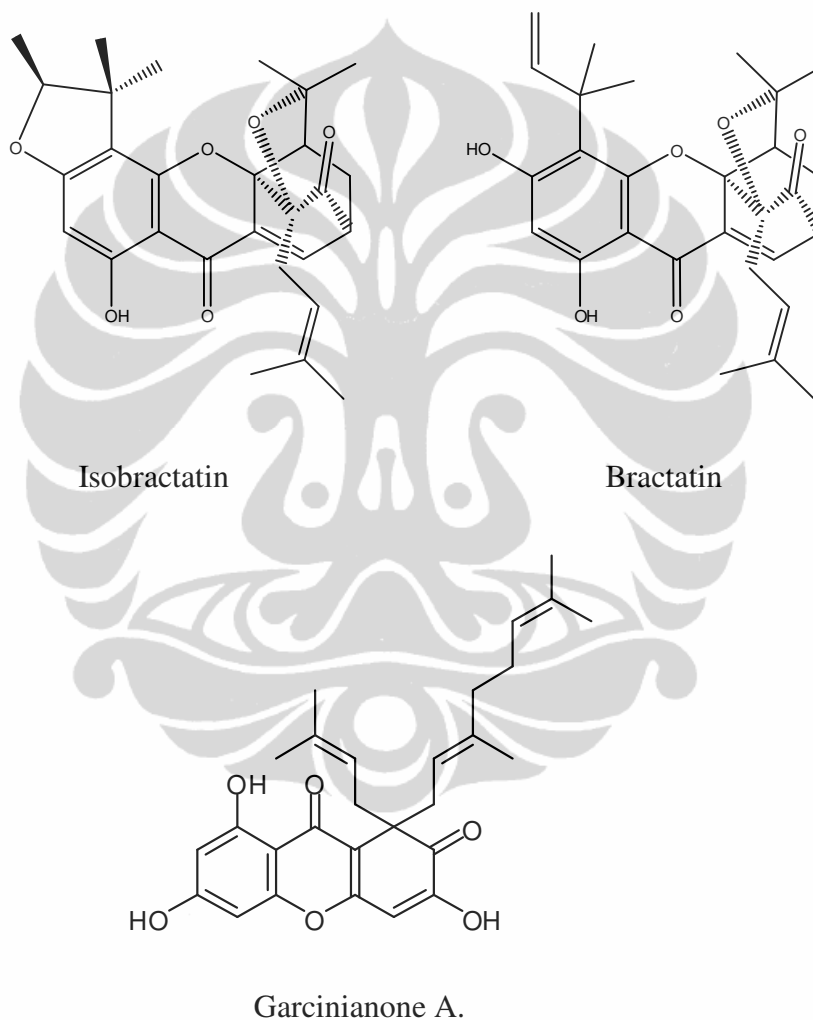
Hasil kromatogram LC senyawa Geu fh-10 menunjukkan satu puncak, hal tersebut dapat diperkirakan senyawa Geu fh-10 sudah cukup murni.

Berdasarkan analisa MS nya diperoleh puncak dasar tertinggi (100 %) MH^+ = 465,00, seperti Gambar 4. 2



Gambar 4.2 Hasil Pengukuran Spektroskopi MS Senyawa Geu fh-10

Berdasarkan hasil MS pada Gambar 4.2 diketahui kristal Geu fh-10 mempunyai massa (m/z) = 464. Hasil penelusuran pustaka dan *CD room dictionary of natural product* 2005, bahwa senyawa yang memiliki massa molekul 464 adalah Isobractatin, Bractatin, Garcinianone A.



Pergeseran kimia H (δ_H , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (dalam CDCl_3 , 500 MHz) (tampilan spektrum disajikan pada Lampiran . 10) menunjukkan adanya 11 metil singlet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,04 (3H, s); 1,06 (3H, s); 1,16 (3H, s); 1,25 (6H, s); 1,27 (3H, s) 1,28 (3H, s); 1,35 (3H, s); 1,49 (3H, s); 1,58 (3H, s); 1,72 (3H, s), 2 buah metil doublet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,38 (3H, d, $J=6,10$ Hz); 1,40 (5H, d, $J=6,75$ Hz); serta terdapat 2 buah gugus metilen ($> \text{CH}_2$), pada pergeseran kimia (δ , ppm); 2,31 (2H, d, $J=4,90$ Hz); 2,34

(2H, *d*, $J=4,90$ Hz), Senyawa Geu fh-10 juga menunjukkan adanya 10 gugus metin ($-CH<$) pada pergeseran kimia (δ , ppm); 2,52 (1H, *t*, $J=8,55$ Hz); 2,53 (1H, *t*, $J=8,55$ Hz); 2,62 (1H, *d*, $J=11$ Hz); 3,48 (1H, *t*, $J=4,90$ Hz); 4,36 (1H, *t*, $J=7,95$ Hz); 4,52 (1H, *q*, $J=6,70$ Hz) ; 5,98 (1H, *s*); 5,99 (1H, *s*); 7,45 (1H, *d*, $J=6,70$ Hz) dan 7,46 (1H, *d*, $J=7,35$ Hz). Dua buah proton pergeseran kimia H (δ_H , ppm); 5,98 (1H, *s*); 5,99 (1H, *s*) merupakan proton pada gugus benzen yang *sheilding* akibat adanya pengayaan elektron oleh gugus hidroksi yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil. Pada pergeseran kimia (δ , ppm); 13,08 (1H, *s*) dan 13,14 (1H, *s*) menunjukkan adanya 2 gugus OH yang membentuk jembatan hidrogen, karena dekat dengan gugus karbonil C=O.

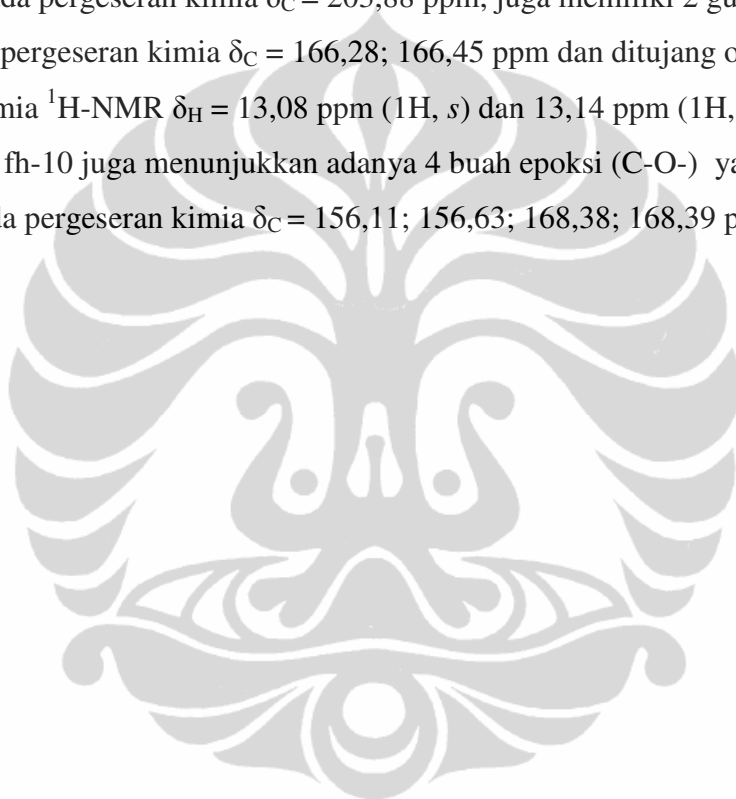
Tabel 4.3 Tabulasi pergeseran kimia H (δ_H , ppm) 1H - NMR senyawa Geu fh-10

No	δ_H (ppm)	ΣH , Multiplisitas	No	δ_H (ppm)	ΣH , Multiplisitas
1	1,04	3H, singlet	14	2,34	2H, doublet ($J= 4,90$ Hz)
2	1,06	3H, singlet	15	2,52	1H, triplet ($J=8,55$ Hz)
3	1,16	3H, Singlet	16	2,53	1H, triplet ($J=8,55$ Hz)
4	1,25	6H, singlet	17	2,62	2H, doublet ($J=11$ Hz)
5	1,27	3H, singlet	18	3,48	2H, triplet ($J=4,90$; 4,85 Hz)
6	1,28	2H, singlet	19	4,36	1H, triplet ($J=7,95$ Hz)
7	1,35	3H, singlet	20	4,52	1H, quintet ($J= 6,70$ Hz)
8	1,38	3H, doublet ($J=6,10$ Hz)	21	5,98	1H, singlet
9	1,40	5H, doublet ($J=6,75$ Hz)	22	5,99	1H, singlet
10	1,49	3H, singlet	23	7,45	1H, doublet ($J= 6,70$ Hz)
11	1,58	3H, singlet	24	7,46	1H, doublet ($J= 7,35$ Hz)
12	1,72	3H, singlet	25	13,08	1H, singlet
13	2,31	2H, doublet ($J= 4,90$ Hz)	26	13,14	1H, singlet

Pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C - NMR Senyawa Geu fh-10

^{13}C -NMR dan DEPT atom karbon (dalam $CDCl_3$, 125 MHz) spektrum ditampilkan pada (Lampiran 11 dan 12) diperoleh data pergeseran kimia 12 gugus metil ($-CH_3$) pada $\delta_C = 13,63$; 16,48; 16,87; 17,01; 20,18; 21,17; 24,02; 25,65; 25,68; 29,06; 29,19 dan 30,84 ppm. Memiliki 2 gugus metilen ($>CH_2$) pada pergeseran kimia $\delta_C = 26,06$; dan 26,12 ppm serta 12 gugus metin ($>CH-$) pada pergeseran kimia δ_C : 47,20; 47,22; 49,47; 49,57; 91,12; 91,78; 92,72; 92,79;

117,69 dan 134,23 ppm serta memiliki 26 karbon kuartener ($>C<$) pada pergeseran $\delta_C = 43,30; 43,54; 83,04; 83,11; 84,76; 84,90; 90,00; 91,12; 91,78; 92,72; 101,43; 112,57; 113,70; 133,76; 133,80; 135,28; 135,40; 156,11; 156,63; 166,28; 166,45; 168,38; 168,39; 178,96; 179,07$ dan 203,88 ppm. Memiliki 2 gugus karbonil keton yang terkelasi dengan gugus hidroksi membentuk ikatan hidrogen pada pergeseran kimia $\delta_C = 178,96; 179,07$ dan satu gugus karbonil yang bebas pada pergeseran kimia $\delta_C = 203,88$ ppm, juga memiliki 2 gugus hidroksi pada pergeseran kimia $\delta_C = 166,28; 166,45$ ppm dan ditujang oleh pergeseran kimia $^1H-NMR \delta_H = 13,08$ ppm (1H, s) dan 13,14 ppm (1H, s). Senyawa Geu fh-10 juga menunjukkan adanya 4 buah epoksi (C-O-) yang terikat pada C=C pada pergeseran kimia $\delta_C = 156,11; 156,63; 168,38; 168,39$ ppm.



Tabel. 4.4 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C - NMR dan DEPT senyawa Geu fh-10

No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT	No	^{13}C -NMR (δ ppm)	DEPT
1	13,63	CH ₃	26	84,90	C
2	16,48	CH ₃	27	90,95	C
3	16,87	CH ₃	28	91,00	C
4	17,01	CH ₃	29	91,12	CH
5	20,18	CH ₃	30	91,78	CH
6	21,17	CH ₃	31	92,72	CH
7	24,02	CH ₃	32	92,79	CH
8	25,65	CH ₃	33	101,43	C
9	25,68	CH ₃	34	112,57	C
10	26,06	CH ₂	35	113,70	C
11	26,12	CH ₂	36	117,69	2 CH
12	28,32	CH ₃	37	133,76	C
13	29,06	CH	38	133,80	C
14	29,19	CH ₃	39	134,23	2 CH
15	30,84	CH ₃	40	135,28	C
16	31,04	CH	41	135,40	C
17	43,30	C	42	156,11	C
18	43,54	C	43	156,63	C
19	47,20	CH	44	166,28	C
20	47,22	CH	45	166,45	C
21	49,47	CH	46	168,38	C
22	49,57	CH	47	168,39	C
23	83,04	C	48	178,96	C
24	83,11	C	49	179,07	C
25	84,76	C	50	203,88	C

Tabel. 4.5 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C - NMR , HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10.

No	^{13}C -NMR	HMQC	HMBC ($\delta^{13}\text{C}$, ppm)
	(δ , ppm)	($\delta^1\text{H}$, ppm)	
1	13,63	1,38 (3H, <i>d</i> , $J= 6,10$ Hz)	91,78; 43,54
2	16,48	1,27 (3H, <i>s</i>)	91,28; 43,30
3	16,87	1,06 (3H, <i>s</i>)	25,05; 25,68
4	17,01	1,04 (3H, <i>s</i>)	133,28; 117,69
5	20,18	1,49 (3H, <i>s</i>)	112,57; 91,78; 43,54; 28,32
6	21,17	1,16 (3H, <i>s</i>)	113,70; 91,12; 43,30; 24,02
7	24,02	1,58 (3H, <i>s</i>)	91,12; 43,30;
8	25,65	1,35 (3H, <i>s</i>)	133,80; 117,69
9	25,68	1,35 (3H, <i>s</i>)	133,80; 117,69
10	26,06	2,34 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	47,20; 47,22;84,70; 84,90;133,76; 133,80
11	26,12	2,31 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	47,20; 47,22;84,70; 84,90;133,76; 133,80
12	28,32	1,40 (5H, <i>d</i> , $J=4,90$ Hz)	112,57; 91,78; 43,54
13	29,06	1,27 (3H, <i>s</i> , $J= 6,70$ Hz)	
14	29,19	1,25 (6H, <i>s</i>)	84,04; 83,11; 49,47; 49,57
15	30,84	1,72 (3H, <i>s</i>)	84,04; 83,11; 49,47; 49,57; 29,19; 29,06
16	31,04	1,72 (3H, <i>s</i>)	91,78; 43,50
17	43,30		
18	43,54		
19	47,22	3,48 (2H, <i>t</i> , $J= 4,90; 4,85$)	49,47; 203,88;134,23
20	47,22	3,48 (2H, <i>t</i> , $J= 4,90; 4,85$)	49,47; 203,88;134,23
21	49,47	2,52 (1H, <i>t</i> , $J=8,55$ Hz)	49,47; 49,57; 29,19; 29,06; 135,40; 203,88
22	49,57	2,53 (1H, <i>t</i> , $J=8,55$ Hz)	49,47; 49,57; 29,19; 29,06; 135,40; 203,88
23	83,04		
24	83,11		
25	84,7		
26	84,9		
27	90,95		
28	91,00		
29	91,12	4,36 (1H, <i>t</i> , $J= 7,95$ Hz)	24,02; 21,17; 16,87
30	91,78	4,52 (1H, <i>t</i> , $J= 6,70$ Hz)	112,57; 28,32; 20,18

Lanjutan Tabel 4.5

No	¹³ C-NMR (δ ppm)	HMQC (δ^1 H, ppm)	HMBC (δ^{13} C, ppm)
31	92,72	5,99 (1H, <i>s</i>)	166,28; 166,45; 168,38; 101,43; 112,57
32	92,79	5,98 (1H, <i>s</i>)	166,45; 168,39; 101,43; 112,57
33	101,43		
34	112,57		
35	113,70		
36	117,69	4,34 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6,75 Hz); 4,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6,75 Hz)	21,17; 24,02; 16,87; 25,65
37	133,76		
38	133,80		
39	134,23	7,45 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,70 Hz), 7,46 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,35 Hz)	203,88; 179,07; 178,96; 47,20; 47,22; 91,00; 90,95
40	135,28		
41	135,40		
42	156,11		
43	156,63		
44	166,28		
45	166,45		
46	168,38		
47	168,39		
48	178,96		
49	179,07		
50	203,88		
51		13,08 (1H, <i>s</i>), OH	92,72; 101,43; 166,28
52		13,14 (1H, <i>s</i>), OH	92,79; 101,43; 166,45

Berdasarkan hasil pengukuran spektroskopi UV-Vis yang menunjukkan adanya kerangka xanton diperkuat oleh hasil IR yang menunjukkan adanya epoksi dan karbonil terkonyugasi serta karbonil tidak terkonyugasi. Hal ini diperkuat pula oleh data ¹³C NMR yaitu pada pergeseran kimia (δ_C =178,96 ppm) adalah satu karbonil terkelasi dengan gugus OH yang membentuk ikatan hidrogen.

Berdasarkan hasil pengukuran spektroskopi ¹H-NMR dan ¹³C-NMR jumlah atom karbon, atom hidrogen ditambah gugus OH, C=O dan -O- diperoleh (12 CH₃ + 2 CH₂ + 12 CH + 26 C + 2 OH + 3 C=O dan 4 C-O-), 52

atom C, 54 atom H dan 9 atom O sehingga rumus molekul $C_{52}H_{54}O_9$ massanya $(52 \times 12) + 54 + 16 \times 9 = 822$, sedangkan dari hasil LC-MS menunjukkan satu puncak kromatogram yang massanya adalah 464, jadi kelebihan massa sebesar $822 - 464 = 358$. Hasil pengamatan pergeseran kimia proton dan karbon banyak angka-angka pergeseran kimia sangat mirip atau dekat (Tabel 4.5). Hal ini dapat diperkirakan bahwa senyawa Geu fh-10 adalah merupakan dua senyawa yang berisomer, berbeda struktur molekulnya. Hasil penelusuran pustaka dan prediksi Chem Draw serta hasil penelitian Thoison, et al., (2000) kristal yang berwarna kuning dengan berat molekul 464 dan memiliki titik leleh antara $191-192^\circ\text{C}$, adalah isobractatin (39).

Dari Tabel 4.5 dapat diprediksi 2 senyawa Geu fh-10 A dan Geu fh-10 B yang masing-masing dapat dibuat tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C -NMR, HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10 pada Tabel 4.6 dan 4.7 berikut:

Tabel 4.6 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C - NMR, HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10 A.

No	^{13}C -NMR (δ ppm)	HMQC ($\delta^1\text{H}$, ppm)	HMBC ($\delta^{13}\text{C}$, ppm)
1	166,28		
2	92,72	5,99 (1H, <i>s</i>)	166,28; 168,38; 101,43; 112,57
3	168,38		
4	112,57		
4a	156,11		
5	84,70		
6	203,88		
7	47,20	3,48 (2H, <i>t</i> , $J= 4,90; 4,85$ Hz)	49,47; 203,88; 134,23 203,88; 179,07; 47,20; 91,00
8	134,23	7,46 (1H, <i>d</i> , $J = 7,35$ Hz)	
8a	135,28		
9	179,07		
9a	101,43		
10a	91,00		
11	43,54		
12	91,78	4,52 (1H, <i>t</i> , $J= 6,70$ Hz)	112,57; 28,32; 20,18
13	13,63	1,38 (3H, <i>d</i> , $J= 6,10$ Hz)	91,78; 43,54
14	20,18	1,49 (3H, <i>s</i>)	112,57; 91,78; 43,54; 28,32
15	28,32	1,40 (5H, <i>d</i> , $J=6,75$ Hz)	112,57; 91,78; 43,54
16	26,12	2,31 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	47,22; 84,70; 133,76
17	117,69	4,34 (1H, <i>t</i> , $J= 6,75$ Hz)	16,87; 25,65
18	133,76		
19	25,68	1,35 (3H, <i>s</i>)	133,80; 117,69
20	16,87	1,06 (3H, <i>s</i>)	25,05; 25,68
21	26,06	2,34 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	47,20; 84,70; 133,76
22	49,47	2,52 (1H, <i>t</i> , $J=8,55$ Hz)	29,19; 135,40; 203,88
23	83,04		
24	29,19	1,25 (3H, <i>s</i>)	83,04; 49,47
25	30,84	1,72 (3H, <i>s</i>)	83,04; 49,47; 29,19
26		13,08 (OH, <i>s</i>)	92,72; 101,43; 166,28

Pergeseran kimia H (δ_H , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (dalam CDCl_3 , 500 MHz) Tabel 4.6 menunjukkan adanya 6 metil singlet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,06 (3H, *s*); 1,25 (6H, *s*); 1,28 (3H, *s*); 1,35 (3H, *s*); 1,49 (4H, *s*); 1,72 (3H, *s*), sebuah metil doublet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,40 (5H, *d*, $J=6,75$ Hz); serta terdapat 2 buah gugus metilen ($> \text{CH}_2$), pada pergeseran kimia H (δ_H , ppm); 2,31 (2H, *d*, $J=4,90$ Hz); 2,43 (2H, *d*, $J=4,90$ Hz), Senyawa Geu fh-10.A juga menunjukkan adanya 5 gugus metin pada pergeseran kimia H (δ_H , ppm); 2,52 (1H, *t*, $J=8,55$ Hz); 3,48 (1H, *t*, $J=4,90$ Hz); 4,52 (1H, *t*, $J=6,70$ Hz); 5,99 (1H, *s*) dan 7,46 (1H, *d*, $J=7,35$ Hz). Sebuah proton pergeseran kimia H (δ_H , ppm); 5,99 (1H, *s*) merupakan proton pada gugus benzen yang mengalami *shielding* akibat adanya pengayaan elektron oleh gugus hidroksi yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil.

Pergeseran kimia karbon C (δ_C , ppm) $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa Geu fh-10. A $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT atom karbon (dalam CDCl_3 , 125 MHz) diperoleh data pergeseran kimia 7 gugus metil ($-\text{CH}_3$) pada $\delta_C = 13,63; 16,87; 20,18; 25,68; 29,06; 29,19; \text{ dan } 30,84$. Memiliki 2 gugus metilen ($> \text{CH}_2$) pada pergeseran kimia $\delta_C = 26,06; \text{ dan } 26,12$ ppm serta 6 gugus metin ($> \text{CH-}$) pada pergeseran kimia $\delta_C : 47,20; 49,47; 91,78; 92,72; 117,69 \text{ dan } 134,23$ ppm serta memiliki 13 karbon kuartener ($> \text{C}<$) pada pergeseran $\delta_C = 43,54; 83,04; 84,70; 91,00; 91,78; 92,72; 101,43; 112,57; 133,76; 135,28; 156,11; 166,28; 168,38; 179,07$ dan 203,88 ppm. Memiliki sebuah gugus karbonil keton yang terkelasi dengan gugus hidroksi membentuk ikatan hidrogen pada pergeseran kimia $\delta_C = 179,07$ dan satu gugus karbonil yang bebas pada pergeseran kimia $\delta_C = 203,88$ ppm, juga memiliki sebuah gugus hidroksi pada pergeseran kimia $\delta_C = 166,28$ ppm dan ditumpang oleh pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ $\delta_H = 13,08$ ppm (1H, *s*). Senyawa Geu fh-10.A juga menunjukkan adanya 2 buah epoksi (C-O-) yang terikat pada C = C pada pergeseran kimia $\delta_C = 156,11; 168,38$ ppm.

Tabel 4.7 Tabulasi pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) ^{13}C - NMR, HMQC dan HMBC senyawa Geu fh-10 B.

No	^{13}C -NMR (δ ppm)	HMQC ($\delta^1\text{H}$, ppm)	HMBC ($\delta^{13}\text{C}$, ppm)
1	166,45		
2	92,79	5,98 (1H, <i>s</i>)	166,45; 168,39; 101,43; 112,57
3	168,39		
4	113,70		
4a	156,63		
5	84,90		
6	203,88		
7	47,22	3,48 (2H, <i>t</i> , $J= 4,90$; 4,85)	49,47; 203,88; 134,23
8	134,23	7,45 (1H, <i>d</i> , $J= 6,70$ Hz)	203,88; 178,96; 47,22; 90,95
8a	135,40		
9	178,96		
9a	101,43		
10a	90,95		
11	43,30		
12	91,12	4,36 (1H, <i>t</i> , $J= 7,95$ Hz)	24,02; 21,17
13	16,48	1,27 (3H, <i>d</i> , $J= 6,75$ Hz)	91,12; 43,30
14	24,02	1,58 (3H, <i>s</i>)	91,12; 43,30
15	21,17	1,16 (3H, <i>s</i>)	113,70; 91,12; 43,30; 24,02
16	26,12	2,31 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	84,90; 133,80
17	117,69	4,36 (1H, <i>t</i> , $J= 6,75$ Hz)	17,01; 25,65
18	133,80		
19	25,65	1,35 (3H, <i>s</i>)	133,80; 117,69
20	17,01	1,04 (3H, <i>s</i>)	133,80; 117,69
21	26,06	2,34 (1H, <i>d</i> , $J= 4,90$ Hz)	47,22; 83,11; 133,80
22	49,57	2,53 (1H, <i>t</i> , $J= 8,55$ Hz)	29,06; 135,40; 203,88
23	83,11		
24	29,06	1,25 (3H, <i>s</i>)	83,11; 49,57
25	31,04	1,72 (3H, <i>s</i>)	49,57; 83,11
26		13,14 (OH, <i>s</i>)	92,79; 101,43; 166,45

Pergeseran kimia H (δ_H , ppm) $^1\text{H-NMR}$ (dalam CDCl_3 , 500 MHz) senyawa Geu fh-10. B dari Tabel 4.7 menunjukkan adanya 6 metil singlet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,04 (3H, *s*); 1,16 (3H, *s*); 1,25 (6H, *s*); 1,27 (3H, *d*, $J=6,75$ Hz); 1,28 (3H, *s*); 1,72 (3H, *s*), sebuah metil doublet pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 1,27 (3H, *d*, $J=6,75$ Hz); serta terdapat 2 buah gugus metilen ($> \text{CH}_2$), pada pergeseran kimia (δ , ppm); 2,31 (2H, *d*, $J=4,90$ Hz); 2,34 (2H, *d*, $J=4,90$ Hz), Senyawa Geu fh-10.B juga menunjukkan adanya 6 gugus metin pada pergeseran kimia (δ_H , ppm); 2,52 (1H, *t*, $J=8,55$ Hz); 2,53 (1H, *t*, $J=8,55$ Hz); 3,48 (1H, *t*, $J=4,90$ Hz); 4,36 (1H, *t*, $J=7,95$ Hz); 5,98 (1H, *s*) dan 7,45 (1H, *d*, $J=6,70$ Hz). Sebuah proton pergeseran kimia (δ , ppm); 5,98 (1H, *s*); merupakan proton pada gugus benzen yang mengalami *shielding* akibat adanya pengayaan elektron oleh gugus hidroksi yang membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karbonil.

Pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa Geu fh-10.B $^{13}\text{C-NMR}$ dan DEPT atom karbon (dalam CDCl_3 , 125 MHz) Tabel 4.9 diperoleh data pergeseran kimia 7 gugus metil ($-\text{CH}_3$) pada $\delta_C = 17,01$; 21,17; 24,02; 25,65; 29,06 dan 31,04 ppm. Memiliki 2 gugus metilen ($> \text{CH}_2$) pada pergeseran kimia $\delta_C = 26,06$; dan 26,12 ppm serta 6 gugus metin ($> \text{CH-}$) pada pergeseran kimia δ_C : 47,22; 49,57; 91,12; 92,79; 117,69 dan 134,23 ppm serta memiliki 13 karbon kuartener ($> \text{C}<$) pada pergeseran $\delta_C = 43,30$; 83,11; 84,90; 90,95; 101,43; 113,70; 133,80; 135,40; 156,63; 166,45; 168,39; 178,96; dan 203,88 ppm. Memiliki 1 gugus karbonil keton yang terkelasi dengan gugus hidroksi membentuk ikatan hidrogen pada pergeseran kimia $\delta_C = 178,96$; dan satu gugus karbonil yang bebas pada pergeseran kimia $\delta_C = 203,88$ ppm, juga memiliki 1 gugus hidroksi pada pergeseran kimia $\delta_C = 166,45$ ppm dan ditujang oleh pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ $\delta_H = 13,14$ ppm (1H, *s*). Senyawa Geu fh-10. B juga menunjukkan adanya 2 buah epoksi (C-O-) yang terikat pada C=C pada pergeseran kimia $\delta_C = 156,63$; 168,39 ppm.

Untuk menentukan jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap yang membentuk senyawa Geu fh-10. A dan Geu fh-10. B, maka digunakan rumus indeks kekurangan hidrogen, sebagai berikut :

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

Dimana : F = jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap

X = jumlah atom tetravalen, misal : C, Si

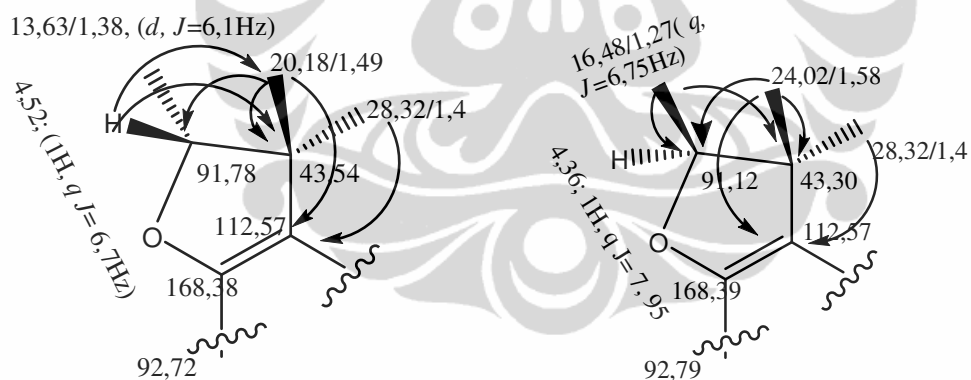
Y = jumlah atom monovalen, misal : H, Cl, Br, F

Z = jumlah atom trivalen, misal : N, P

$$\text{Jadi } F = 28 - (0,5 \times 32) + (0,5 \times 0) + 1 = 28 - 16 + 1 = 13$$

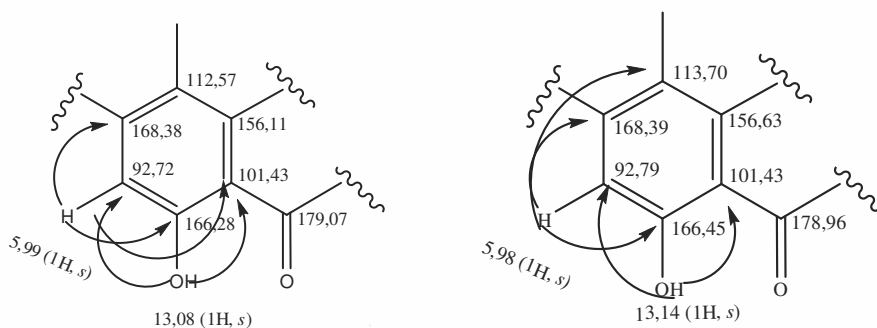
Hasil perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa Geu fh-10 mempunyai jumlah cincin dan (atau) ikatan rangkap sebanyak 13 (7 ikatan rangkap dan 6 buah cincin).

Dari Tabel 4.5 dapat dibuat beberapa penggalan dari senyawa Geu fh-10. A dan Geu fh-10. B.



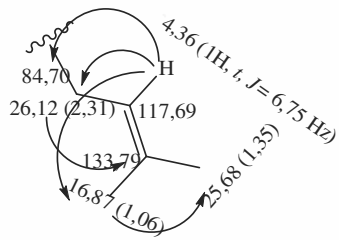
Penggalan 1.A

Penggalan 1. B

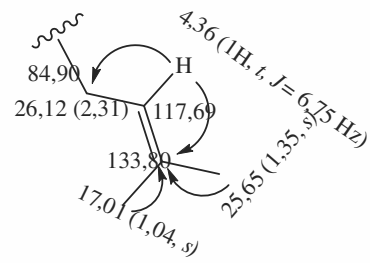


Penggalan 2. A

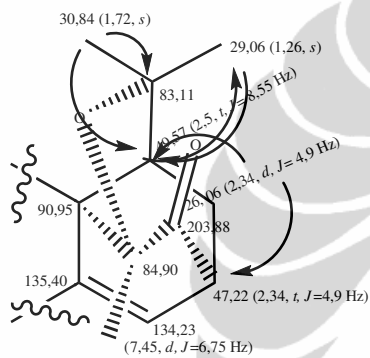
Penggalan 2. B



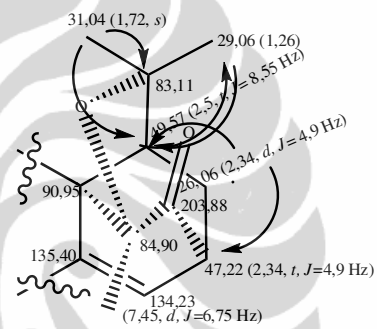
Penggalan 3. A



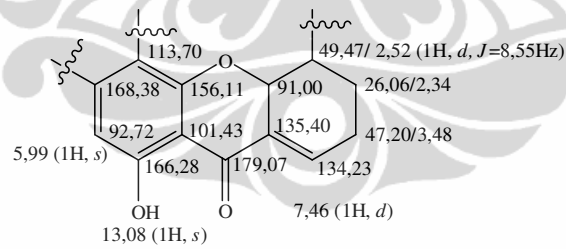
Penggalan 3. B



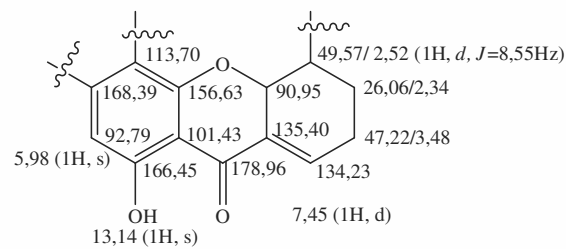
Penggalan 4. A



Penggalan 4. B

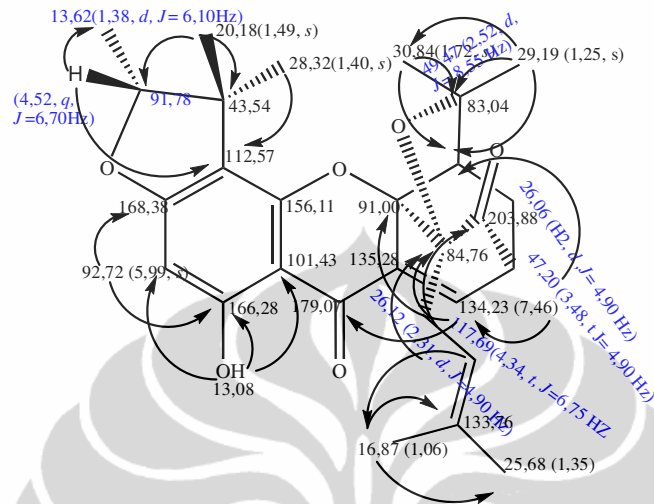


Penggalan 5. A

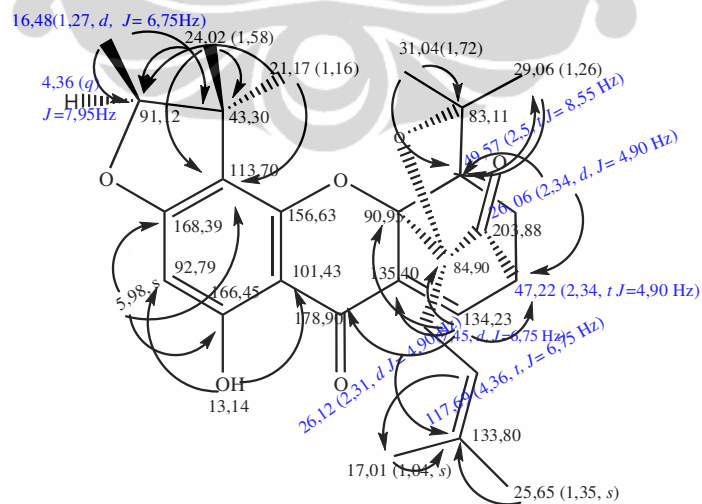


Penggalan 5. B

Apabila penggalan-penggalan struktur molekul Geu fh-10 digabungkan maka akan diperoleh struktur molekul yang lengkap seperti berikut ini



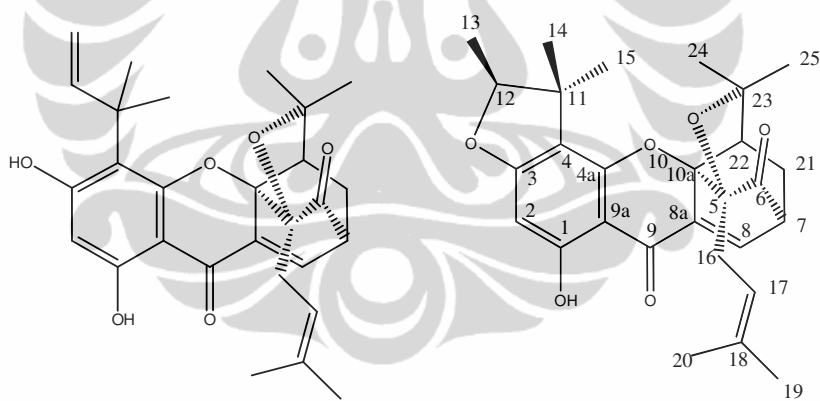
Struktur molekul senyawa Geu fh-10. A



Struktur molekul senyawa Geu fh-10. B

Senyawa yang terisolasi diduga adalah struktur isobractatin, senyawa Geu fh-10 A pergeseran kimia ^{13}C NMR (δ ppm) pada karbon nomor 13 mempunyai nilai yang mirip dengan nilai pergeseran kimia ^{13}C NMR (δ ppm) pada isobractatin, sedangkan pergeseran kimia ^{13}C NMR (δ ppm) karbon nomor 13 pada senyawa Geu fh-10 B berbeda dengan isobractatin hal ini kemungkinan diakibatkan oleh posisi atom C nomor 13, untuk senyawa Geu fh-10 A posisinya menjauhi pengamat, sedangkan untuk senyawa Geu fh-10 B posisinya mendekati pengamat. Senyawa Geu fh-10 A berisomer dengan senyawa Geu fh-10 B.

Struktur molekul senyawa Geu fh-10 tersebut identik dengan *isobractatin*, apabila dibandingkan pergeseran kimia ^{13}C NMR (δ ppm) senyawa Geu fh-10 dengan *isobractatin* (Thoison, 2000) sebagian besar mempunyai nilai pergeseran kimia yang sama.



Bractatin

Isobractatin

Tabel 4.8 Perbandingan pergeseran kimia karbon (δ_C , ppm) senyawa Geu fh-10.A dan Geu fh-10.B dengan *isobractatin* (Thoison, 2000)

No	^{13}C NMR (δ ppm) (CDCl_3 , 125 MHz)		
	Senyawa		
	Geu fh-10.A	<i>Isobractatin</i>	Geu fh-10.B
1	166,28	166,2	166,45
2	92,72	92,6	92,79
3	168,38	168,5	168,39
4	112,57	113,6	113,70
4a	156,11	156	156,63
5	84,70	84,6	84,90
6	203,88	203,7	203,88
7	47,20	47,1	47,22
8	134,23	134,3	134,23
8a	135,28	135,3	135,40
9	179,07	178,9	178,96
9a	101,43	101,4	101,43
10a	91,00	90,9	90,95
11	43,54	43,2	43,30
12	91,78	91	91,12
13	13,63	13,5	16,48
14	20,18	24	24,02
15	28,32	21,1	21,17
16	26,12	29	26,12
17	117,69	117,6	117,69
18	133,76	133,7	133,80
19	25,68	25,6	25,65
20	16,87	17	17,01
21	26,06	26	26,06
22	49,47	49,4	49,57
23	83,04	83,2	83,11
24	29,19	29,1	29,06
25	30,84	30,8	31,04

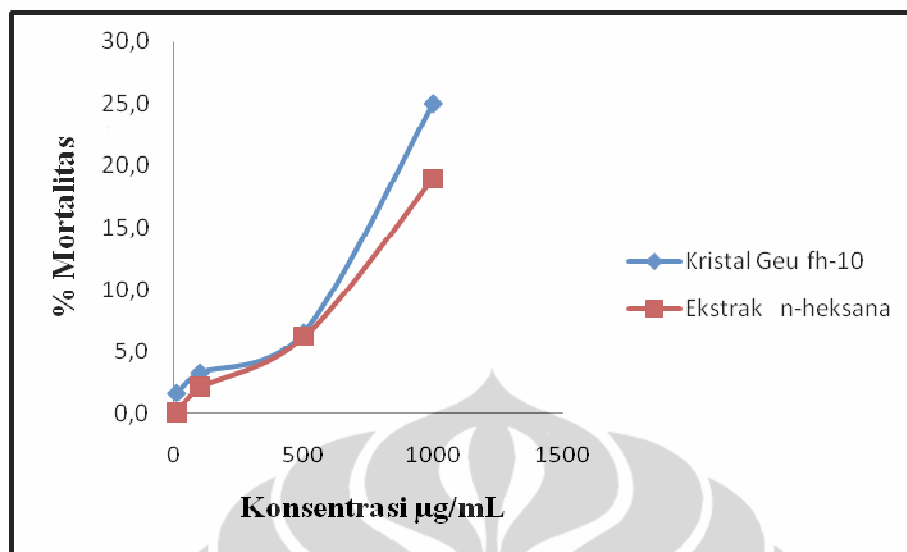
4.2 Hasil Uji Aktivitas Biologi

4.3.1 Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji BSLT hanya dilakukan untuk esktak *n*-heksana dan senyawa murni Geu fh-10, sebagai kontrol dipergunakan air laut yang tidak ditambahkan sampel, metode uji toksisitas ini dilakukan karena biayanya murah dan hasilnya dapat dipercaya. Pada uji ini diamati adalah tingkat mortalitas yang disebabkan oleh senyawa uji. Menurut Mayer, at al., 1992, senyawa yang aktif akan menghasilkan mortalitas yang tinggi, senyawa dengan $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ dikatakan bersifat aktif, semakin kecil nilai LC_{50} nya maka senyawa tersebut dikatakan semakin aktif.

Tabel 4.9 Analisa hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sampel	Konsentrasi (K), ($\mu\text{g/mL}$)	Log K	Mati	Hidup	Akumulasi		Mortalitas	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
					Mati	Hidup		
Kontrol			0	30	0	125	0,00	
			0	32	0	95	0,00	
			0	31	0	63	0,00	
			0	32	0	32	0,00	
Kristal Geu fh- 10	10	1,00	2	28	2	116	1,69	2.146,58
	100	2,00	1	31	3	88	3,30	
	500	2,70	1	30	4	57	6,56	
	1000	3,00	5	27	9	27	25,00	
Eksrak <i>n</i> -heksana	10	1,00	0	31	0	123	0,00	1.363,40
	100	2,00	2	31	2	92	2,13	
	500	2,70	2	31	4	61	6,15	
	1000	3,00	3	27	7	30	18,92	
	2000	3,301	28	3	35	3	92,11	



Gambar 4.3 Kurva hasil uji BSLT ekstrak *n*-heksana dan kristal Geu fh- 10

Pada Tabel 4.9 terlihat bahwa semua larva udang pada sampel kontrol tidak ada yang mati, hal ini berarti air laut yang dipergunakan dalam keadaan baik. Hasil analisa BSLT diperoleh LC_{50} yang sangat besar yaitu untuk senyawa Geu fh-10 $LC_{50} = 2.146,58 \mu\text{g/mL}$, sedangkan untuk ekstrak *n*-heksana $LC_{50} = 1.363,4 \mu\text{g/mL}$, sehingga dapat dikatakan baik senyawa Geu fh-10 maupun ekstrak *n*-heksana tidak toksik terhadap larva udang karena LC_{50} -nya lebih dari 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.3.2 Uji Aktivitas Antioksidan

4.3.2.1 Uji Awal Aktivitas Antioksidan

Hasil ekstraksi *n*-heksana dan metanol, dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode *radical scavenger*. Sebagai pembanding digunakan kontrol dari senyawa antioksidan *quercetin*. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 515 nm, setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C.

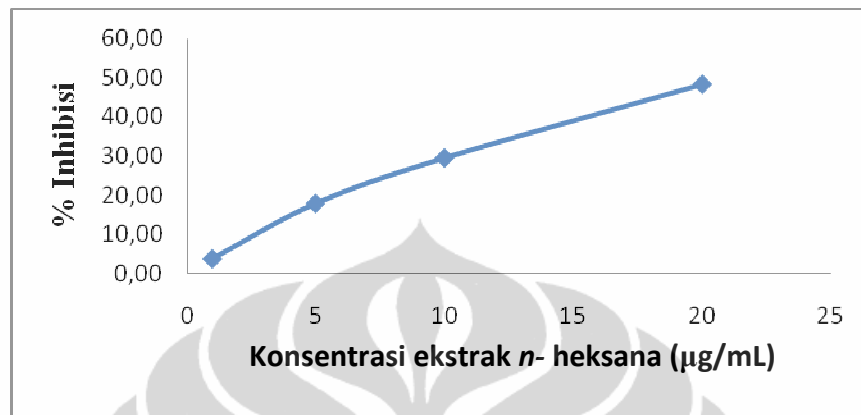
4.3.2.2 Hasil Analisis Aktivitas Antioksidan ekstrak *n*-heksana

Pengukuran absorbansi ekstrak *n*-heksana dilakukan pada konsentrasi 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL dan 20 µg/mL. Data hasil pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 515 nm untuk ekstrak *n*-heksana dapat dilihat pada Tabel. 4.10.

Tabel. 4.10 Data analisa hasil uji antioksidan ekstrak dan isolat murni.

No	Sampel	Absorbansi ($\lambda = 515$ nm)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	Kontrol	2,896			
2	F <i>n</i> -Heksana	1,494	20	48,41	20,01
3		2,039	10	29,59	
4		2,376	5	17,96	
5		2,785	1	3,83	
6		F Metanol	0,258	20	
7	0,809		10	72,06	
8	1,405		5	51,48	
9	2,073		1	28,42	
10	Kristal Geu fh- 10	2,273	20	21,51	86,44
11		2,358	10	18,58	
12		2,448	5	15,47	
13		2,498	1	13,74	
14	<i>Quercetin</i>	0,164	20	94,34	10,10
15		1,404	10	51,52	
16		2,193	5	24,27	
17		2,604	1	10,08	

Aktivitas sebagai *radical scavenger* ekstrak *n*-heksana dapat dilihat pada Gambar 4.4 berikut:



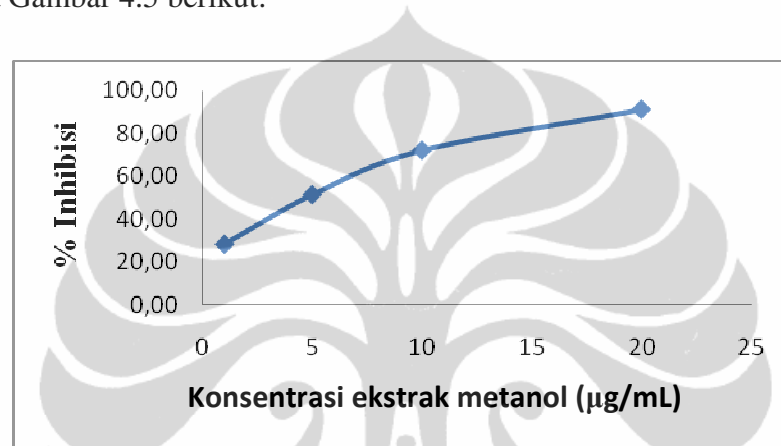
Gambar. 4.4 Kurva persen inhibisi terhadap konsentrasi ekstrak *n*-heksana

Dari Gambar 4.4 dapat diketahui bahwa dengan penambahan konsentrasi ekstrak *n*-heksana dapat menaikkan % inhibisi DPPH. Kenaikan % inhibisi ini mempunyai arti bahwa telah terjadi penangkapan radikal bebas pada DPPH oleh ekstrak *n*-heksana. Penangkapan radikal bebas tersebut mengakibatkan warna diazo pada DPPH berkurang, karena ikatan rangkap terkonyugasi semakin panjang, sehingga terjadi kenaikan % inhibisi, yang disebabkan oleh menurunnya absorbansi. Pengujian setelah diinkubasi selama 30 menit terjadi kenaikan % inhibisi yang tidak signifikan pada penambahan ekstrak *n*-heksana sebanyak 20 µg/mL. Hal ini terlihat pada gambar yang menunjukkan adanya kenaikan % inhibisi tidak begitu tajam.

Suatu senyawa dikatakan antioksidan jika bertindak sebagai donor hidrogen ataupun akseptor elektron. Pemberian atom hidrogen oleh suatu antioksidan yang bertindak sebagai donor proton merupakan tahap awal mekanisme antioksidan melalui penangkap radikal (*radical scavenger*). Sampel uji ekstrak *n*-heksana dapat bertindak sebagai donor hidrogen, karena dapat mengurangi warna pada DPPH. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak kasar *G. Eugenifolia* Wall (ekstrak *n*-heksana) mempunyai aktivitas antioksidan, yang dalam hal ini merupakan *radical scavenger* (penangkap radikal), dengan $IC_{50} = 20,01 \mu\text{g/mL}$, lebih lemah dibandingkan dengan standar.

4.3.2.3 Hasil Analisa Aktivitas Antioksidan ekstrak metanol

Seperti yang dilakukan pada sampel ekstrak *n*-heksana, pengukuran absorbansi sampel ekstrak metanol pada konsentrasi 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL dan 20 µg/mL yang masing – masing ditambahkan ke dalam DPPH sebagai substratnya. Data hasil pengukuran absorbansi sampel ekstrak metanol dapat dilihat pada Gambar 4.5 berikut:

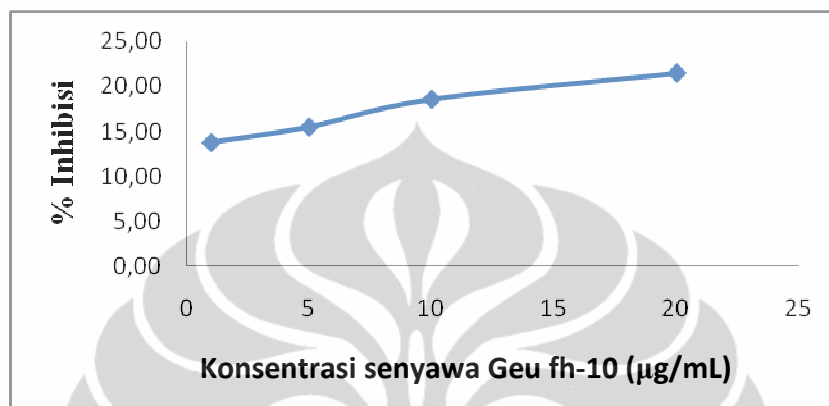


Gambar 4.5 Kurva hasil analisis aktivitas antioksidan ekstrak metanol dengan metode *Radical Scavenger*.

Pada Gambar 4.5 dapat diketahui bahwa meningkatnya konsentrasi ekstrak metanol dapat menaikkan % inhibisi DPPH. Kenaikan % inhibisi ini mempunyai arti bahwa telah terjadi penangkapan radikal bebas pada DPPH oleh ekstrak metanol. Dengan penangkapan radikal bebas tersebut mengakibatkan warna diazo pada DPPH berkurang sehingga terjadi kenaikan % inhibisi, yang diakibatkan oleh menurunnya absorbansi. Pada waktu pengujian selama 30 menit terjadi kenaikan % inhibisi yang signifikan pada penambahan ekstrak metanol sebanyak 20 µg/mL. Hal ini terlihat jelas pada gambar yang menunjukkan adanya kenaikan % inhibisi secara tajam. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak kasar *G. eugenifolia* Wall (ekstrak metanol) mempunyai aktivitas antioksidan, yang dalam hal ini merupakan *radical scavenger* (penangkap radikal), dengan $IC_{50} = 5,61$ µg/mL, dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol *G. eugenifolia* Wall sangat aktif sebagai antioksidan.

4.3.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap isolat murni

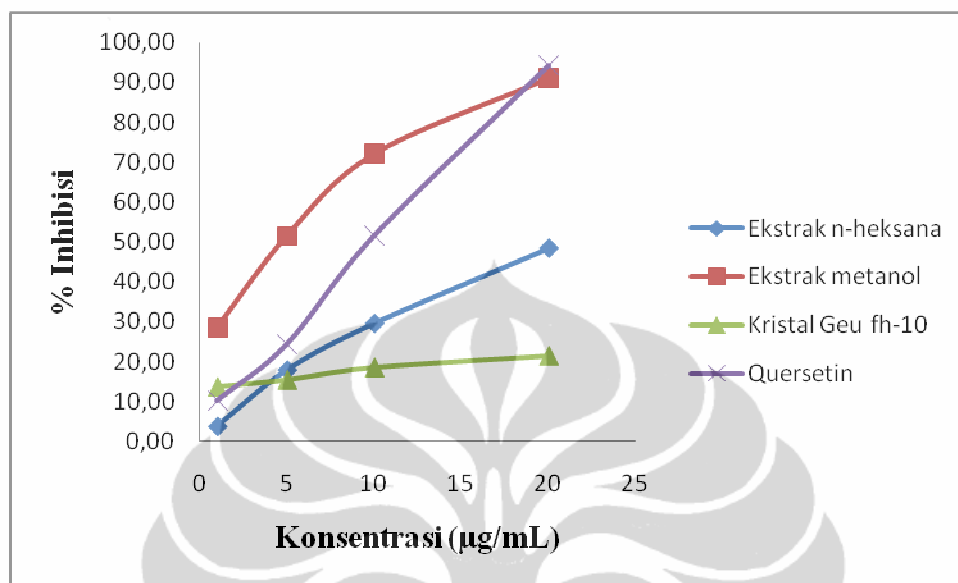
Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap isolat Geu fh-10



Gambar. 4.6 Kurva persen inhibisi dan konsentrasi uji antioksidan senyawa Geu fh- 10

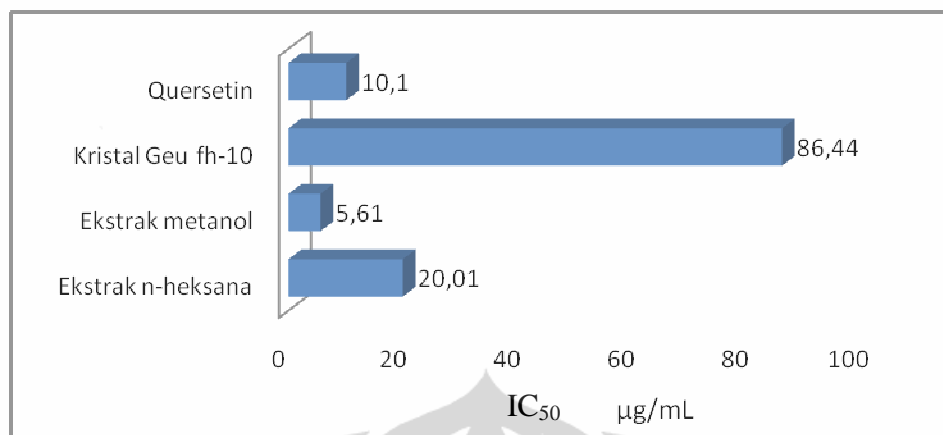
Dari Gambar 4.6 dapat diketahui bahwa meningkatnya penambahan konsentrasi Geu fh-10 dapat menaikkan % inhibisi DPPH. Kenaikan % inhibisi ini mempunyai arti bahwa telah terjadi penangkapan radikal bebas pada DPPH. Penangkapan radikal bebas tersebut mengakibatkan warna diazo pada DPPH berkurang sehingga terjadi kenaikan % inhibisi, yang diakibatkan oleh menurunnya absorbansi. Pada waktu pengujian selama 30 menit terjadi kenaikan % inhibisi yang kurang signifikan pada penambahan konsentrasi senyawa Geu fh-10 sebanyak 20 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini terlihat pada grafik yang menunjukkan adanya kenaikan % inhibisi kurang tajam, dengan demikian dapat dikatakan bahwa kristal Geu fh-10 mempunyai aktivitas antioksidan, tetapi kurang aktif karena lebih besar dari pada standar yang dipergunakan yaitu *quercetin* yang dalam hal ini merupakan *radical scavenger* (penangkap radikal), senyawa Geu fh-10 dengan $\text{IC}_{50} = 86,44 \mu\text{g/mL}$, lebih besar dari standar yang memiliki $\text{IC}_{50} = 10,10 \mu\text{g/mL}$.

Hasil analisis aktivitas antioksidan sampel ekstrak *n*-heksana, ekstrak metanol, dan kristal Geu fh-10 dibandingkan dengan standar *quercetin*.



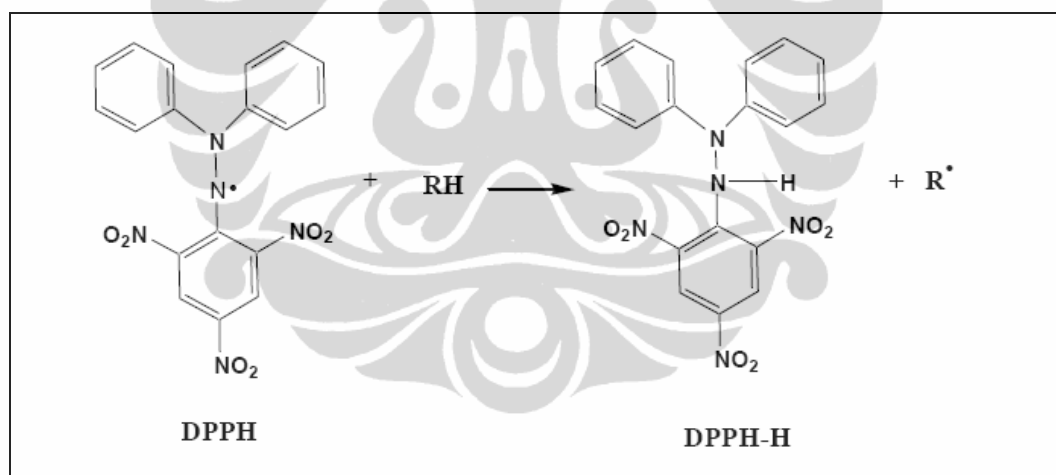
Gambar 4.7 Kurva hasil analisis aktivitas antioksidan dengan metode *Radical scavenger*.

Pada Gambar 4.7 terlihat bahwa ekstrak metanol memiliki % inhibisi yang lebih besar karena terjadi perubahan yang cukup tajam pada konsentrasi 1-10 µg/mL, IC_{50} ekstrak metanol adalah 5,61 µg/mL, lebih kecil dari pada IC_{50} *quercetin* yang $IC_{50} = 10,10$ µg/mL, jika dibandingkan dengan IC_{50} ekstrak *n*-heksana, IC_{50} ekstrak metanol dapat dikatakan empat kali lebih kecil dari IC_{50} *n*-heksana, hal ini ditunjukkan oleh perubahan % inhibisi pada konsentrasi kecil ekstrak metanol. Ekstrak metanol memiliki % inhibisi yang lebih besar dari standar, tetapi % inhibisi ekstrak *n*-heksana terlihat lebih kecil dari pada % inhibisi standar, baik pada konsentrasi awal maupun setelah dinaikkan menjadi 20 µg/mL. Analisis data pengukuran absorbansi diperoleh hasil % inhibisi sebagaimana yang tercantum pada Tabel 4.10. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode *radical scavenger* ini dapat menunjukkan IC_{50} untuk tiap – tiap sampel dan senyawa *quercetin* sebagai antioksidan pembanding ditampilkan pada Gambar 4.8. Besarnya IC_{50} dihitung secara teoritis dengan menggunakan rumus (3.1) seperti yang tercantum pada BAB 3 halaman 41.



Gambar. 4.8 IC₅₀ hasil uji antioksidan

Pemudaran warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-2 pikrilhidrazin)



Gambar. 4.9 Reaksi reduksi DPPH

4.3.3 Hasil Uji Antikanker *in-vitro* dengan sel *Breast cancer* (T47D)

Uji anti kanker hanya dilakukan pada senyawa murni Geu fh-10. Metode uji antikanker yang digunakan berdasarkan metode SRB (Sulforhodamin B) Intensitas warna yang dihasilkan diukur dengan menggunakan ELISA plate reader pada panjang gelombang 515 nm. Persen viabilitas dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\frac{\text{OD (sel + sampel)} - \text{OD (kontrol negatif)}}{\text{OD (sel) - OD (kontrol negatif)}} \times 100 \% = \% \text{ Viabilitas} \quad (3.2)$$

OD = Optical Density

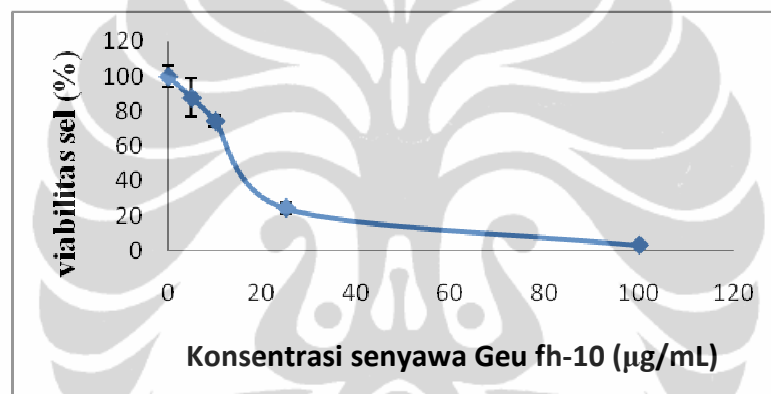
Sedangkan IC_{50} dihitung dengan cara analisis regresi nonlinier antara persen viabilitas dan konsentrasi (Skehan, et al., 1990).

Tabel 4.11 Hasil analisis uji anti kanker *in-vitro* dengan sel T47D

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	log Konsentrasi	Rata-rata % Sel hidup	SD	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	100	2	3,10	0,53	17
2	25	1,40	24,47	3,17	
3	10	1	74,38	3,02	
4	5	0,70	87,77	11,00	
5	0	0	100,00	5,98	

Hasil uji anti kanker *in-vitro* dengan sel T47D pada Tabel 4.11 menunjukkan penurunan rata-rata sel hidup dengan naiknya konsentrasi sampel, semakin kecil konsentrasi sampel semakin besar rata-rata persentasi sel hidup dan hasil perhitungan IC_{50} nya menunjukkan angka yang cukup sebagai anti kanker. Sebagai standar digunakan *doxorubicin*, IC_{50} *doxorubicin* = 16 $\mu\text{g/mL}$.

Suatu senyawa dinyatakan aktif dan memiliki potensi besar untuk dijadikan obat kanker apabila IC_{50} -nya kurang dari $20 \mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang cukup kecil sudah mampu menghambat 50 % pertumbuhan dari sel kanker, kristal Geu fh-10 yang memiliki $IC_{50}=17 \mu\text{g/mL}$, dapat dikatakan memiliki aktivitas antikanker untuk kanker payudara (T47D).



Gambar. 4.10 Kurva hasil uji anti kanker T47D dari kristal Geu fh- 10

Grafik hasil uji anti kanker pada Gambar 4.10 antara konsentrasi sampel dengan % viabilitas sel berbanding terbalik, semakin besar konsentrasi semakin kecil % viabilitas sel, sebaliknya semakin kecil konsentrasi sampel semakin besar persentasi viabilitas sel, pada perubahan konsentrasi dari $10 \mu\text{g/mL}$ s.d $25 \mu\text{g/mL}$ terjadi penurunan rata-rata % sel hidup yang cukup signifikan yaitu 74,38 % menjadi 24,47 %, hal ini menggambarkan bahwa terjadi penurunan % viabilitas sel yang signifikan.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diuraikan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Dari ekstrak *n*- heksana kulit batang *G. eugenifolia* Wall berhasil diisolasi dua senyawa Geu fh-9 dan Geu fh-10.
- Senyawa Geu fh- 9 berwarna putih berbentuk kristal rumus molekulnya $C_{29}H_{48}O$, yang diperoleh dari fraksi 2 (24- 30) yaitu perbandingan *n*-heksana : etil asetat (95:5), senyawa ini identik dengan stigmasterol diperoleh sebanyak 125 mg (0,005 %).
- Senyawa Geu fh -10 berwarna kuning berbentuk kristal rumus molekulnya $C_{28}H_{32}O_6$, yang diperoleh dari fraksi 3 (31-35) yaitu pada perbandingan *n*-heksana : etil asetat (85:15), senyawa ini identik dengan *isobractatin* diperoleh sebanyak 754 mg (0,03 %).
- Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH senyawa Geu fh-10 memiliki nilai $IC_{50} = 86,44 \mu\text{g/mL}$. Dinyatakan tidak aktif dibandingkan dengan *quercetin* yang memiliki $IC_{50} = 10,10 \mu\text{g/mL}$.
- Hasil uji anti kanker menggunakan sel T47D metode SRB senyawa Geu fh-10 memiliki $IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$, sedangkan IC_{50} standar *doxorubicin* = $16 \mu\text{g/mL}$, senyawa ini dinyatakan aktif dapat menghambat pertumbuhan sel kanker.

5.2 Saran

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap senyawa lain yang terdapat dalam kulit batang pohon *G. eugenifolia* Wall dan dalam bagian pohon yang lainnya dengan pelarut yang lebih polar.

DAFTAR PUSTAKA


- Ahmad S, (1983). Past, present and future research on mangosteen with a example of research and production in Malaysia, 2. Jakarta.
- Anne, E. H, Marie, C. A., Sabine, M., Vincent, D., Marck, L., David, R., and Pacal, R., (2004) Antioxidant from *Garcinia vieillardii*, *J Nat. Prod.*, 67, 707-709.
- Asai, F., Tosa, H., Tanaka T., Inuma, M., (1995), *Phytochemistry*, 43(4) 943-944.
- Ashis K. S., K. K. Sarkar, C. M. Pronobesh, M. Baneji and T. A. Hase, (1982), *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 7, 1747-1750.
- Balasubranian K. dan K. Rajagopalan, (1988), *Phytochemistry*, Vol 27, No.5, 1552-1554.
- Buckingham J. Ex. Ed., (1992), *Dictionarry of Natural Product*, Vol 1-7, "Type of Compound Index, Species Index, Chapman & Hall, London-Glasgow, Tokyo Melbourne".
- Burkill I. H., W. Birtwistle, F. W. Foxwothy, J. B. Scrivenor and J. G. Watsan, (1935), A Dictionary of Economic Products of The Malay Peninsula, Vol. 1, Gaverments of The Straits Settlemens And Federated Malay State By The Crown Agent For The Colonies, Milbank, London, 1046-1057.
- Cao S-G, et al., (1998), Novel Cytotoxic Polyprenylated Xantonoids from *Garcinia gaudichaudii*, *Tetrahedron*, 54 (36), 10915-10924.
- Chiung-Ho Liao, Chi-Tang Ho, Jen-Kun Lin, (2005) "*Effect of Garcinol on free radical generation and NO production in Embryonic rat cortical neuron and astrocytes*", Biochemical and Biophysical Research Communication, 329,1306-1314.
- Dalimartha, S. (2001) *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker*. Cimanggis Depok: Penebar Swadaya;. h. 1,14-16.
- Fitri, E., (2001). Isolasi, penentuan senyawa kimia dan uji aktivitas biologi fraksi *n*-heksana batang tanaman *Garcinia gaudichaudii*, Tesis Magister Ilmu Kimia UI.
- Fukuyama, Yoshasu, Mitsunami, Hiroyuki, Yoshizawa, Toyokichi, Taki, Yunko, Nokogawa adn Keinzi, (1996), *Chemical Abstract*, 293054v, Vol. 125, No. 23.
- Goal, L. J. And Akihisa, T., (1997), *Analysis of Sterols*, Blackie Academic & Professional, London and New York.

- Harborne, J. B. (1984). Metode Fitokimia : penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. Terjemahan dari, *Phytochemical methods* oleh Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB : Bandung.
- Hartati, S., (2007), *Isolasi dan penentuan struktur kimia serta uji aktivitas biologi dari kulit batang Garcinia spp*, Disertasi Ilmu Kimia UI.
- Hudson, B.J.F., (1990). *Food Antioxidant*. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Hyun-ah Jung, et al., (2006), *Antioxidant Xanthones from the Pericarp of Garcinia mangostana (Mangosteen)*, Division of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210; Nature's Sunshine Products, Inc
- Inuma, M., Tosa, H., Tanaka, T., Asai, F., dan Yonemori, (1998), *Phytochemistry*, Vol. 38, No. 5, 1355-1360, Vol. 47, No. 6, 1169-1170.
- Inuma, M., Tosa, H., Tanaka, Fujio, A., Kobayashi, R, Shimaoto and Miyauchi, (1996), *J. Pharm. Pharmacol.* 48. 861-865.
- Ilyas, M., Kamil, M., Raveenand, M., Sohrab, K., (1994) *Phytochemistry*, 36 (3), 807-809.
- Ito C., Miyamoto, M., Nakayama, Y., Kawai, K., and Furukawa, H., *Chem. Pharm, Bull.*, (1977), 45 (9), 140-1413.
- Jerry L. M., C, J. Chanf and D. L., Smith, (1990), "Bioassay For The Discovery Of Natural Products: An Update", *Workshop On Brine Shrimp And Potato Disc Bioassay*, Universitas Bidang Ilmu Hayati ITB, Hal 3-6.
- Jih-Jung, C., Chia-Wei, T., Tsong-Long, H., and Ih-Sheng, C., (2009), "Benzophenone Derivatives from the Fruits of *Garcinia multiflora* and Their Anti-inflammatory Activity", *J. Nat Prod* 2009, 72, 253-258.
- John C., Ed. (1984), *Medical Microbiology , An Introduction To Infectious Deaseases*, Elsevier, New-York. Amsterdam, 20-21, 123-125.
- Keng H., (1978), *Orders And Families of malaya Seed Plants*, Singapore University Press, 85-89.
- Kitisak Likhitwitayauid, Padungcharoen W. T., Mahidol C. Dan Ruchirawat S. (1997). *Phyochemistry*, 45 (6), 1299-1301.
- Kochhar, S.P. dan J.B. Rossell. (1990) *Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidant in Food Systems*. Elsevier Applied Science, London and New York.

- Kosin, J., Ruangrunsi, N., Ito, C dan Furukawa, H., 1998. *Phytochemistry*. 47, 1167-1168.
- Krawjeuski D., Tohh Grabor, and Schreier, P., (1996), *Phytochemistry*, 43(1), 141-143.
- Masdiyanto, (1997), *Studi Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Kimia dari Ekstrak n-Heksana Jawura (G. Lateriflora BL.)*, Tesis Magister Sains Ilmu Kimia Progam Pasca Sarjana Universitas Indonesia, Jakarta.
- Medical Herb, (1983), Index in Indonesia, 93, PT. Eisai Indonesia.
- Mayer B. N., Ferigni, N. R., Putman, J.E., Jacobsen, L. B., Nicholas D. E. And Mc. Laughlin, J. L. (1992). *Med. Plant Res.*, 45, 31-34
- Mehtab Parveen and Nizam Ud – Din – Khan, (1998), *Phytochemistry*, Vol 27. No. 11, 3694-3696.
- Minami, H., M.Kinoshita, Y. Fukuyama, M. Kodama, T. Yoshikawa, M. Sugiura, K.Nagakawa & H.Togo(1994). *Antioxidant Xanthones from Garcinia Subelliptica*. *Phytochemistry* 36:501.
- Moeryati S., (1998), *Alam Sumber Kesehatan Manfaat dan Kegunaannya*, Balai Kesehatan, 257-258.
- Moffat, et al., (2004), Sudjadi (1985) dan Jenni, U.A, et al.,(2006), *Karakterisasi Senyawa kimia Hasil Isolat*.
- Mei Lin Yuh, H. Anderson, T. Flavin and Y-H-S Pai, (1997), *J. Nat. Prod*, 60, 884-888.
- Olabanyii S. O., A. V. Makanyu, A. M. Haghe, M. C. Buso, D. Ceccato, R. Cherubini and Moschini G., (1995) *Chemical Abstract*, 12383n, Vol. 125, No. 10.
- Oliver. C., *Chemical Abstract*, (1996), 256778P, vol 125, No. 20
- Parveen, M., and Ud-Din-Khan, N., (1988), *Phytochemistry*, 27(11), 369-3696.
- Rahmatiah, T., (1999). *Isolasi dan penentuan struktur molekul serta uji aktivitas antimikroba senyawa kimia dari ekstrak n-heksana daun Garcinia dulcis kurz*, Tesis Magister Ilmu Kimia UI.
- Renato, L., (1997), *Chemical Abstract*, 351178t, Vol. 127., No. 25.

- Robert M. Silverstein, Francis X. Webster & David J. Kiemley, (2005).
Spectrometric identification of organic compounds, : John Wiley & sons,
Inc., New York
- Sadulloh, (1999). Studi Aktivitas Antioksidan Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L) Dengan Metode Penimbangan, Skripsi FMIPA UI.
- Sardjono , *Rancangan Obat*, Gadjah Mada University Press, Yogya, 1992; hal.2.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M.R., (1990), New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Nat Cancer Inst.*, 82(13):1107-1112.
- Sordat, I. D., M. Hamburger, J. Rogers and K. Hostetmann, (1992), *Phytochemistry*, Vol. 31, No. 1, 313-319.
- Thoison, O, Jacques Fahy, Vincent Dumontet, Angele Chiaroni, Claude Riche, Mai Van Tri and Thierry Sevenet, (2000) Cytotoxic Prenylxanthenes from *Garcinia bracteata*, *J. Nat. Prod*, Hanoi, Vietnam, 63, 441-446.
- Thoison, O, Dao Dinh Cuong, Anthony Gramain, Angele Chiaroni, Nguyen Van Hung and Thierry Sevenet, 2005 Further rearranged Prenylxanthenes and benzophenones from *Garcinia bracteata*, *Tetrahedron*, Hanoi, Vietnam, 61, 8529-8535.
- Tjitrosoepomo, Gembong, (1996), *Taksonomi Tumbuhan*. UGM Press, Yogyakarta, 266-267.
- Vikas Babu, Ali, S.M., Sultana, S. and Ilyas M., (1987) A Biflavonoid From *Garcinia nervosa*. *Phytochemistry*. (10), 3332-3335.
- Waterman, P.R. G. and Crichton E. G., (1980) *Phytochemistry*, vol 19, 1187-1189.
- Whitmore T. C., (1973), *Tree Flora of Malaya, A manual for Forester*, Vol. 2, Printed by Hongkong Wing Tai Cheung, 197-225.
- Yoshikanwa, Masayuki, Yoshizumi, and Tamoy, (1996), *Chemical Abstract*, 2999777c, Vol. 125. No. 23.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Sampel Tanaman



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, 5 Juli 2010

Nomor : 877/IPH.1.02/If.8/VII/2010
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan


Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Ketut Triono
 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>Garcinia eugenifolia</i> Wall.	Clusiaceae

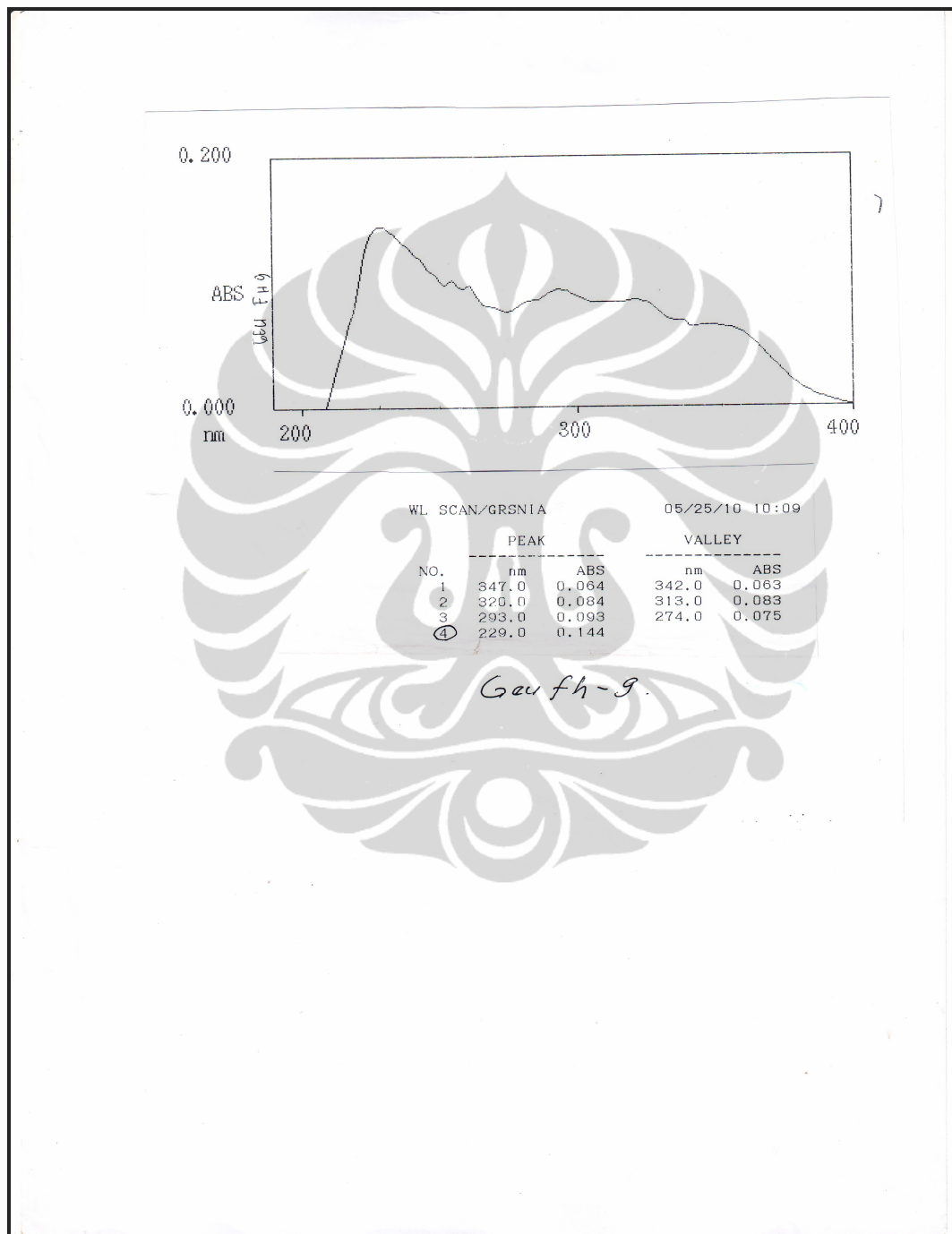
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001

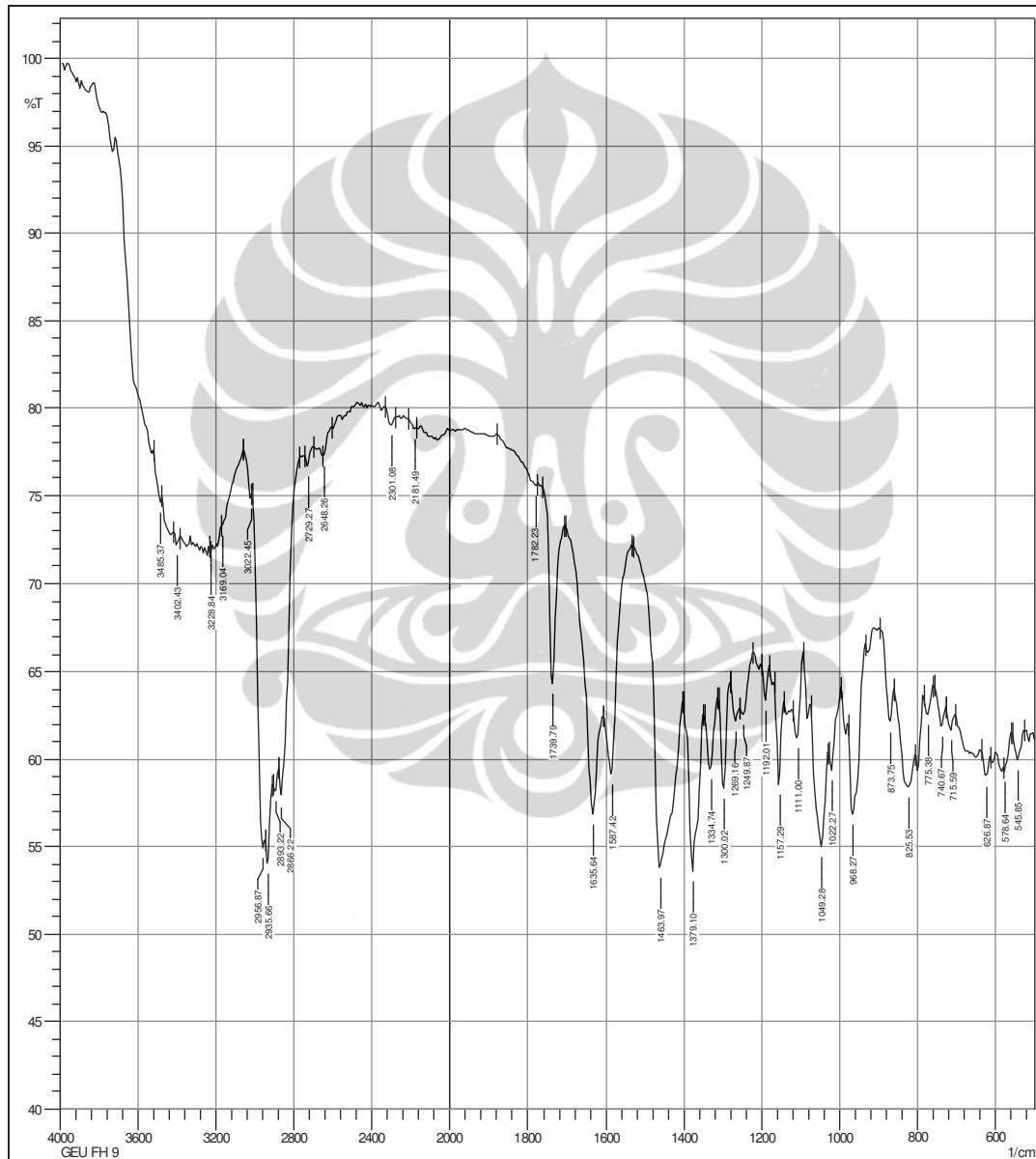
D:\Ident 2010\Ketut Triono..doc\Ismail-SP

Page 1 of 1

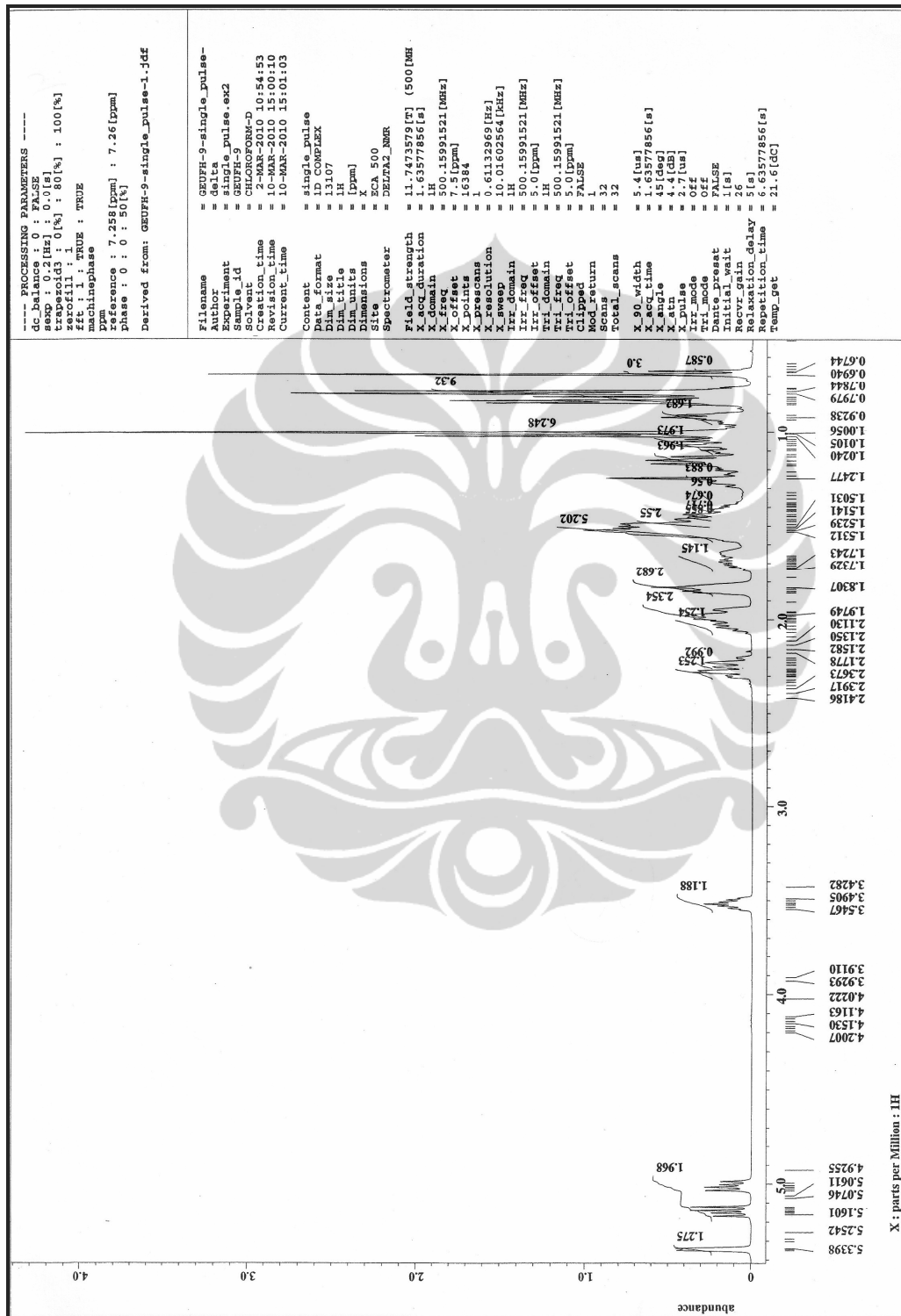
Lampiran 2. Spektrum UV-Vis Senyawa Geu fh- 9

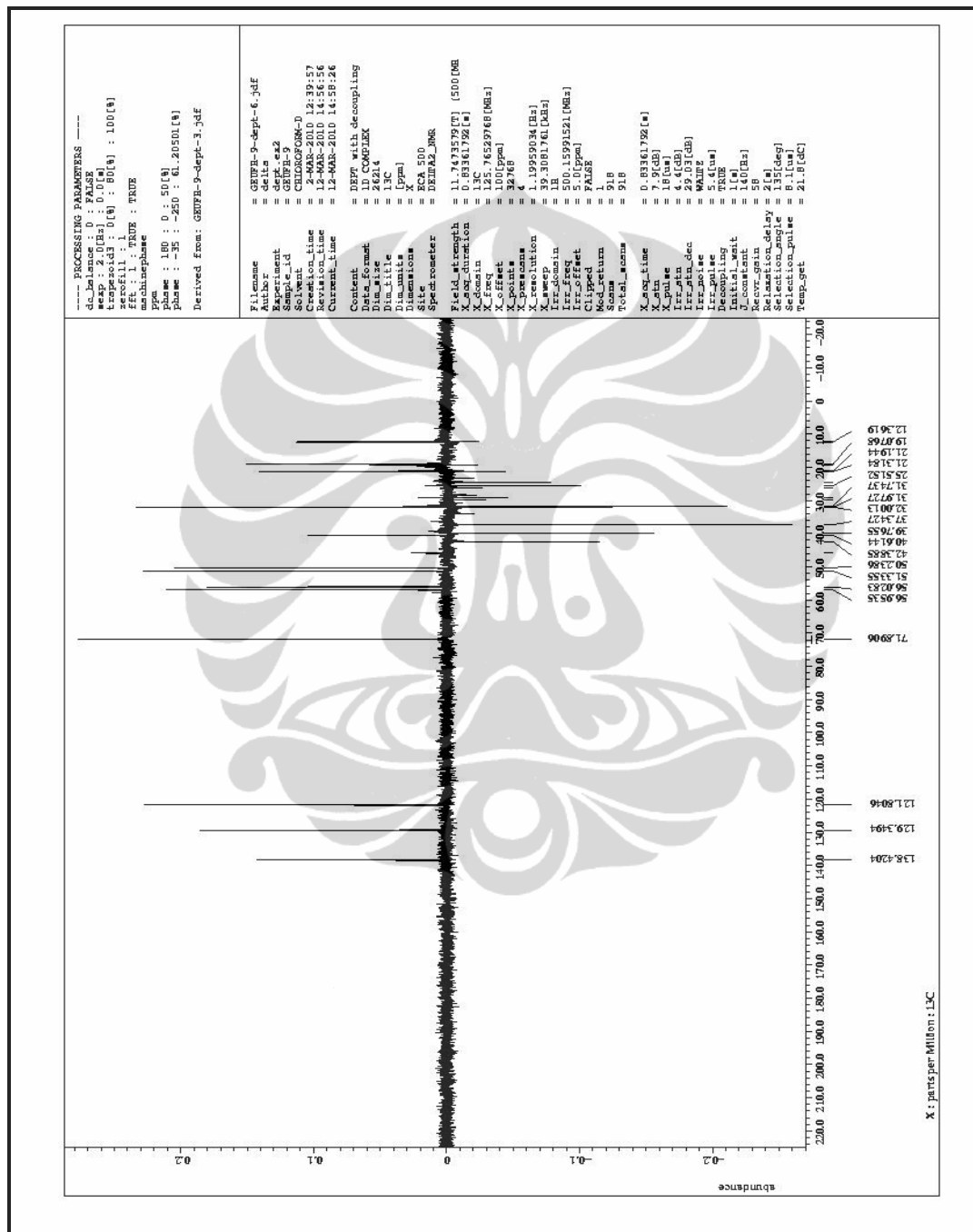


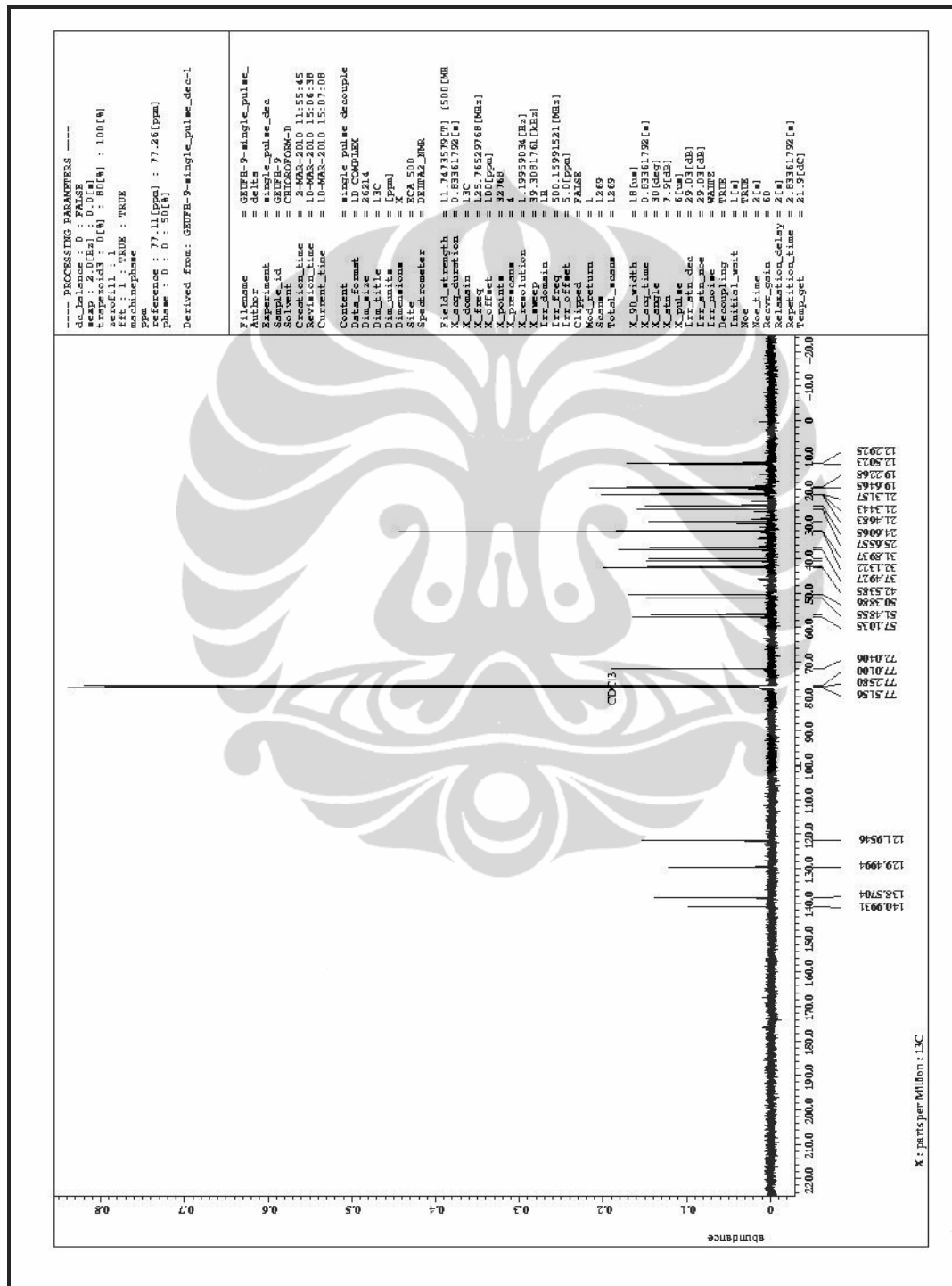
Lampiran 3. Spektrum IR Senyawa Geu fh- 9



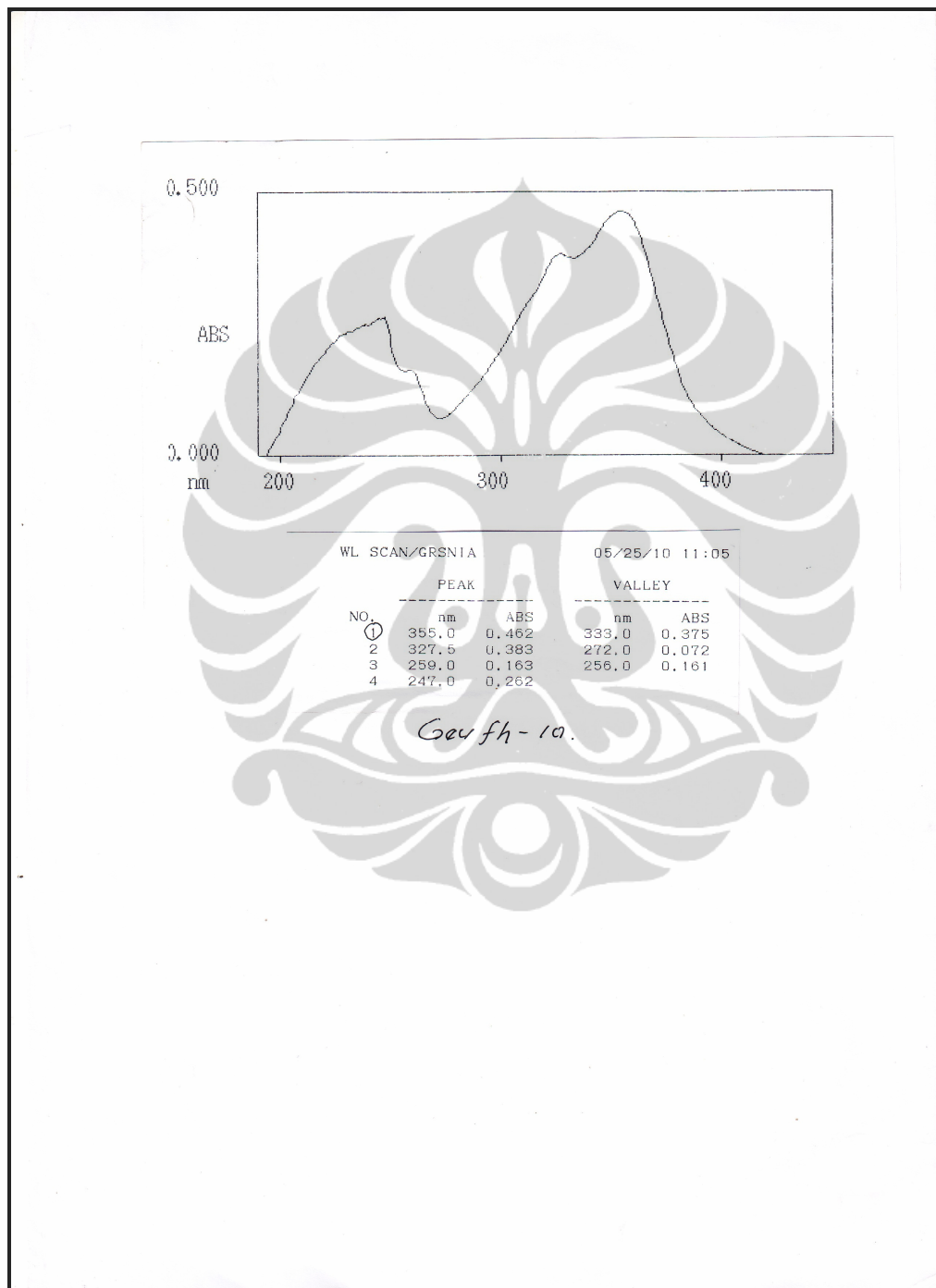
Lampiran 4. Spektrum ¹H-NMR Senyawa Geu fh- 9



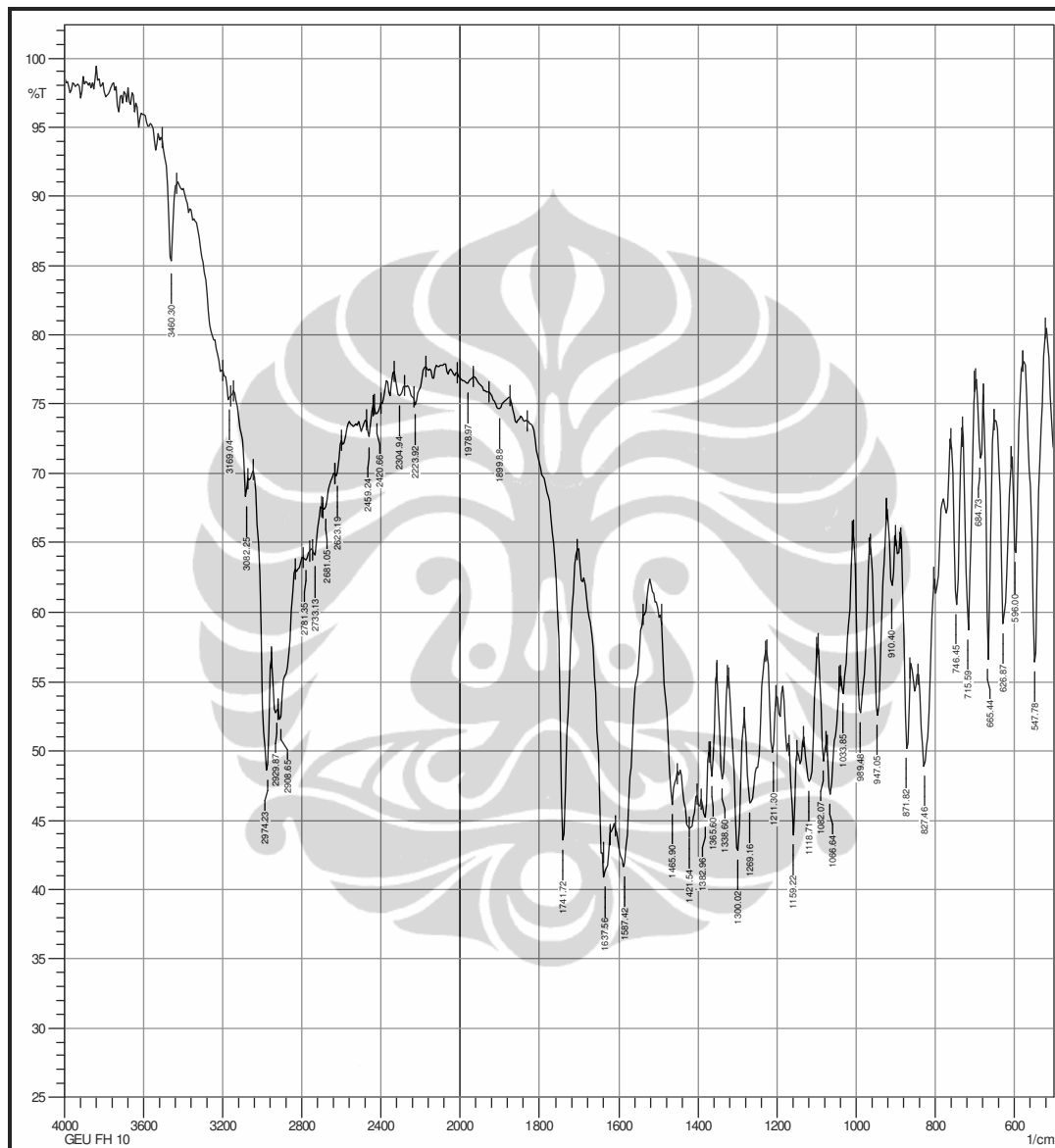
Lampiran 5. Spektrum ^{13}C -NMR DEPT 135 Senyawa Geu fh- 9

Lampiran 6. Spektrum ^{13}C -NMR Senyawa Geu fh- 9

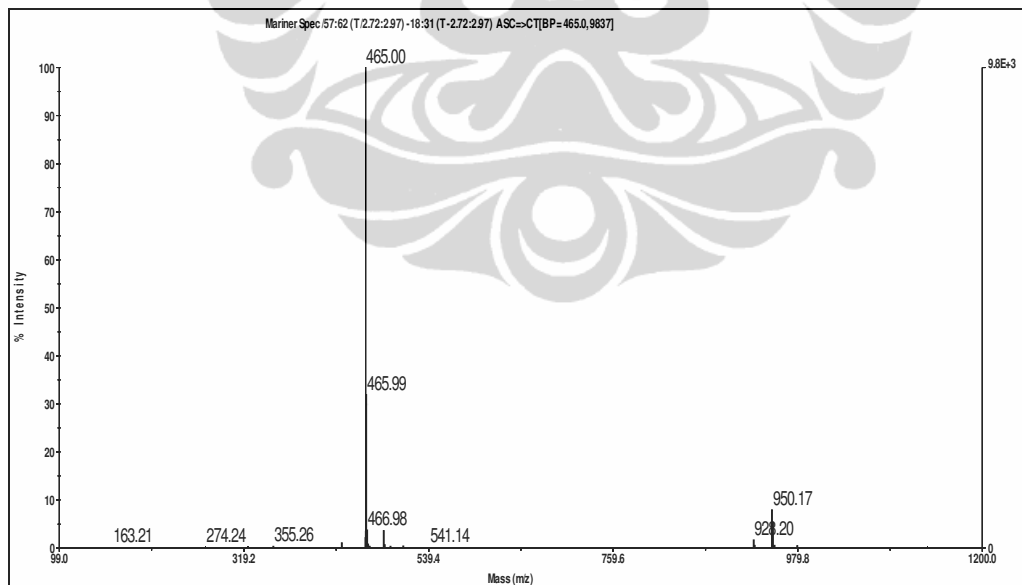
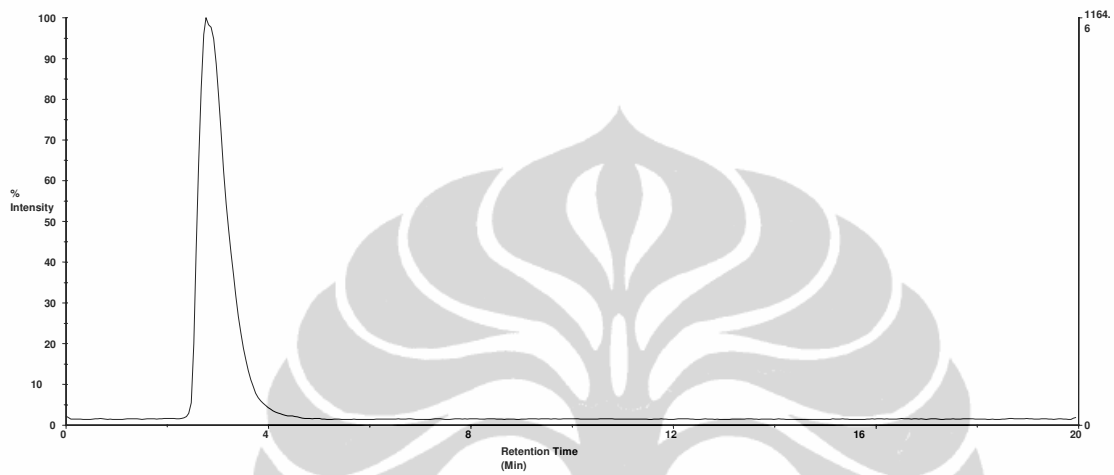
Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Senyawa Geu fh- 10

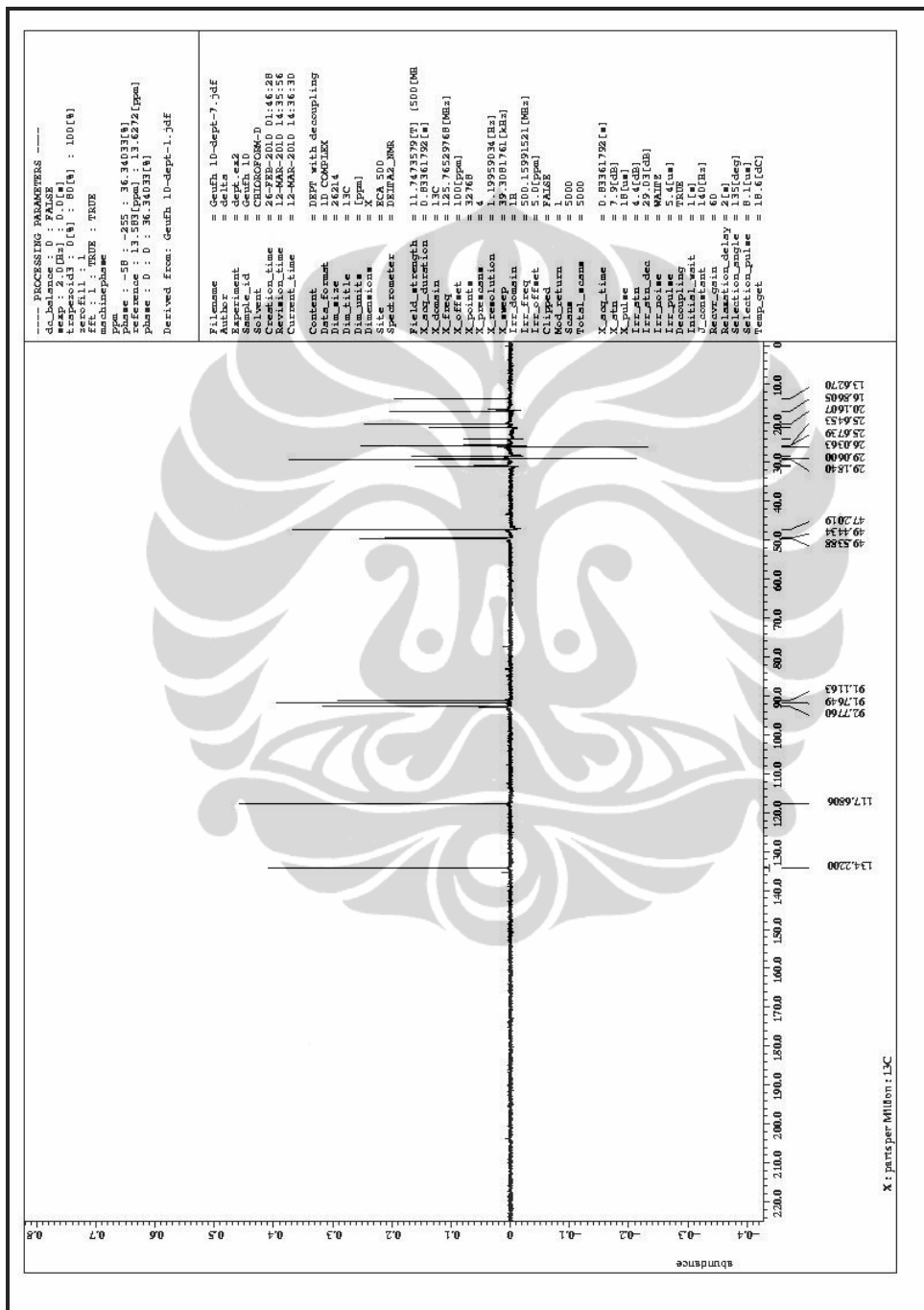


Lampiran 8. Spektrum IR Senyawa Geu fh- 10

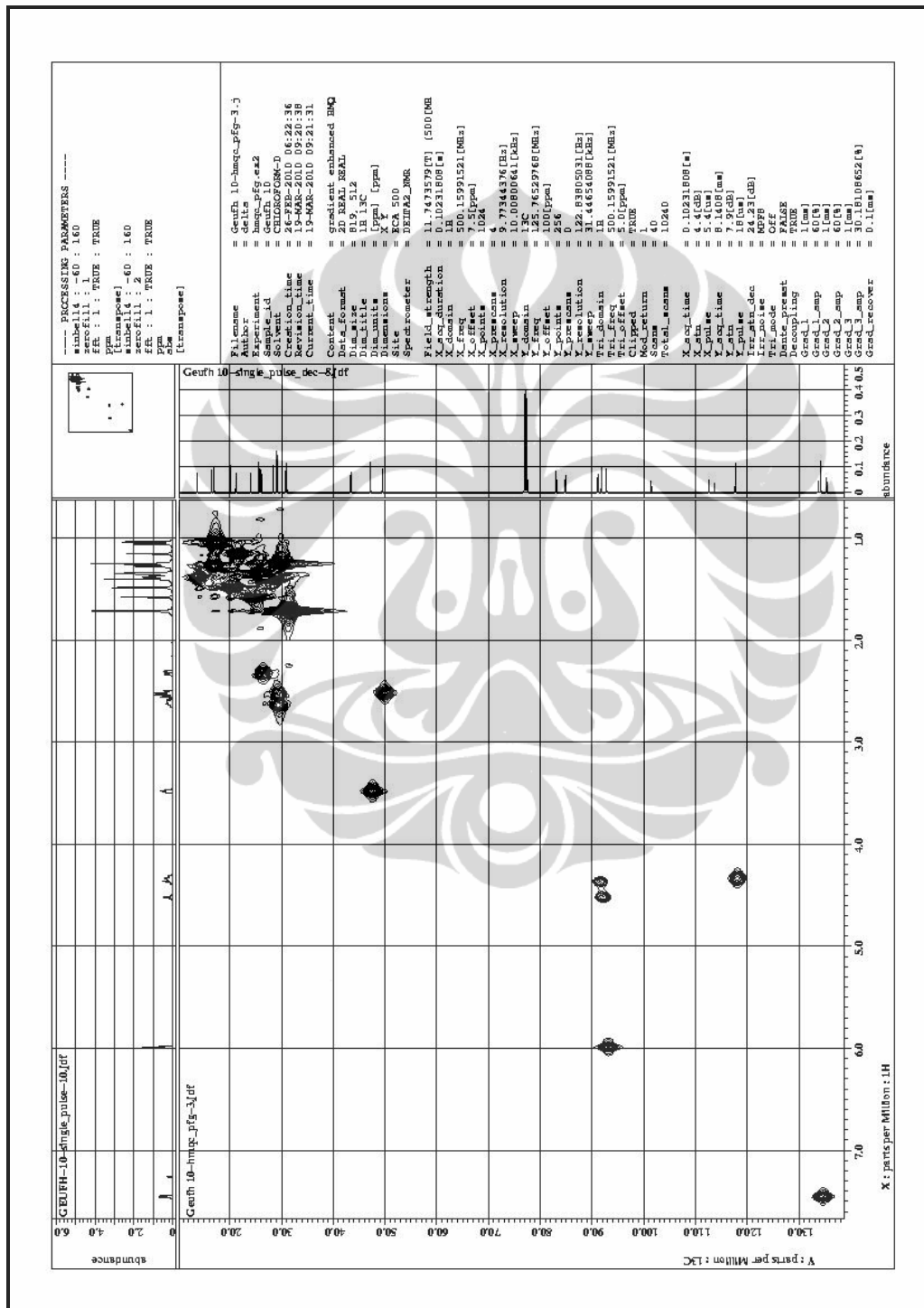


Lampiran 9. Kromatogram LC- MS Senyawa Geu fh- 10



Lampiran 12. Spektrum ^{13}C -NMR DEPT 135 Senyawa Geu fh-10

Lampiran 13. Spektrum HMQC Senyawa Geu fh-10



Lampiran 15. Data Analisa Hasil Uji Antioksidan ekstrak dan Isolat Murni.

No	Sampel	Absorbansi ($\lambda = 515$ nm)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibisi	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
1	Kontrol	2,896			
2	F <i>n</i> -Heksana	1,494	20	48,41	20,01
3		2,039	10	29,59	
4		2,376	5	17,96	
5		2,785	1	3,83	
6		F Metanol	0,258	20	91,09
7	0,809		10	72,06	
8	1,405		5	51,48	
9	2,073		1	28,42	
10	Kristal Geu fh-10	2,273	20	21,51	86,44
11		2,358	10	18,58	
12		2,448	5	15,47	
13		2,498	1	13,74	
14	Quercetin	0,164	20	94,34	10,10
15		1,404	10	51,52	
16		2,193	5	24,27	
17		2,604	1	10,08	

Lampiran 16. Analisa Hasil *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sampel	Konsentrasi (K), ($\mu\text{g/mL}$)	Log K	Hidup awal			Hidup akhir			Akumulasi		Mortalitas	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
			1	2	3	1	2	3	mati	hidup		
Kontrol			10	10	10	10	10	10	0	125	0,00	
			10	11	11	10	11	11	0	95	0,00	
			11	10	10	11	10	10	0	63	0,00	
			11	11	10	11	11	10	0	32	0,00	
Kristal Geu fh- 10	10	1,00	10	10	10	10	10	8	2	116	1,69	
	100	2,00	10	11	11	9	11	11	3	88	3,30	2.146,58
	500	2,70	11	10	10	10	10	10	4	57	6,56	
	1000	3,00	11	11	10	11	8	8	9	27	25,00	
Ekstrak <i>n</i> -Heksana	10	1,00	11	10	10	11	10	10	0	123	0,00	
	100	2,00	11	11	11	10	11	10	2	92	2,13	
	500	2,70	11	11	11	10	11	10	4	61	6,15	1.363,40
	1000	3,00	10	10	10	10	9	8	7	30	18,92	
	2000	3,30	10	10	11	1	1	1	35	3	92,11	

Lampiran 17. Hasil Analisis Uji Antikanker *in-vitro* dengan sel T47D

No	Konsentrasi (µg/mL)	log Konsentrasi	Rata-rata % Sel hidup	SD	IC ₅₀
1	100	2	3,10	0,53	17 µg/mL
2	25	1,40	24,47	3,17	
3	10	1	74,38	3,02	
4	5	0,70	87,77	11,00	
5	0	0	100,00	5,98	

