



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, ELUSIDASI DAN UJI BIOAKTIVITAS
KANDUNGAN KIMIA YANG TERDAPAT PADA
CALOPHYLLUM CANUM HOOK.F.**

TESIS

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

RISSYELLY

0806422132

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM MAGISTER ILMU FARMASI

DEPOK

JULI 2010

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

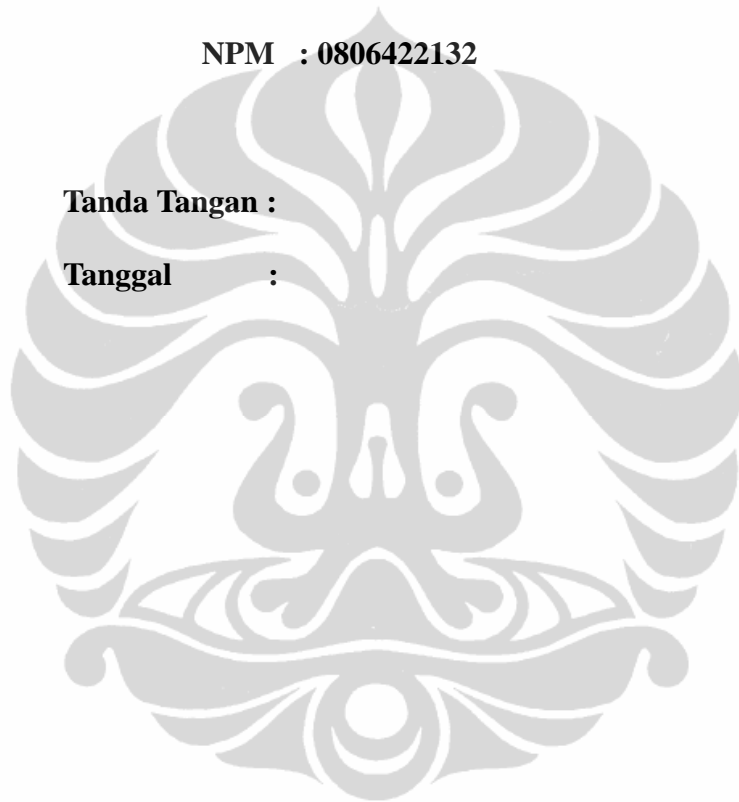
**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : RISSYELLY

NPM : 0806422132

Tanda Tangan :

Tanggal :



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : RISSYELLY

NPM : 0806422132

Program Studi: Ilmu Kefarmasian

Judul Tesis : ISOLASI, ELUSIDASI DAN UJI BIOAKTIVITAS
KANDUNGAN KIMIA YANG TERDAPAT PADA
TANAMAN *CALOPHYLLUM CANUM HOOK.F.*

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Katrin Apt, M.S ()

Pembimbing : Dr. Jamilah Abbas, M.Si ()

Penguji : Dr. Yahdiana Harahap, MS ()

Penguji : Drs. Hayun, MSi ()

Penguji : Prof. Dr. Endang Hanani, Apt ()

Penguji : Dr. Sci. Muhammad Hanafi ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 15 Juli 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan syukur atas segala karunia dan nikmat yang Allah *Subhanahu Wa Ta 'Ala* telah berikan sehingga tugas akhir ini dapat kami selesaikan, demikian pula terima kasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada :

1. Ibu Dr. Katrin Apt, M.S, selaku pembimbing pertama, Ibu Dr. Jamilah Abbas, M.Si, selaku pembimbing kedua yang memiliki andil besar dalam proses penelitian dan penyelesaian tugas akhir kami ini, semoga segala bantuan dan bimbingan ibu berdua mendapat imbalan yang setimpal di sisi-Nya.
2. Prof. Dr. L.B.S. Kardono, MS, APU, selaku Kepala Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia beserta staf atas penggunaan segala fasilitas dan bantuannya selama penelitian.
3. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
4. Prof. Dr. Effionora Anwar, MS, selaku Ketua Program Magister Ilmu Farmasi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
5. Seluruh staf pengajar dan karyawan serta rekan-rekan mahasiswa Program Magister Ilmu Farmasi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
6. Semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyelesaian tugas akhir ini.

Dan tidak lupa kepada kedua orang tua kami, ayahanda Arsyil Bachtiar Dt. Tumammad dan ibunda Rilta Yestia yang telah mendidik kami, semoga segala amalan dan jerih payah keduanya mendapat balasan disisi-Nya, dan keluarga besar Papa Armijn Raymond, serta seluruh keluarga yang turut mendorong dan senantiasa memotivasi kami untuk menyelesaikan studi kami, terutama kepada suamiku tersayang Jimmy Armijn, SH.

Harapan kami semoga tesis ini dapat berguna bagi pengembangan ilmu farmasi.

Depok, Juli 2010

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Rissyelly
NPM : 0806422132
Program Studi : Magister Ilmu Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Tesis

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

“Isolasi, Elusidasi dan Ujibioaktivitas Kandungan Kimia Yang Terdapat Pada Tanaman *Calophyllum canum* Hook.f.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, 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 : Juli 2010

Yang menyatakan

(Rissyelly)

ABSTRAK

Nama : Rissyelly
Program Studi : Magister Ilmu Farmasi
Judul : Isolasi Elusidasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Yang Terdapat Pada Tanaman *Calophyllum canum* Hook. f.

Marga *Calophyllum* termasuk famili Cluciaceae/Guttiferae yang mempunyai kontribusi yang besar untuk kesehatan, karena mengandung senyawa-senyawa yang mempunyai bioaktivitas yang potensial diantaranya sebagai obat antimalaria. Berbagai kandungan kimia dari berbagai spesies *Calophyllum* dan bioaktivitasnya telah dilaporkan, diantaranya senyawa golongan santon, kumarin, flavonoida dan terpenoida. Tanaman *Calophyllum canum* Hook.f. merupakan tanaman yang banyak terdapat di Indonesia. Penelitian ini bertujuan mengisolasi kandungan kimia dari kulit batang tanaman *C. canum* Hook.f. dan menentukan struktur serta uji bioaktivitas senyawa kimia yang diperoleh. Isolasi senyawa dilakukan dengan teknik kromatografi dan penentuan struktur molekul dengan menggunakan alat spektroskopi: massa (LC-MS), inframerah (IR), UV, resonansi magnet inti proton ($^1\text{H-NMR}$) dan resonansi magnet inti karbon ($^{13}\text{C-NMR}$) dan spektroskopi NMR-2 dimensi. Tiga senyawa murni berhasil diisolasi dan dielusidasi yakni SCC I (friedelin), SCC III [2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton] dan SCC IV diduga adalah canum kumarin. Uji aktivitas antimalaria senyawa murni terhadap *Plasmodium falciparum* klon 3D7 secara *in vitro*, memperlihatkan bahwa senyawa SCC IV memiliki aktivitas antimalaria dengan adanya hambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* berturut turut sebesar 11,60, 20,90, 34,80, 39,50, dan 41,86 % pada konsentrasi SCC IV 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} dan 10^{-5} M, sedangkan senyawa SCC I dan SCC III tidak memiliki aktivitas antimalaria. Uji toksisitas senyawa murni terhadap larva udang *Artemia salina* Leach memperlihatkan bahwa senyawa SCC I, SCC III dan SCC IV memiliki toksisitas yang tinggi (berturut turut LC_{50} 8,92, 16,79 dan $1,09 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Kata kunci : *Calophyllum canum* Hook.f., antimalaria, *Plasmodium falciparum* klon 3D7, *Artemia salina*, friedelin, [(2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton)] dan canum kumarin
xvi+135 halaman : 18 gambar; 8 tabel
Bibliography : 64 (1969-2010)

ABSTRACT

Name : Rissyelly
Study Program : Magister of Pharmacy
Title : Isolation, Elucidation and Bioactivity Measurements of
Chemical Constituents from *Calophyllum canum* Hook.f.

Calophyllum belong to Cluciaceae or Guttiferae family and have a large contribution for health, because this family content some potential bioactive compounds among as antimalaria medicine. Chemical contain from some species of *Calophyllums* and their bioactivities have reported among as xanthones, terpenoids, coumarins and flavonoids. A lot of *Calophyllum canum* Hook.f. tree grown in Indonesia. This research was intended to isolate, elucidate and measure biological active compounds from stem bark of *Calophyllum canum* Hook.f. The isolation was conducted through the chromatographyc technique and elucidation structures by spectroscophyc: mass spectrometry (LC-MS), infra red (IR), UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and 2D-NMR. The research found three compounds are SCC I (friedelin), SCC III [(2-(3',3'-dimethylallyl)-1,3,7-trihydroxyxanthon)], and SCC IV sugessted is (canum coumarin). Study antimalarial activity isolate against of *Plasmodium falciparum* strain 3D7 *in vitro* have be done, show that a compound SCC IV have antimalarial activity with inhibition growth parasite *P. falciparum* 11,60, 20,90, 34,80, 39,50 and 41,86 % at SCC IV concentration 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ and 10⁻⁵ (mg μ L⁻¹) respectively, but compound SCC I and SCC III have not antimalarial activity. Study toxicity of isolate against brine shrimp *Artemia salina* Leach, show that compound SCC I, SCC III and SCC IV have potent activity (LC₅₀ 8,92, 16,79 and 1,09 μ g mL⁻¹).

Key word : *Calophyllum canum* Hook f, *antimalaria*, *Plasmodium falciparum* clone 3D7, *Artemia salina*, friedelin, (2-(3',3'-dimethylallyl)-1,3,7-trihydroxyxanthon)and canum coumarin
xvi+135pages : 19 pictures; 8 tables
Bibliography : 64 (1969-2010)

DAFTAR ISI

PERNYATAAN ORISINILITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Taksonomi <i>Calophyllum canum</i> Hook. F	5
2.2. Morfologi Tanaman	5
2.3. Kandungan Kimia Marga <i>Calophyllum</i>	6
2.3.1. Senyawa Santon	6
2.3.2. Senyawa Kumarin	13
2.3.3. Senyawa Poliisoprenil Keton.....	20
2.3.4. Senyawa Flavonoida dan Biflavonoida.....	21
2.3.5. Senyawa Triterpen	23
2.3.6. Senyawa Asam Organik	23
2.3.7. Senyawa Lakton.....	26

2.4.	Bioaktivitas Senyawa Marga <i>Calophyllum</i>	27
2.4.1.	Aktivitas Antimalaria	27
2.4.2.	Aktivitas Sitotoksik	27
2.4.3.	Aktivitas Antitumor	27
2.4.4.	Aktivitas Anti-HIV.....	28
2.4.5.	Aktivitas Antibakteri.....	28
2.5.	Ekstraksi dan Fraksinasi.....	29
2.5.1.	Ekstraksi.....	29
2.5.2.	Fraksinasi.....	30
2.6.	Metoda Pemisahan dan Pemurnian	30
2.7.	Karakterisasi Senyawa Murni	32
2.7.1.	Spektrofotometer UV-VIS	32
2.7.2.	Spektrofotometer Inframerah	32
2.7.3.	Spektrometer Resonansi Magnet Inti	32
2.7.4.	Spektrometer Massa.....	33
2.8.	Tinjauan Umum Malaria	33
2.8.1.	Struktur dan Fisiologi Plasmodium	34
2.8.2.	Fisiologi Plasmodium	34
2.8.3.	Daur Hidup Plasmodium	35
2.8.4.	Obat Antimalaria.....	37
2.9.	Uji Aktivitas Biologis.....	39
2.9.1.	Uji Toksisitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	39
2.9.2.	Uji Bioaktivitas Antimalaria	39
3	METODOLOGI PENELITIAN.....	41
3.1.	Bahan dan Alat.....	41
3.1.1.	Bahan Kimia	41
3.1.2.	Kultur <i>Plasmodium falciparum</i>	41
3.1.3.	Hewan Uji	41
3.1.4.	Alat-alat	41
3.2.	Metode Penelitian	42
3.2.1.	Penyiapan Bahan, Pembuatan Ekstrak dan Fraksi	42

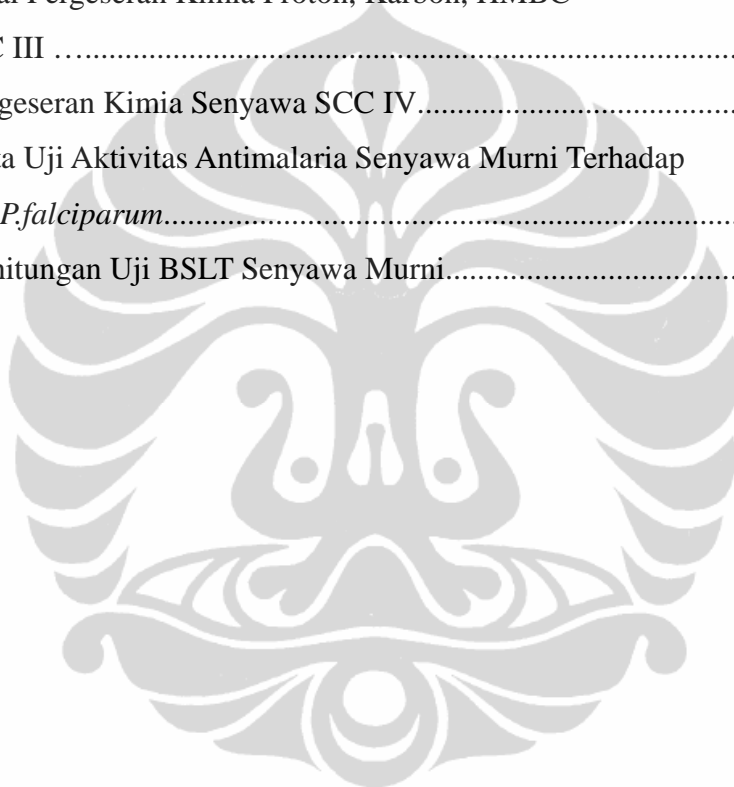
3.2.2.	Uji Toksisitas Fraksi Terhadap Udang <i>Artemia salina</i>	44
3.2.3.	Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi secara <i>in vitro</i>	45
3.2.4.	Isolasi Senyawa	49
3.2.5.	Penentuan Struktur Molekul	53
3.2.6.	Uji Toksisitas Senyawa Terhadap Udang <i>Artemia salina</i>	54
3.2.7.	Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Murni secara <i>in vitro</i>	55
4	HASIL DAN PEMBAHASAN	56
4.1.	Penyiapan Bahan, Pembuatan Ekstrak dan Fraksi	56
4.2.	Uji Toksisitas Fraksi Terhadap Udang <i>Artemia salina</i>	56
4.3.	Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi secara <i>in vitro</i>	57
4.4.	Isolasi Senyawa	58
4.5.	Penentuan Struktur Molekul	58
4.6.	Uji Toksisitas Senyawa Terhadap Udang <i>Artemia salina</i>	71
4.7.	Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Murni secara <i>in vitro</i>	75
5	KESIMPULAN DAN SARAN	78
5.1.	Kesimpulan	78
5.2.	Saran.....	79
	DAFTAR PUSTAKA.....	80
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Merozoit <i>Plasmodium falciparum</i>	34
Gambar 2.2. Daur Hidup <i>Plasmodium sp.</i>	36
Gambar 2.3. Tahap Perkembangan Plasmodium dalam Sel Darah Merah.....	37
Gambar 3.1. Bagan Alir Ekstraksi dan Fraksinasi.....	43
Gambar 3.2. Skema Pembuatan dan Pengenceran Sampel Uji pada Sumur Plat Kultur	48
Gambar 3.3. Bagan Alir Isolasi dan Pemurnian Senyawa Kimia dari Fraksi <i>n</i> -heksana Kulit Batang <i>Calophyllum canum</i>	51
Gambar 3.4. Bagan Alir Isolasi dan Pemurnian Senyawa Kimia dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang <i>Calophyllum canum</i>	52
Gambar 4.1. Struktur Senyawa SCC I	61
Gambar 4.2. HMBC Senyawa SCC I	64
Gambar 4.3. Sinyal Proton Aromatik SCC III.....	65
Gambar 4.4. HMBC Senyawa SCC III	67
Gambar 4.5. Struktur Senyawa SCC III.....	68
Gambar 4.6. Struktur Senyawa SCC IV.....	70
Gambar 4.7. HMBC Senyawa SCC IV.....	70
Gambar 4.8. Grafik Hambatan Pertumbuhan Parasit <i>P. falciparum</i> Oleh Senyawa SCC IV	75
Gambar 4.9. Grafik Hambatan Pertumbuhan Parasit <i>P. falciparum</i> oleh Klorokuin.....	75
Gambar 4.10. Grafik Toksisitas SCC I Terhadap Udang <i>A. salina</i> Leach.....	76
Gambar 4.11. Grafik Toksisitas SCC III Terhadap Udang <i>A. salina</i> Leach.....	77
Gambar 4.12. Grafik Toksisitas SCC IV Terhadap Udang <i>A. salina</i> Leach....	77

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil Uji Toksisitas Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	57
Tabel 4.2. Data Penghambatan Parasitemia oleh Fraksi.....	58
Tabel 4.3 Perbandingan Pergeseran Kimia ^{13}C -NMR, Senyawa SCC I, dengan Literatur (diukur pada 500 Hz dengan pelarut CDCl_3).....	62
Tabel 4.4. Nilai Pergeseran Kimia Proton, Karbon Senyawa SCC I.....	63
Tabel 4.5. Nilai Pergeseran Kimia Proton, Karbon, HMBC Senyawa SCC III	67
Tabel 4.6. Pergeseran Kimia Senyawa SCC IV.....	71
Tabel 4.7. Data Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Murni Terhadap Pertumbuhan <i>P.falciparum</i>	72
Tabel 4.8.Perhitungan Uji BSLT Senyawa Murni.....	76



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Identifikasi Spesies Tumbuhan <i>Calophyllum canum</i>	85
Lampiran 2. Spektrum GCMS SCC I.....	86
Lampiran 3. Spektrum Inframerah Senyawa SCC.....	86
Lampiran 4. Spektrum ¹³ C NMR Senyawa SCC I dalam CDCl ₃ , 125 MHz..	87
Lampiran 5. Spektrum ¹ H NMR Senyawa SCC I dalam CDCl ₃ , 500 MHz...	88
Lampiran 6. Spektrum HMQC Senyawa SCC I.....	89
Lampiran 7. Spektrum HMQC Senyawa SCC I (60 - 220 ppm)	90
Lampiran 8. Spektrum HMQC Senyawa SCC I (30 - 60 ppm).....	91
Lampiran 9. Spektrum HMQC Senyawa SCC I (20 - 40 ppm)	92
Lampiran 10. Spektrum HMBC Senyawa SCC I	93
Lampiran 11. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (207 - 220 ppm)	94
Lampiran 12. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (211 - 218 ppm).....	95
Lampiran 13. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (208 - 219 ppm)	96
Lampiran 14. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (42 - 60 ppm)	97
Lampiran 15. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (49 - 62 ppm).....	98
Lampiran 16. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (29 - 42 ppm)	99
Lampiran 17. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (29 - 45 ppm)	100
Lampiran 18. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (27 - 44 ppm).....	101
Lampiran 19. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (38 - 44 ppm)	102
Lampiran 20. Spektrum HMBC Senyawa SCC I (20 - 34 ppm)	103
Lampiran 21. Spektrum COSY Senyawa SCC I	104
Lampiran 22. Spektrum Inframerah Senyawa SCC III.....	105
Lampiran 23. Spektrum UV Senyawa SCC III	106
Lampiran 24. Spektrum LCMS Senyawa SCC III.....	106
Lampiran 25. Spektrum ¹ H NMR Senyawa SCC III, dalam Aseton.....	107

Lampiran 26. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC III (1 - 2,0 ppm).....	108
Lampiran 27. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC III, (2,3 – 6,6 ppm).....	109
Lampiran 28. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC III, (7,3 – 7,7 ppm).....	110
Lampiran 29. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa SCC III, dalam Aseton, 125 MHz	111
Lampiran 30. Spektrum DEPT Senyawa SCC III	112
Lampiran 31. Spektrum HMQC Senyawa SCC III dalam Aseton.....	113
Lampiran 32. Spektrum HMQC Senyawa SCC III (100 – 120 ppm).....	114
Lampiran 33. Spektrum HMQC Senyawa SCC III (29 – 160 ppm).....	115
Lampiran 34. Spektrum HMBC Senyawa SCC III	116
Lampiran 35. Spektrum HMBC Senyawa SCC III (10 – 120 ppm).....	117
Lampiran 36. Spektrum HMBC Senyawa SCC III (20 – 40 ppm).....	118
Lampiran 37. Spektrum HMBC Senyawa SCC III (100 – 200 ppm).....	119
Lampiran 38. Spektrum HMBC Senyawa SCC III (150 – 180 ppm).....	120
Lampiran 39. Spektrum HMBC Senyawa SCC III (100 – 160 ppm).....	121
Lampiran 40. Spektrum Inframerah Senyawa SCC IV.....	122
Lampiran 41. Spektrum UV-VIS Senyawa SCC IV.....	123
Lampiran 42. Spektrum LCMS Senyawa SCC IV	123
Lampiran 43. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa SCC IV, dalam Aseton	124
Lampiran 44. Spektrum ^{13}C NMR Senyawa SCC IV (14 – 54 ppm).....	125
Lampiran 45. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC IV, dalam Aseton, 500	126
Lampiran 46. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC IV (5,9 – 7,4 ppm).....	127
Lampiran 47. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC IV (2,8 – 3,3 ppm).....	128
Lampiran 48. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC IV (1,2 – 2,3 ppm)	129
Lampiran 49. Spektrum ^1H NMR Senyawa SCC IV (0 – 1,06 ppm).....	130
Lampiran 50. Spektrum HMQC Senyawa SCC IV.....	131
Lampiran 51. Spektrum HMQC Senyawa SCC IV (10 – 30 ppm).....	132

Lampiran 52. Spektrum HMQC Senyawa SCC IV (100 – 130 ppm).....	133
Lampiran 53. Spektrum HMQC Senyawa SCC IV (38 – 55 ppm)	134
Lampiran 54. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV	135
Lampiran 55. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (10 – 210 ppm).....	136
Lampiran 56. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (130 – 200 ppm).....	137
Lampiran 57. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (10 – 50 ppm).....	138
Lampiran 58. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (160 – 200 ppm).....	139
Lampiran 59. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (40 – 100 ppm).....	140
Lampiran 60. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (97 – 120 ppm).....	141
Lampiran 61. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (14 – 34 ppm).....	142
Lampiran 62. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (36 – 59 ppm).....	143
Lampiran 63. Spektrum HMBC Senyawa SCC IV (13 – 34 ppm).....	144
Lampiran 64. Spektrum COSY Senyawa SCC IV.....	145
Lampiran 65. Spektrum DEPT Senyawa SCC IV.....	146

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Marga *Calophyllum* merupakan kelompok tumbuhan hutan tropis yang sangat besar jumlahnya, yakni terdiri dari 190-200 spesies. Tanaman ini tersebar luas di wilayah Indo-Malaysia, Mikronesia, Melanesia, Thailand, Singapura, Sri Lanka dan Australia bagian utara. Hanya sekitar 8 spesies terdapat di selatan Amerika dan 20 spesies di Madagaskar. Pulau Kalimantan merupakan wilayah dengan jumlah spesies terbesar, yakni terdapat sekitar 65 spesies *Calophyllum* (Soerianegara et al., 1994)

Beberapa spesies dari genus *Calophyllum* digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit. Rebusan kulit batang dan getah beberapa spesies (seperti *C. inophyllum*) diminum untuk pengobatan diare dan pengobatan setelah persalinan, dan juga sebagai obat luar untuk mengobati penyakit kulit, mata dan reumatik (Sastroamijoyo et al., 2004). Minyak dan pasta dari biji *C. inophyllum* dimanfaatkan sebagai obat nyeri, reumatik, gout dan penyakit lepra (Daniel, 2006). Disamping itu minyak tersebut juga digunakan untuk penyakit kulit (Daniel, 2006). Daun *C. inophyllum* sebagai obat migrain dan vertigo, sedangkan kulit batang sebagai obat cuci perut (Daniel, 2006). Daun *C. soulattri* digunakan sebagai obat encok dan getah *C. tallichianum* digunakan sebagai obat kudis (Heyne, 1987; Eisai, 1986).

Penelitian tentang bioaktivitas kandungan kimia dari marga *Calophyllum*, diantaranya aktivitas antimalaria, antivirus, antibakteri dan antikanker. Beberapa senyawa santon berpotensi sebagai antimalaria yaitu dimetilkalabasanton, kalothwaitesisanton dan 6-deoksi- γ -mangostin yang diisolasi dari tanaman *C. caledonicum* (Hay et al., 2004). Senyawa kumarin (+) seperti kаланolida A dan kostatolida dari *C. teysmanni* var *inophylloide* memperlihatkan aktivitas yang sangat kuat dalam menghambat replikasi virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus* tipe-1) (Wang et al., 2006). Senyawa kumarin yang diisolasi dari tanaman *C. brasiliense* dan *C. inophyllum* berpotensi sebagai antikanker (Ito et al., 2003; Itogawa et al., 2001). Aktivitas antimikroba diperlihatkan oleh senyawa

santon, seperti kalosanton F, G, H dan 3,6-dihidroksi-1,5-dimetoksisanton diisolasi dari *C. austraindicum* (Inuma et al., 1996a) serta santon monoprenilasi dan diprenilasi seperti apetalinon A, B, C dan zeylosanton dari *C. apetalum* (Inuma et al., 1996b).

Malaria adalah salah satu penyakit yang tersebar luas didunia, dan banyak menimbulkan kematian (Noble et al., 1989). Setiap tahunnya diperkirakan 300 hingga 500 juta orang terinfeksi malaria, diantaranya 2 hingga 5 juta penderitanya mengalami kematian (Winstanley et al., 2002). Penyebaran penyakit malaria banyak di daerah tropis dan subtropis (Garcia et al., 1997). Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit intraselluler *Plasmodium sp.* Parasit ini dapat menginfeksi manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang mengandung Plasmodium. Ada empat *Plasmodium sp* yang dapat menginfeksi manusia yaitu : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* dan *P. ovale* (Natadisastra et al., 1999; Bloland., 2001). Diantara keempat spesies Plasmodium tersebut, *P. falciparum* paling patogenik dan sering kali berakibat kematian (Noble et al., 1889).

Terapi klinis yang banyak dilakukan untuk malaria adalah dengan pemberian obat antimalaria yakni klorokuin dan turunannya. Namun dewasa ini telah banyak dilaporkan adanya peningkatan resistensi parasit malaria *P. falciparum* terhadap obat antimalaria klorokuin (Depkes RI, 2006). Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin pertama kali di Indonesia ditemukan di Kalimantan Timur pada tahun 1973. Resistensi ini terus menyebar ke seluruh Indonesia dan pada tahun 1990 dilaporkan telah terjadi resistensi terhadap klorokuin diseluruh provinsi di Indonesia (Depkes RI, 2006). Obat malaria lainnya yang dapat digunakan adalah primakuin, sulfadoksin-pirimetamin, namun resistensi *P. falciparum* terhadap obat-obatan ini pun telah ditemukan (Depkes RI, 2006).

Sejak beberapa tahun terakhir, WHO merekomendasikan penggunaan terapi kombinasi untuk mengatasi masalah resistensi terhadap klorokuin. Terapi kombinasi dengan artemisinin adalah terapi yang paling efektif. Meskipun belum ada laporan klinis mengenai resistensi terapi ini, namun telah ada beberapa bukti terjadinya resistensi *P. falciparum* terhadap artemisinin secara *in vitro* (Gay et al.,

1994; Jambou et al., 2005). Hal ini telah mendorong para peneliti untuk berusaha menemukan obat antimalaria baru untuk menggantikan obat antimalaria yang sudah tidak sensitif lagi. Salah satu usaha untuk menemukan obat antimalaria baru tersebut adalah melalui eksplorasi senyawa aktif dari bahan obat alam, utamanya dari tanaman obat yang secara tradisional digunakan masyarakat untuk mengobati malaria di berbagai daerah endemik di dunia. Senyawa aktif tersebut diantaranya adalah terpen, alkaloid, dan senyawa heterosiklik yang teroksigenasi, yang memiliki potensi cukup besar sebagai antimalaria (Go et al., 2003). Dewasa ini tanaman dari famili Cluciaceae banyak diteliti untuk mencari senyawa antimalaria baru. Diantaranya adalah dari marga *Calophyllum* dan *Garcinia*. (Hay et al., 2004; Elfita et al., 2009).

C. canum Hook.f. merupakan salah satu spesies yang banyak terdapat di Indonesia, khususnya di Kalimantan, Kepulauan Riau dan Sumatera (Heyne, 1987). Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi beberapa senyawa santon dari spesies ini, yakni 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroksisanton, 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton, osajasanton, dan jakaerubin (Carpenter et al., 1969).

Sejauh ini penelitian mengenai kandungan kimia dari spesies *C. canum* Hook.f. yang memiliki aktivitas antimalaria belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini akan diisolasi serta elusidasi struktur molekul kandungan kimia dari tanaman *C. canum* Hook.f. Selanjutnya kandungan kimia yang didapat di lakukan uji antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* klon 3D7 dengan metoda kultur berkelanjutan yang dimodifikasi dan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan metoda Meyer (Linn et al., 2005; Trager et al., 1976; Meyer., 1982). Pemurnian kandungan kimia dilakukan dengan cara kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis preparatif dan rekristalisasi. Elusidasi senyawa murni yakni dengan pemeriksaan fisika dan fisikokimia (Harbone, 1987; Ghisalberty, 1993).

1.2 Rumusan Masalah

Dari penelusuran kepustakaan belum ada penelitian mengenai kandungan senyawa dalam tanaman *C. canum* Hook.f. maka dicoba untuk meneliti kulit

batang tanaman ini, yang secara taksonomi berpeluang besar menemukan senyawa kimia yang kemungkinan memiliki khasiat sebagai antimalaria. Disamping itu kandungan kimia dari tanaman ini diteliti aktivitas biologi, yakni aktivitas antimalaria serta toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach, yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas kandungan kimia dari tanaman *C. canum* Hook.f.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh senyawa murni dari kulit batang tanaman *C. canum* Hook.f. yang memiliki aktivitas biologi sebagai antimalaria.
2. Menetapkan struktur kandungan kimia yang didapat.

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

Penelitian diharapkan bermanfaat dalam memberikan dukungan ilmiah dalam pemanfaatan tanaman asal Indonesia untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai bahan obat antimalaria.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Tanaman (Tjitrosoepomo, 1996)

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak Kelas	: Diapetalae
Bangsa	: Guttiferales (Clusiales)
Suku	: Guttiferae (Clusiaceae)
Marga	: Calophyllum
Jenis	: <i>Calophyllum canum</i> Hook.f.
Sinonim	: <i>Calophyllum borneens</i> Vesque (1889)
Nama daerah	: Bintangur bunga (Malaka), mentangur kera (Bangka), penaga.

2.2 Morfologi Tanaman (Soerjanegara et al., 1994)

Habitat	: Tumbuh di hutan dengan pengairan yang bagus, pada tanah liat, dan juga pada tanah yang kaya lumut atau rawa, dapat tumbuh hingga ketinggian 1200 m.
Pohon	: Tinggi sampai 35 m dan diameter batang 75 cm, ranting kurang lebih menyudut-4 dengan kuat, tunas berbulu hingga berbentuk kerucut yang sempit, berukuran (3 – 10) x 22 mm.
Daun	: Daun membulat telur atau oval berukuran (3,5 – 9) x 22 cm, membulat pada dasar dan bagian atasnya meruncing, tepi daun bergelombang kecil, dengan ukuran 10 x (18 – 21), cabang tulang daun tiap 5 mm
Bunga	: Bunga majemuk muncul pada ketiak daun, biasanya tidak bercabang, karangan bunga terdiri dari 7 bunga; bunga memiliki tepalum sebanyak 4 – 8.

Buah : Berbentuk bola atau sedikit oval, berukuran 15 x 22 cm, berbulu lebat, lapisan terluar kompak, berwarna kehijauan.

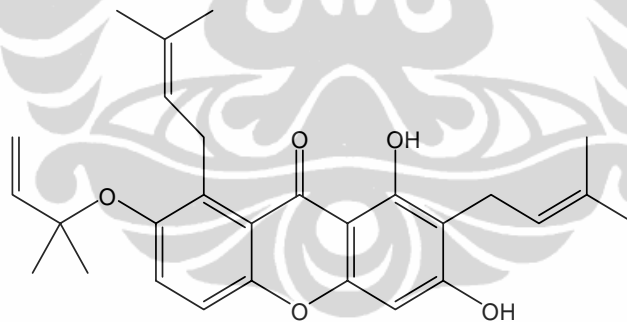
2.3 Kandungan Kimia Marga *Calophyllum*

Kandungan kimia dari marga *Calophyllum* yang telah dilaporkan adalah berupa metabolit sekunder dari kelompok santon, kumarin, poliisoprenil keton, flavonoid, biflavonoid, triterpen, asam organik dan senyawa lakton.

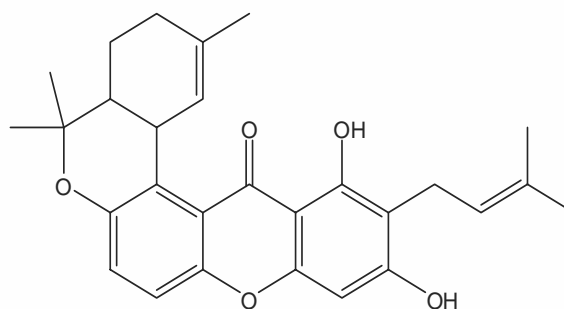
2.3.1 Senyawa Santon

Famili Clusiaceae (Guttiferae) merupakan tumbuhan penghasil santon yang besar. Dalam kurun waktu 40 tahun lebih telah dilaporkan hampir 200 jenis santon dan turunannya, berupa prenil santon. Dua marga dalam famili ini yang memberikan kontribusi sebagai tanaman penghasil santon adalah *Calophyllum* dan *Garcinia*.

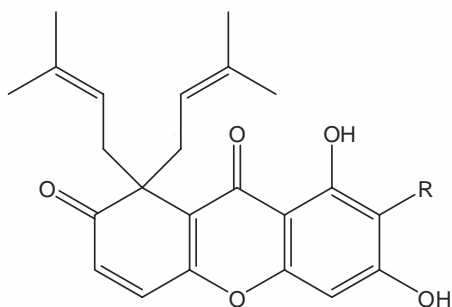
Beberapa senyawa santon yang diisolasi dari tanaman *C. apetalum* diantaranya apetalinon A (1), apetalinon B (2), apetalinon C (3) dan apetalinon D (4) dan zeylosanton (5) dan tomentonon (6) (Inuma et al., 1997).



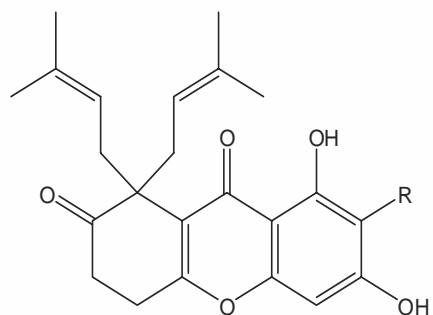
apetalinon A (1)



Apetalinon B (2)

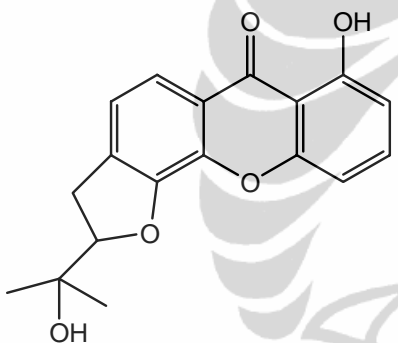


apetalinon C (3), R=isoprenil
apetalinon D (4), R=H

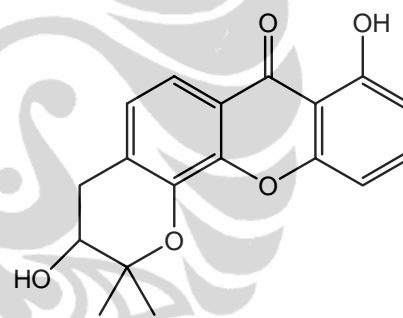


zeylosanton (5) R=isoprenil
tomentonon (6) R=H

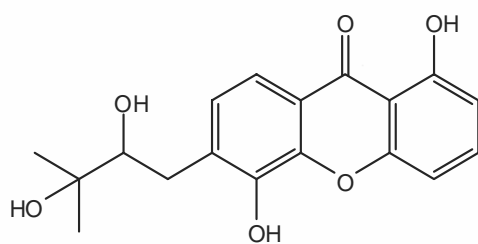
Dari batang *C. austroindicum* diisolasi senyawa santon yaitu kalosanton F (7), kalosanton G (8), kalosanton H (9), 6-hidroksi-1,3,5-trimetoksisanton (10), 3,6-dihidroksi-1,5-dimetoksisanton (11) dan 1,3,6-trihidroksi-5,7-dimetoksisanton (12) (Iinuma et al., 1996).



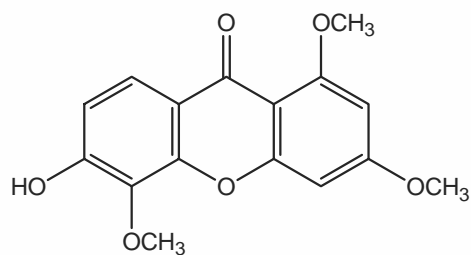
kalosanton F (7)



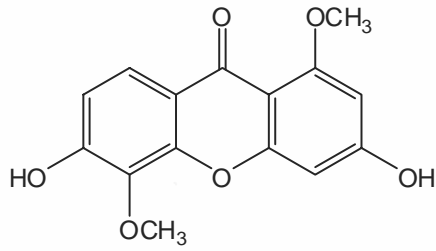
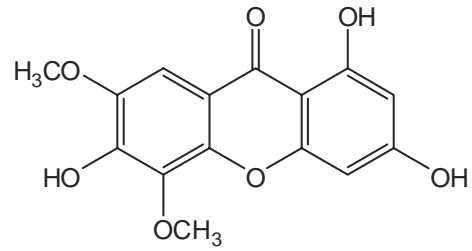
kalosanton G (8)



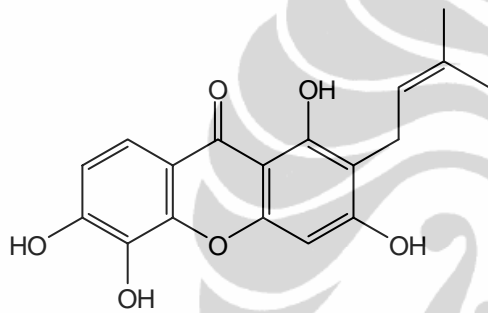
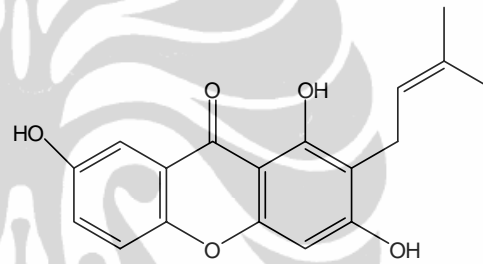
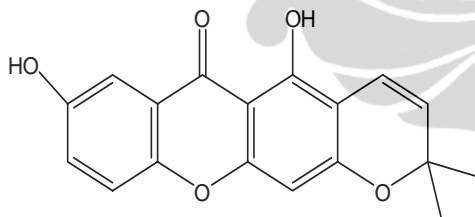
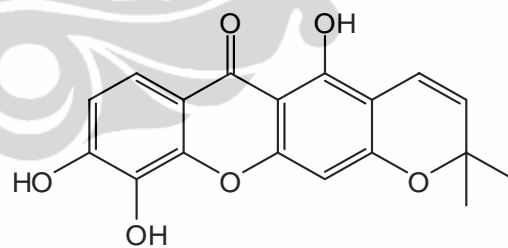
kalosanton H (9)



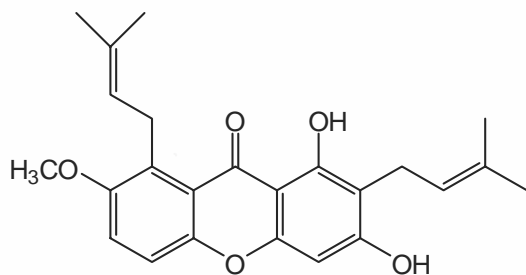
6-hidroksi-1,3,5-trimetoksisanton (10)

3,6-dihidroksi-1,5-dimetoksisantonin (**11**)1,3,6-trihidroksi-5,7-dimetoksisantonin (**12**)

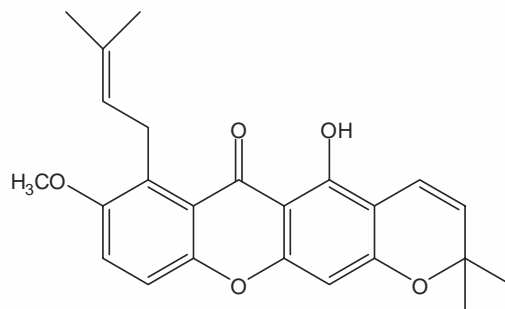
Dari *C. canum* Hook.f. telah diisolasi senyawa 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroksisantonin (**13**), 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisantonin (**14**), osajasantonin (**15**), dan jakaerubin (**16**) (Carpenter et al., 1969).

2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroksisantonin (**13**)2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisantonin (**14**)osajasantonin (**15**)jakaerubin R=H (**16**)

Senyawa kalabasantonin (**17**), kalokalabasantonin (**18**) diisolasi dari kulit akar *C. calaba* (Kumar et al., 1981).

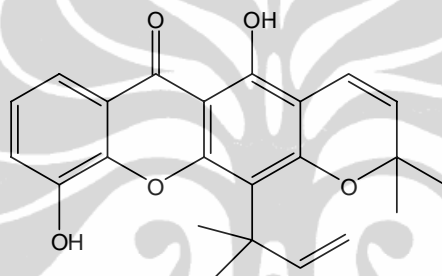


kalabasanton (17)



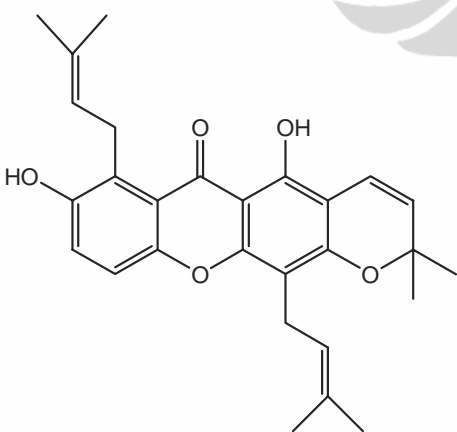
kalokalabasanton (18)

Dari kulit akar dan biji *C. inophyllum* diisolasi senyawa inosanton (19) (Yimdjo et al., 2004).

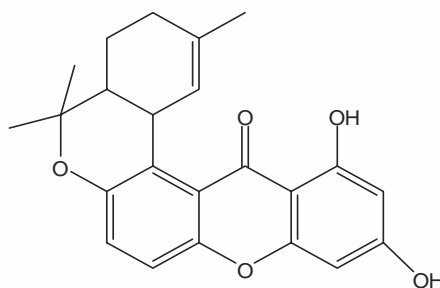


inosanton (19)

Dari akar *C. monnii* didapat senyawa diprenilkromensanton yakni dombakinasanton (20), kalozeylosanton (21) (Dharmaratne et al., 1997).

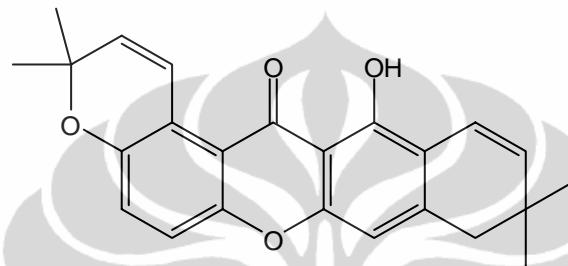
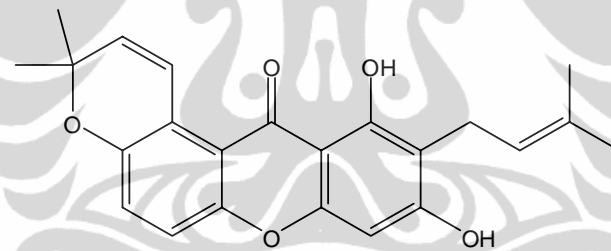
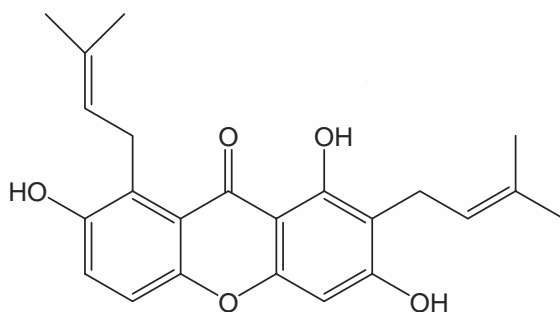
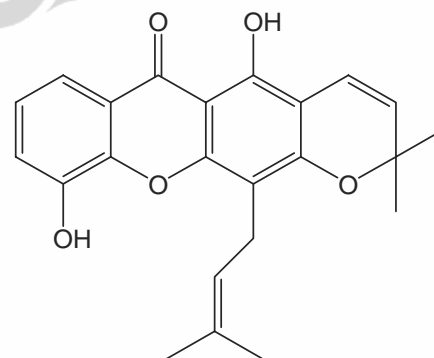


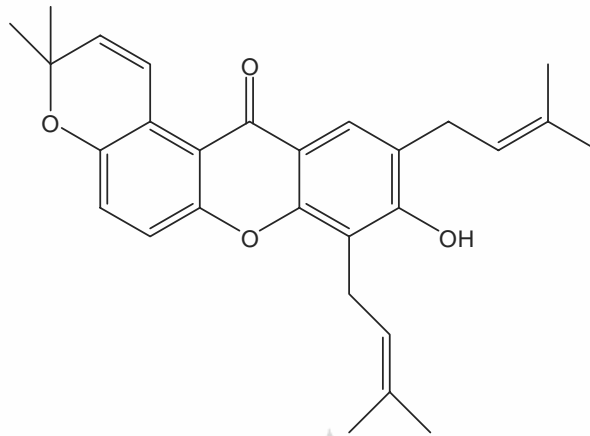
dombakinasanton (20)



kalozeylosanton (21)

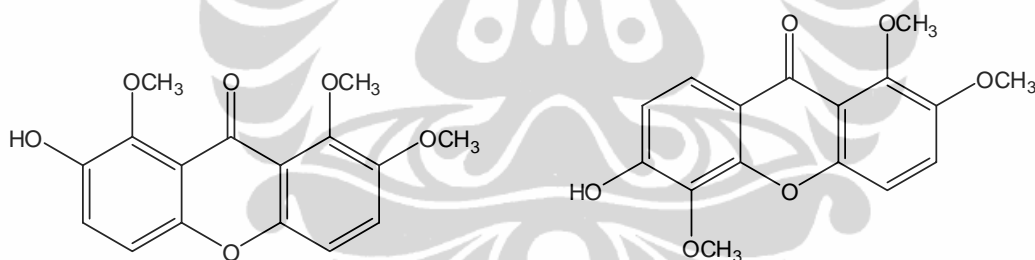
Dari kulit akar *C. moonii* (*C. soulatri* Burm.f) juga mengandung senyawa kazozeilasanton (**21**) (Abbas, 2008). Beberapa senyawa kumarin santan dari *C. moonii* yang tumbuh di Sri Lanka diantaranya kazozeilosanton (**21**), thwaitesisanton (**22**) berhasil disolasi, serta dari *C. thwaitessi* telah diisolasi beberapa senyawa diprenilksanton yaitu kalotwaitesisanton (**23**), 6-deoksi- γ -mangostin (**24**), trapezifolisanton (**25**), batukinasanton (**26**) dan kalabasanton (**17**) (Dharmaratne et al., 1995; Dharmaratne et al., 1999)

thwaitesisanton (**22**)kalotwaitesisanton (**23**)6-deoksi- γ -mangostin (**24**)trapezifolisanton (**25**)



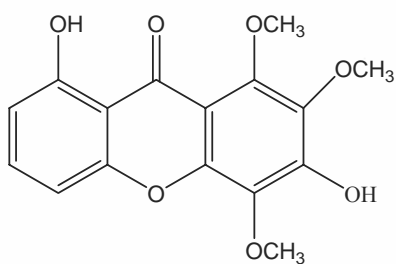
batukinasanton (26)

Dari tumbuhan *C. teysmannii* Miq. var *inophylloide* berhasil diisolasi senyawa santon yaitu : 7-hidroksi-1,2,8-trimetoksisanton (27), 6-hidroksi-1,2,5-trimetoksisanton (28), 3,8-dihidroksi-1,2,4-trimetoksisanton (29), 3-hidroksi-2,4-dimetoksisanton (30), 1,7-dihidroksi-3-metoksisanton (gentisin) (31), 2-karbometoksi-6-metoksisanton (32) (Kijjoa et al., 2000).

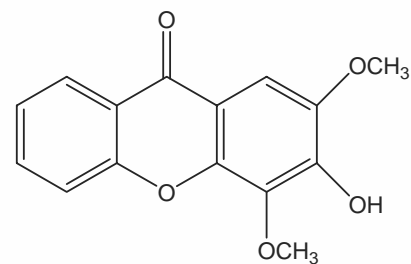


7-hidroksi-1,2,8-trimetoksisanton (27)

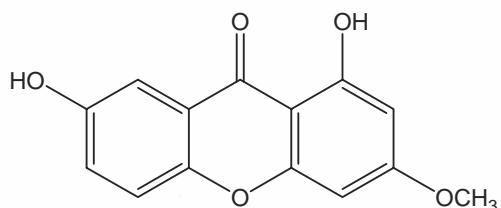
6-hidroksi-1,2,5-trimetoksisanton (28)



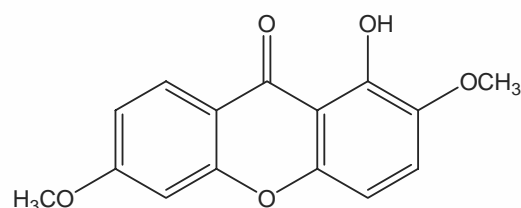
3,8-dihidroksi-1,2,4-trimetoksisanton (29)



3-hidroksi-2,4-dimetoksisanton (30)

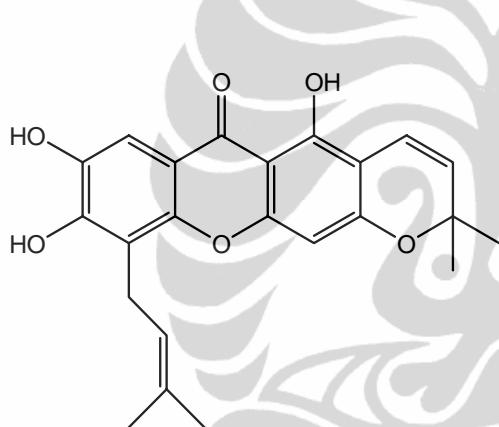


1,7-dihidroksi-3-metoksisanton (31)

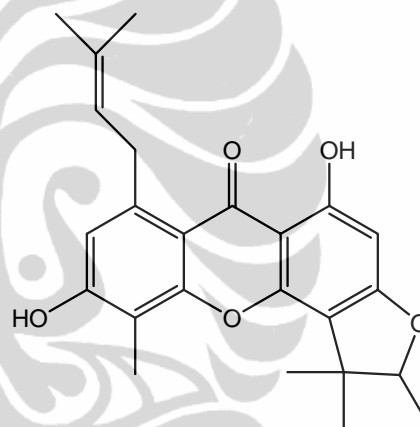


2-karbometoksi-6-metoksisanton (32)

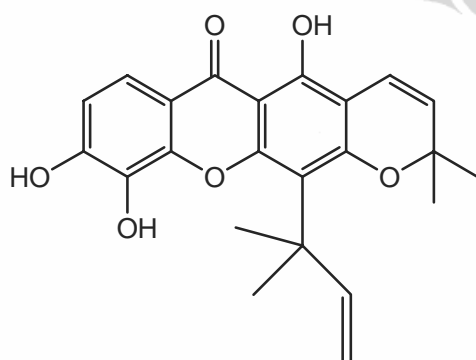
Senyawa santon lainnya yang berhasil diisolasi dari *C. zeylanicum* adalah kalosanton A (33) dan kalosanton B (34) yang diisolasi dari akar *C. inophyllum*, dan dua senyawa santon lama yaitu maklurasanton (35), metilasi senyawa 48 menghasilkan dimetoksimaklurasanton (36), trimetoksimaklurasanton (37) dan 1,5-dihidroksisanton (38) (Iinuma et al., 1994).



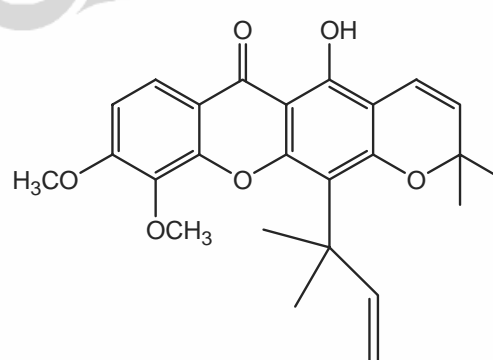
kalosanton A (33)



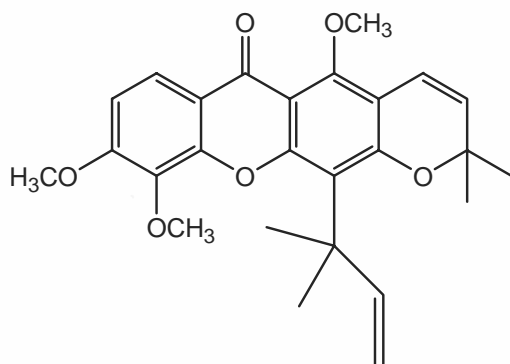
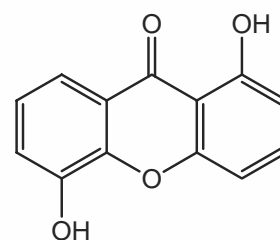
kalosanton B (34)



maklurasanton (35)

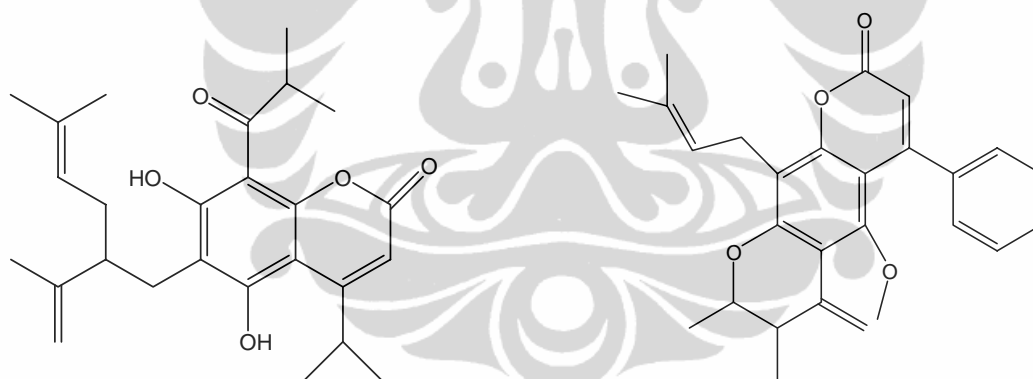


5,6-dimetoksimaklurasanton (36)

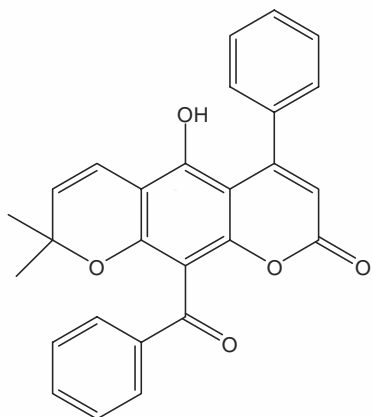
1,5,6- trimetoksimaklurasanton (**37**)1,5-dihidroksisanton (**38**)

2.3.2 Senyawa Kumarin

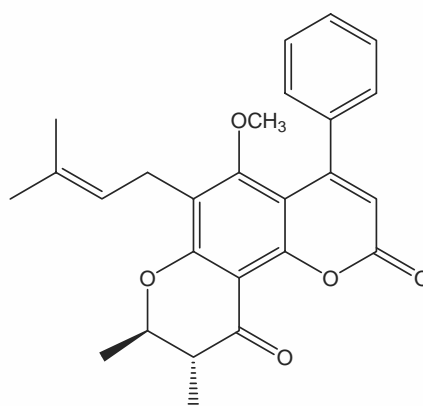
Senyawa kumarin baru berhasil diisolasi dari tanaman *C. soulattri* yakni 5,7-dihidroksi-8-isobutiril-6-(2-isopropenil-5-metilheksa-4-enil)-4-isopropil-kumarin (**39**) dan aziz kumarin (**40**) yang diisolasi dari tanaman *C. incrasaptum* (Abbas, 2008).

5,7-dihidroksi-8-isobutiril-6-(2-isopropenil-5-metilheksa-4-enil)-4-isopropil-kumarin (**39**)aziz kumarin (**40**)

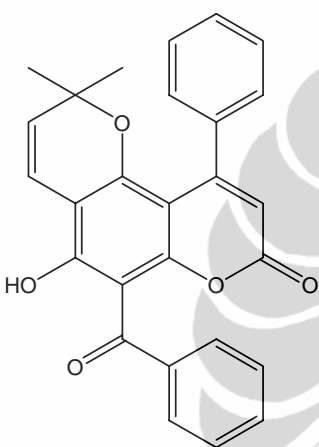
Isolasi beberapa senyawa kumarin dari kulit batang *C. teysmannii* Miq. var. *inophylloide* (Guttiferae) diperoleh teismanon A (**41**), teismanon B (**42**), kalanon (**43**), inofilum C (**44**) dan inofilum E (**45**). *C. teysmannii* Miq. Var. *inophylloide* (Cao et al., 1998a ; Cao et al., 1998b), senyawa kalaustralin (**46**) diisolasi dari *C. inophyllum* (**39**), serta (+) kalanolida A (**47**), (+) kalanolida C/kastatolida (**48a**), (+) kordatolida A (**48b**) dan inofilum B (**49**) diisolasi dari daun *C. inophyllum* (Ishikawa et al., 1999).



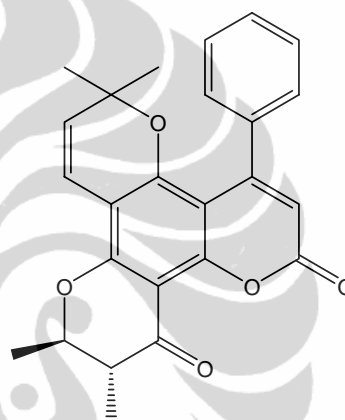
teismanon A(41)



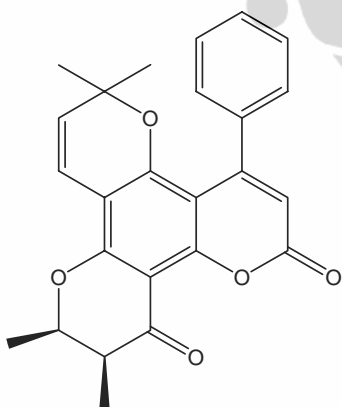
teismanon B(42)



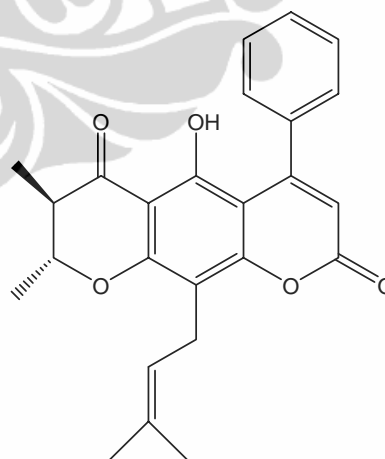
kalanon (43)



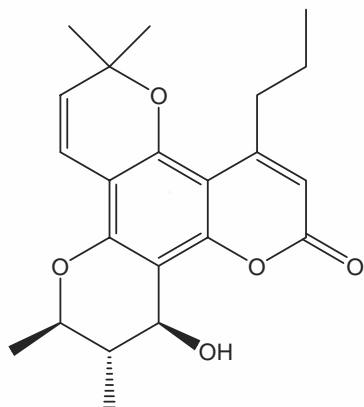
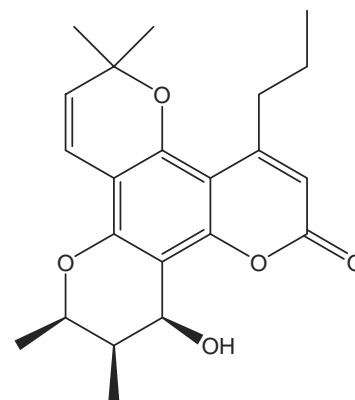
inofilum C(44)



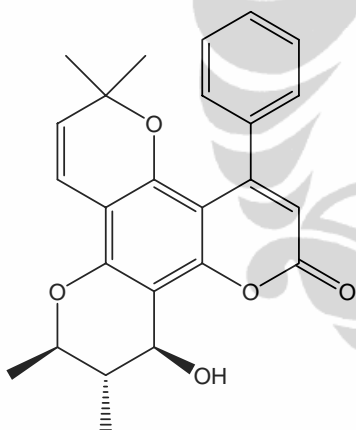
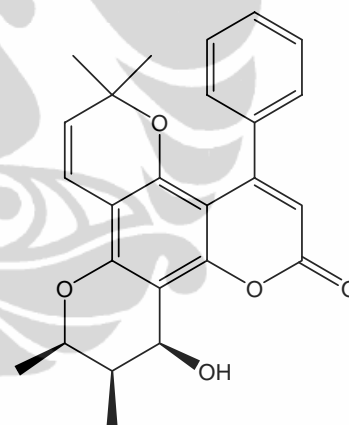
inofilum E (45)



kalaustralin (46)

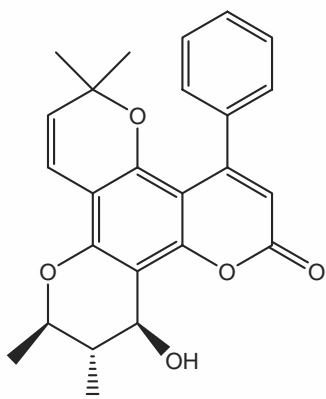
kаланolida A (**47**)kаланolida C (**48a**)
[(+) kostatolida]

Dari daun dan ranting *C. lanigerum* var. *austrocoriaceum* dan dari *C. teysmannii* berhasil diisolasi senyawa kumarin, di antaranya kаланolida A (**47**), kostatolida (**48a**), soulatrolida (**49**) nama lainnya (-)-trans-dihidroinofiloida dan inofilum B atau (+) cis-dihidroinofiloida (**50**) (Kirk et al., 1994).

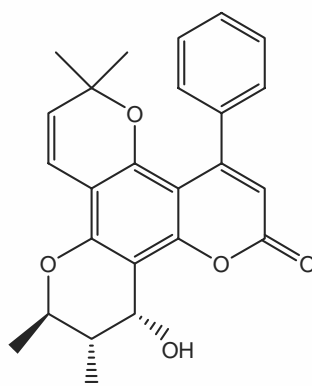
(-) Inofilum B=soulatrolida (**49**)
[(-) trans-dihidroinofiloida](+) inofilum A (**50**)
[(+) cis-dihidroinofiloida]

Senyawa soulatrolida nama lain (-)-trans-dihidroinofiloida (**49**) dan inofilum B atau nama lainnya (+)-cis-dihidroinofiloida (**50**), juga berhasil diisolasi dari daun *C. soulattri* Burm (Bandara et al., 1986).

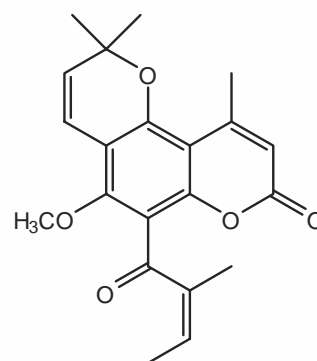
Kordatolida A (**51**), kordatolida B (**52**) dan oblongilida (**53**) telah diisolasi dari *C. cordato-oblongum* (Bandara et al., 1986).



kordatolida A (51)

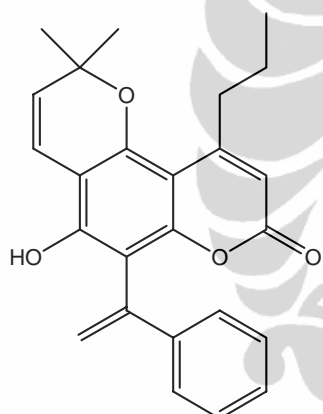


kordatolida B (52)

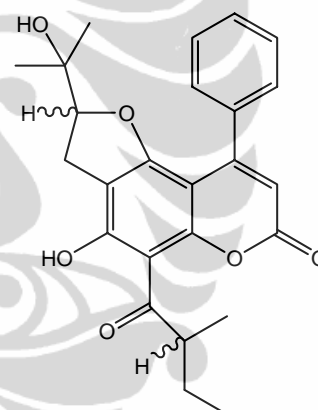


oblongilida (53)

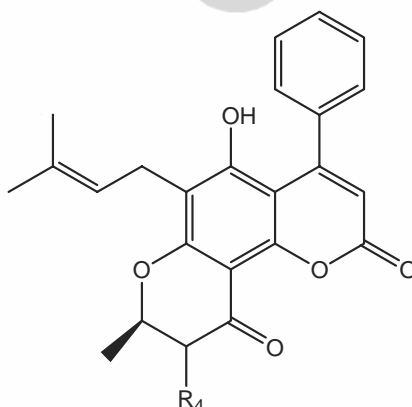
Dari kulit batang *C. brasiliense* diisolasi 3 senyawa kumarin baru yaitu senyawa brasimarin A (54), brasimarin B (55), brasimarin C (56) dan epimer pada posisi 2' dari senyawa 16 didapat senyawa (57) (Ito et al., 2003).



brasimarin A (54)



brasimarin B (55)

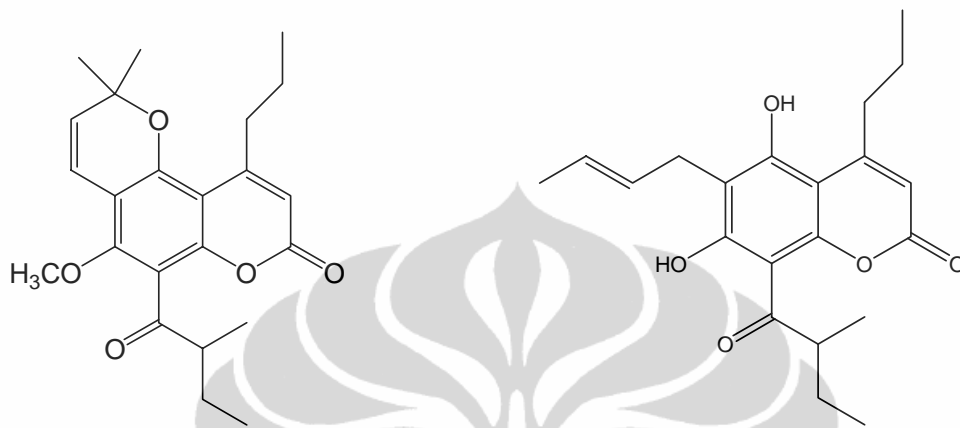
R4 : α -CH₃

brasimarin C (56)

R4 : β -CH₃

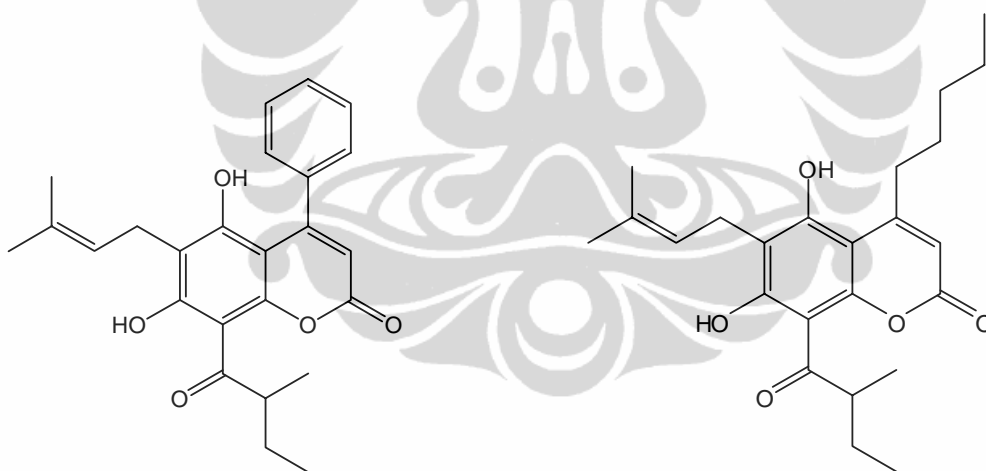
epimer brasimarin C (57)

Senyawa kumarin lain dari *C. brasiliense* juga telah berhasil diisolasi oleh Rayes-Chilpa tahun 2004 diantaranya, senyawa *n*-propil kalofiloida (**58**) dan senyawa mammea B/BB (**59**), mammea A (**60**), mammea C (**61**), mammea F (**62**) dan isomammeigin (**63**).



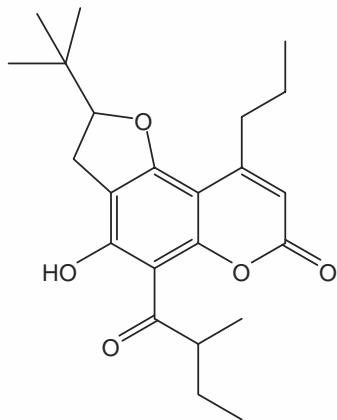
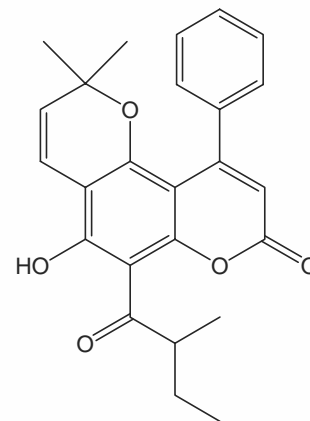
n-propilkalofiloida (**58**)

mammea B/BB (**59**)

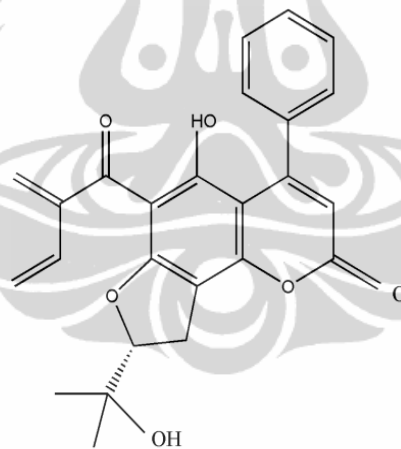


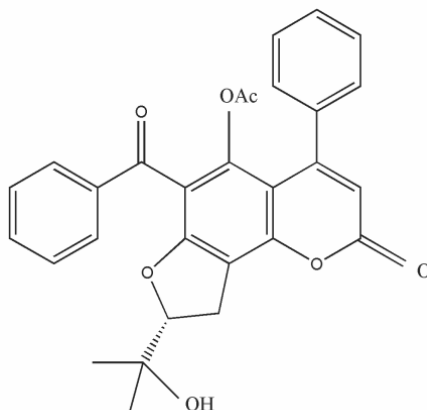
mammea A (**60**)

mammea C (**61**)

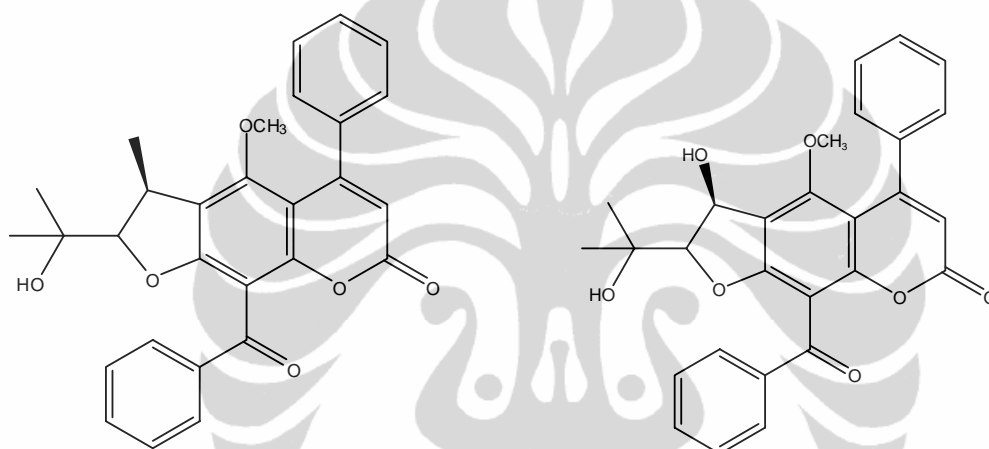
mammea F (**62**)isomameigin (**63**)

Dari kulit batang *C. teysmannii* var *inophylloide* berhasil diisolasi senyawa (-)-6-benzoil-5-hidroksi-4-fenilkolombianelin (**64a**), derivat monoasetil dari senyawa **64a** dihasilkan senyawa (**64b**), senyawa 9-benzoil-5-metoksi-4-fenilnodakenetin (**65**), 9-benzoil-6-hidroksi-5-metoksi-4-fenilnodakenetin (**66**) serta isokalanon (**67**) (Cao et al., 1998b).

(-)-6-benzoil-5-hidroksi-4-fenilkolombianelin (**64a**)

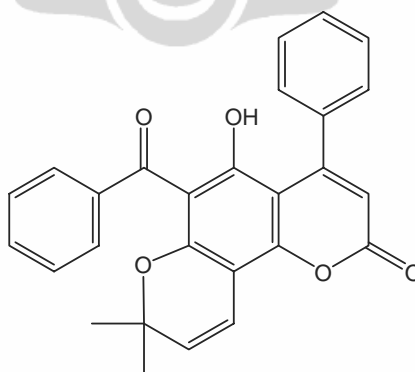


asetil-6-benzoil-5-hidroksi-4-fenilkolombianelin (**64b**)



9-benzoil-5-metoksi-4-fenilnodakenetin (**65**)

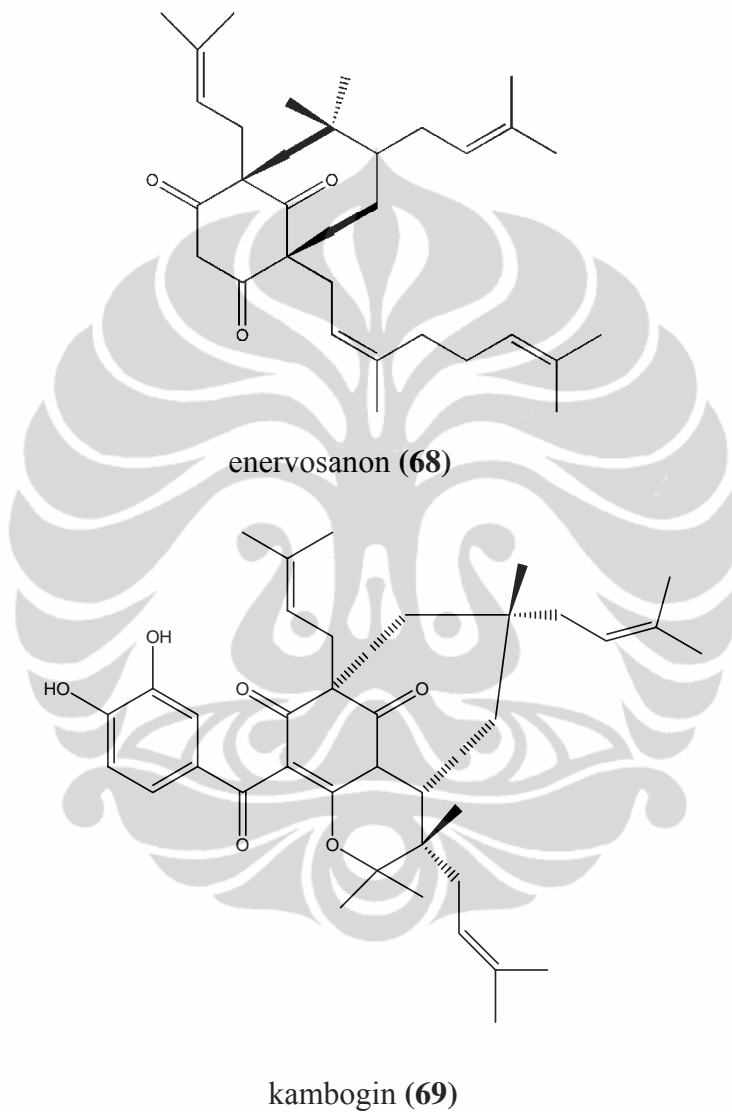
9-benzoil-6-hidroksi-5-metoksi-4-fenilnodakenetin (**66**)

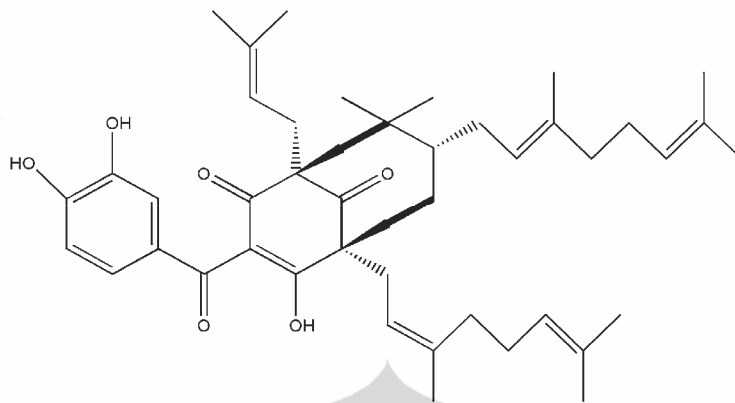


isokalanon (**67**)

2.3.3. Senyawa Poliisoprenil Keton

Beberapa senyawa poliisoprenil keton telah berhasil diisolasi dari kulit batang *C. enervosum* (Taher et al., 2005). Senyawa yang didapat adalah enervosanon (**68**), kambogin (**69**) dan senyawa guttiferon (**70**).

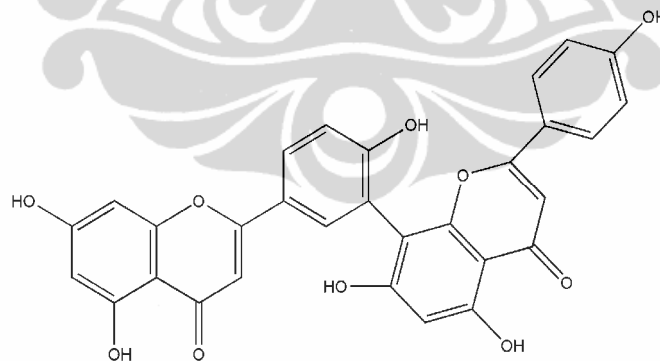




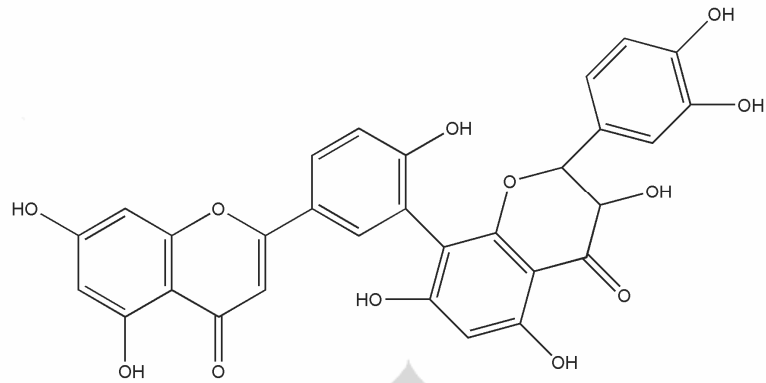
guttiferon (70)

2.3.4. Senyawa Flavonoida dan Biflavonoida

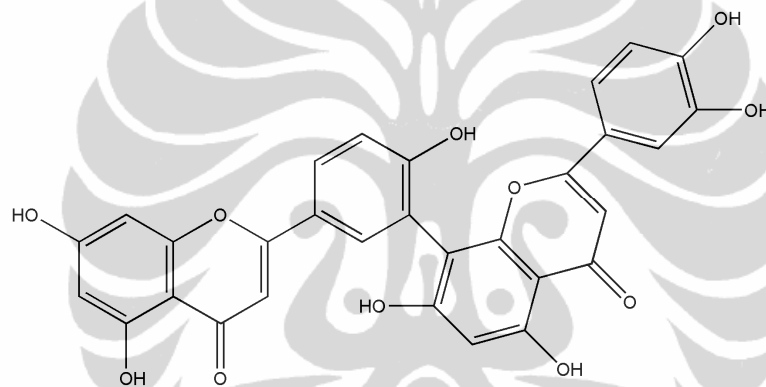
Senyawa flavonoida yang berhasil diisolasi dari daun *C. brasiliense* yaitu amentoflavon (71) oleh Rayes-Chilpa pada tahun 2004, serta dari *C. calaba* diisolasi senyawa biflavonoida GB-2a (72) dan merelloflavon (73) oleh Gunatilaka, isolasi dilakukan pada tahun 1984. (Rayes-Chilpa et al., 2004; Gunatilaka et al., 1984).



amentoflavon (71)

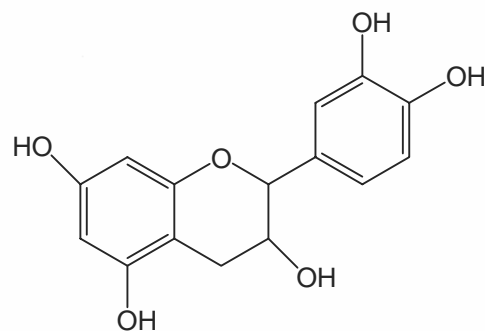


biflavonoida GB-2a (72)



merelloflavon (73)

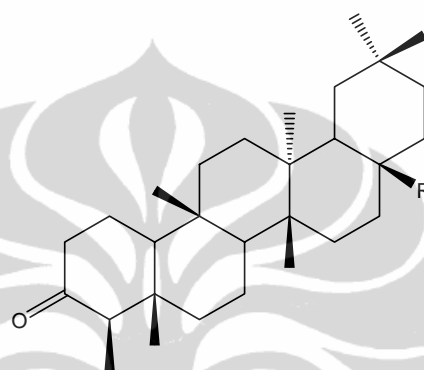
Epikatekin (74) termasuk golongan flavonoida, epikatekin telah berhasil diisolasi dari *C. inophyllum* (Inuma et al., 1994).



Epikatekin (74)

2.3.5. Senyawa Triterpen

Senyawa triterpen dari daun *C. brasiliense*, yaitu kanofilol (**75**), kanofillal (**76**) dan friedelin (**77**) (Gunatilaka et al., 1984). Senyawa triterpen lainnya adalah friedelin (Δ :A-friedo-oleanan-3-on), kanofillol (28-hidroksi-D:A-friedo-oleanan-3-on), kanofillal (28-okso-D:A-friedo-oleanan-3-on) dan sitosterol berhasil diisolasi dari *C. soulattri* Burm f. (Bandara et al, 1986).



Kanofillol R=CH₂OH (**75**)

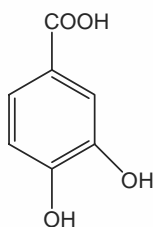
Kanofillal R=CHO (**76**)

Friedelin R=CH₃ (**77**)

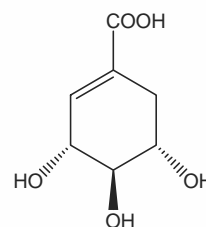
Dari kulit batang *C. verticillatum* telah diisolasi senyawa terpenoid dari ekstrak metilena klorida yaitu friedelin (D:A-friedo-oleanan) dan α -amirin (Ravelonjato et al., 1987).

2.3.6. Senyawa Asam Organik

Daun *C. brasiliense* mengandung asam protokatekuat (**78**) dan asam shikimat (**79**) (Rayes-Chilpa et al., 2004).

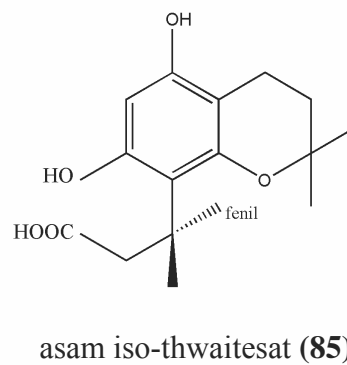
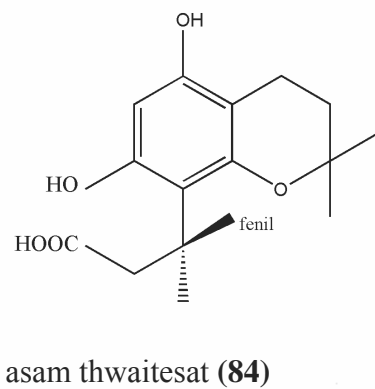
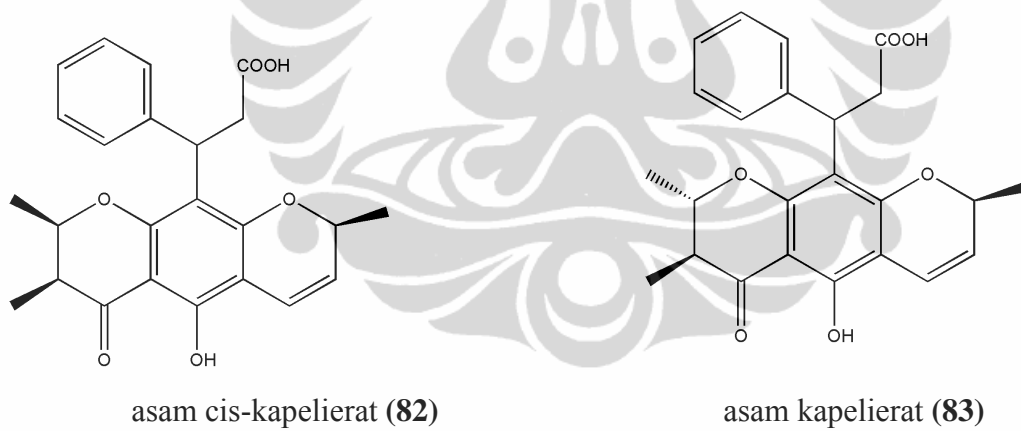
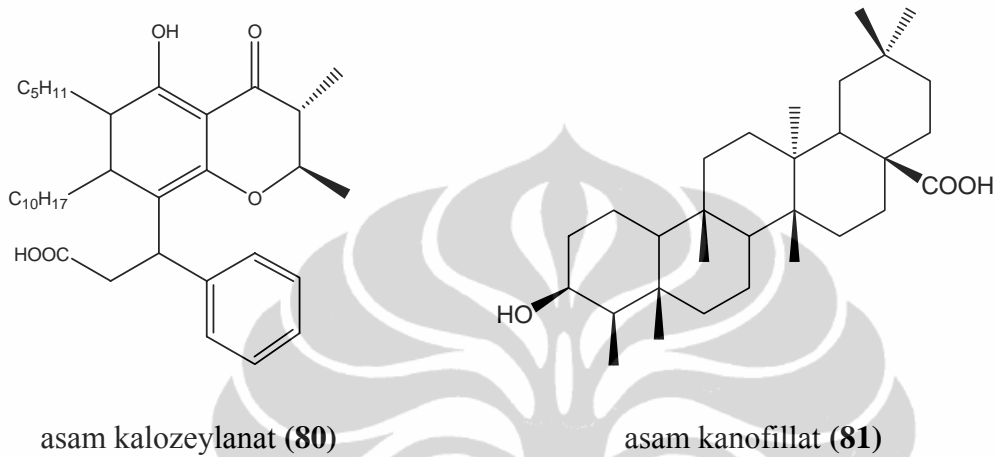


asam protokatekuat (**78**)

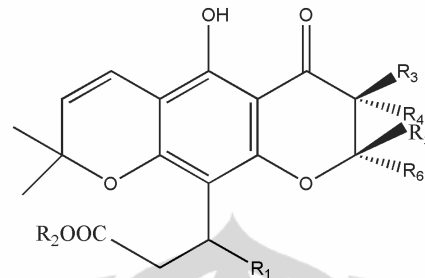


asam shikimat (**79**)

Dari daun *C. thwaitesii* dan *C. lankaensis* telah diisolasi asam kalozeylanat (**80**). Dari daun *C. mooni* diperoleh asam kanofillat (**81**), asam cis-kapelierat (**82**) dan asam kapelierat (**83**) (Dharmaratne et al., 1984). Asam thwaitesat (**84**) telah diisolasi dari *C. thwaitesii*, asam thwaitesat (**84**) dan asam iso-thwaitesat (**85**) juga telah diisolasi dari spesies *C. calaba* (Gunatilaka et al., 1994).



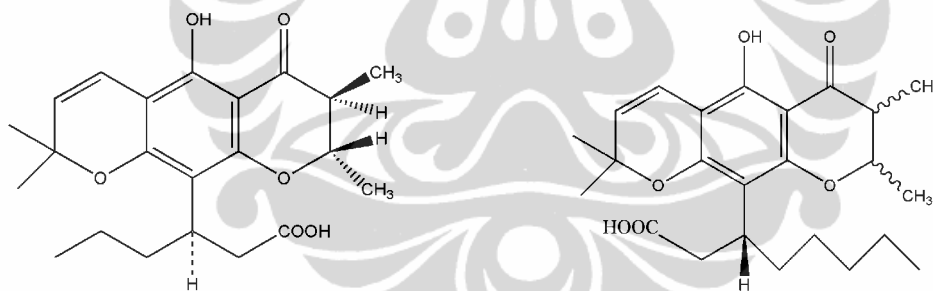
Dari kulit batang *C. cordato oblongum* berhasil diisolasi senyawa baru asam kromen yaitu berupa asam isokordato-oblongat metil ester (**86**) dan asam kordato-oblongat metil ester (**87**) (Dharmaratne et al., 1999)



Asam isokordato-oblongat (**86**) (R1, R2, R3, R5 : CH3, R4 dan R6 : H)

Asam kordato-oblongat (**87**) (R1, R2, R3, R6: CH3, R4, R5 : H)

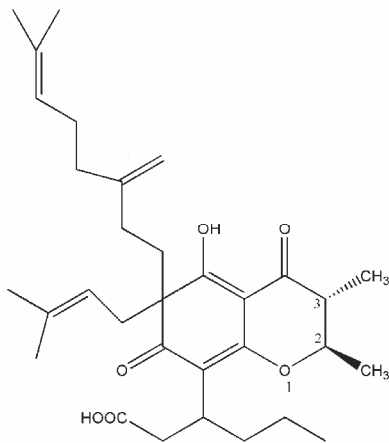
Senyawa asam isoapetalat (**88**) telah diisolasi dari *C. apetalum*. Asam isoapetalat juga ditemukan dalam kulit batang *C. chapelleri*, *C. brasiliense* dan *C. cuneifolium*, sedangkan asam blankoat (**89**) yang berupa cairan kental berwarna kuning berhasil diisolasi dari *C. blancot* dan *C. brasiliense*.



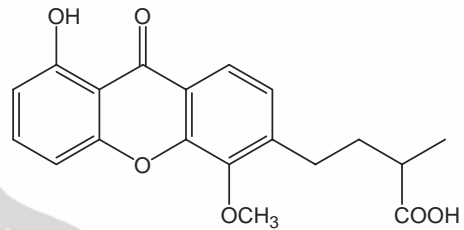
asam isoapetalat (**88**)

asam blankoat (**89**)

Asam brasiliensat (**90**) dan asam isobrasiliensat telah diisolasi dari getah *C. brasiliense*. Asam skriplitifolat (**91**) telah berhasil diisolasi dari inti kayu *C. scriblitifolium*, *C. calaba*, *C. soulatrii* Burm. f dan *C. cordato-oblongum*.



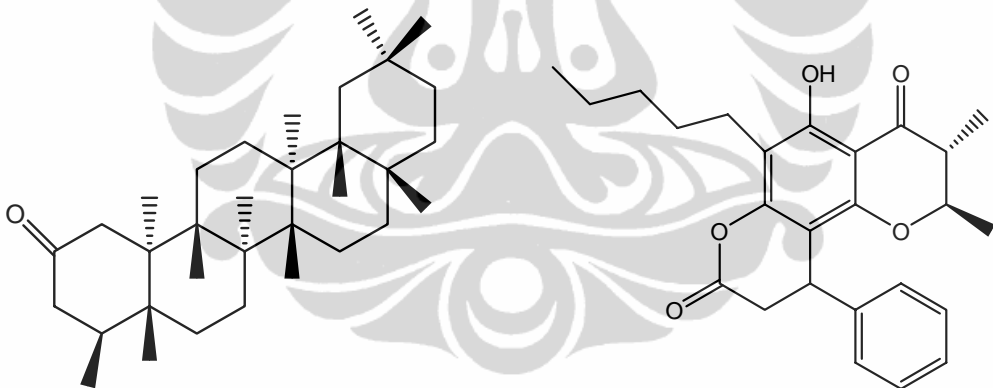
Asam brasiliensat (90)



Asam skriplitifolat (91)

2.3.7. Senyawa Lakton

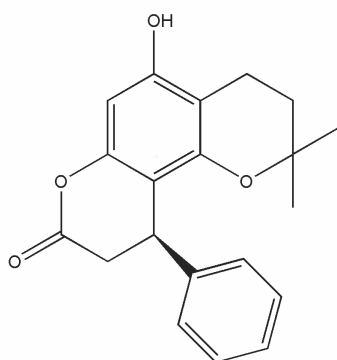
Dari daun *C. apetalum* berhasil diisolasi apetalakton (92). Senyawa kalozeylakton (93) dari kulit batang *C. lankaensis* (Dharmaratne et al., 1984).



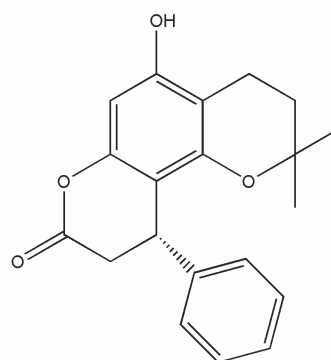
apetalakton (92)

kalozeylanolakton (93)

Senyawa thwaitesaklakton (94) dan isothwaitesaklakton (95) telah diisolasi dari *C. lankaensis* dan *C. thwaitesii* (Dharmaratne et al., 1984).



thwaitesaklakton (94)



isothwaitesaklakton (95)

2.4 Bioaktivitas Senyawa Marga *Calophyllum*

Penelitian tentang aktivitas dari senyawa kimia yang terdapat pada marga *Calophyllum* banyak yang memperlihatkan aktivitas biologis yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat. Beberapa aktivitas yang diperlihatkan adalah aktivitas antimalaria, antitumor, anti-HIV, antibakteri dan sitotoksik.

2.4.1. Aktivitas Antimalaria

Dari 7 senyawa santon yang diisolasi dari *C. caledonicum*, tiga diantaranya memperlihatkan aktivitas antimalaria yang menarik diantaranya adalah dimetilkalabasanton, kalothwaitesisanton dan 6-deoksi- γ -mangostin (Hay et al., 2004). Uji antimalaria yang dilakukan terhadap *P. falciparum* dengan IC_{50} masing masingnya 0,9, 1,0 dan 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2. Aktivitas Sitotoksik

Beberapa senyawa kumarin yang diisolasi dari *C. teysmannii* var. *inophylloide* memperlihatkan aktivitas sitotoksik, senyawa kalanon dan senyawa trans soulatrolida yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang cukup potensial (Cao., 1994).

2.4.3. Aktivitas Antitumor

Delapan macam senyawa turunan 4-substitusi kumarin, terdiri dari tiga senyawa 4-fenilkumarin, yaitu senyawa brasimarin B, brasimarin C dan kalanon,

serta lima senyawa 4-propilkumarin yaitu senyawa kalanolida A, brasimarin A, kalanolida C, senyawa n-propil kalofiloida dan senyawa mammae B/BB telah diuji aktivitasnya dalam menghambat aktivitas virus Epstein Barr (EBV-EA). Virus Epstein Barr (EBV-EA) adalah virus penyebab tumor atau kanker. (Rayaes-Chilpa et al., 2004).

Aktivitas anti tumor senyawa triterpen, kumarin dan senyawa asam organik dari daun *C. brasiliense* telah dilaporkan (Rayaes-Chilpa et al., 2004). Senyawa mammae C merupakan senyawa yang paling aktif sebagai sitotoksik dibandingkan dengan senyawa lainnya, yaitu dengan hambatan pertumbuhan sel tumor 89,1-100%, diikuti oleh mammae A (88,6-96,4%) dan mammae F 48,4-69,5%. Triterpen friedelin menghambat 61,9% sel tumor PC3, kurang menghambat sel tumor U251 dan tidak aktif menghambat K562, tetapi senyawa kanofillol dan asam shikimat dan asam protokatekat tidak aktif menghambat pertumbuhan sel tumor PC3, K562 dan U251 (Rayaes-Chilpa et al., 2004).

2.4.4. Aktivitas Anti-HIV

Senyawa triterpen, kumarin dan senyawa asam organik dari *C. brasiliense* sebagai anti HIV/ antiretroviral (Rayaes-Chilpa et al., 2004). Senyawa tersebut diantaranya isomameigin (Guilet et al., 2001). Aktivitas anti HIV tipe 1 yang sangat kuat ditunjukkan oleh senyawa (+)kalanolida A, kastatolida, soulatrolida dan (+)inophyllum B dengan konfigurasi 10R, 11S, 12S.

2.4.5. Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri diperlihatkan oleh beberapa kandungan kimia dari *C. inophyllum* diantaranya senyawa santon, kalofilal, 4-fenil kumarin dari beberapa senyawa santon diantaranya inosanton, dua turunan santon (kalosanton A, maklura santon), tiga derivat asam kalofilat (asam kalofinat, asam brasiliensat, inofillum C dan inofillum E). Aktivitas antibakteri terlihat jelas terhadap *S. aureus*, sedangkan senyawa inosanton dan maklurasanton tidak mempunyai aktivitas antibakteri. Senyawa kalofiloid bersifat sangat toksik terhadap KB sel line dengan $IC_{50} = 3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, senyawa lain seperti kalosanton A, asam kalofinat, asam brasiliensat dan asam inofilloida bersifat toksik dengan IC_{50} masing-

masingnya adalah 7,4, 10,5, 11,0 dan 9,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sedangkan kalaustralin dan inofillum E tidak bersifat toksik ($\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Yimdjo et al., 2004).

Aktivitas antibakteri senyawa prenilsanton dari *C. thwaitesii* dan *C. moonii* terhadap bakteri Gram (+), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), dari hasil percobaannya menunjukkan bahwa senyawa prenilsanton seperti thwaitesisanton, kalothwaitesisanton, trapezifolisanton, kalobasanton, tidak mempunyai aktivitas antibakteri, tetapi senyawa santon tanpa prenil yaitu kalozeylosanton mempunyai aktivitas antibakteri. Senyawa 6-dioksi- γ -mangostin juga mempunyai aktivitas antibakteri, tetapi aktivitas senyawa 6-dioksi- γ -mangostin tidak signifikan dibandingkan dengan standar metisilin, vankomisin, gentamisin. Sedangkan senyawa-senyawa lain tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri (Dharmaratne et al., 1999).

2.5. Ekstraksi dan Fraksinasi

2.5.1. Ekstraksi (Gritter et al., 1987; Adnan, 1997)

Proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan lain-lain menggunakan pelarut tertentu dinamakan dengan ekstraksi. Beberapa metoda yang dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa kimia diantaranya maserasi, sokletasi, perkolasi dan perebusan.

Maserasi merupakan proses penyarian sederhana yaitu dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai selama 3-5 hari. Pelarut akan menembus ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan larutan di luar sel maka larutan dengan konsentrasi yang tinggi akan didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Metoda maserasi ini memiliki keuntungan yakni, teknik pengerjaan dan alat yang digunakan sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil.

Sokletasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat soklet. Pada cara ini pelarut dan sampel ditempatkan secara terpisah. Prinsipnya adalah penyarian yang dilakukan berulang-ulang sehingga

penyarian lebih sempurna dan pelarut yang digunakan relatif sedikit. Tapi metoda sokletasi ini tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang termolabil

Perkolasi merupakan teknik penyarian dengan pelarut organik menggunakan alat perkolator. Pada cara ini pelarut dialirkan melewati sampel sehingga penyarian lebih sempurna. Tapi metoda ini membutuhkan pelarut yang relatif banyak.

Perebusan merupakan teknik penyarian menggunakan pelarut air. Pada cara ini sampel direndam dengan pelarut kemudian dipanaskan sampai mendidih. Metoda perebusan merupakan metoda yang paling kuno dan sekarang jarang digunakan, karena proses penyarian kurang sempurna dan tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang termolabil.

2.5.2. Fraksinasi (Gritter et al., 1987)

Fraksinasi pada prinsipnya adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Pelarut yang umum dipakai untuk fraksinasi adalah *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. Untuk menarik lemak dan senyawa non polar digunakan *n*-heksana, etil asetat untuk menarik senyawa semipolar, sedangkan butanol untuk menarik senyawa-senyawa polar. Dari proses fraksinasi ini dapat diduga sifat kepolaran dari senyawa yang akan dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa-senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut yang non polar sedangkan senyawa-senyawa yang polar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga. Tiap-tiap fraksi diuapkan sampai kental dengan penguap putar pada suhu kurang lebih 50°C.

2.6. Metoda Pemisahan dan Pemurnian (Gritter et al., 1987; Silverstein et al., 1991)

Metoda yang umum digunakan untuk memisahkan komponen-komponen senyawa, yaitu metoda kromatografi. Untuk tujuan kualitatif dapat digunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Sedangkan untuk pemisahan senyawa dalam jumlah besar dapat digunakan kromatografi kolom.

Pemisahan pada kromatografi berdasarkan pada perbedaan distribusi komponen pada fase diam dan fase gerak. Fase diam (adsorban) dapat berupa zat padat yang disusun secara merata di dalam suatu kolom (kromatografi kolom) dan fase gerak berupa eluen yang akan lewat di dalamnya akibat pengaruh gaya gravitasi, atau berupa plat tipis (Kromatografi Lapis Tipis) dimana eluen dibiarkan meresap naik berdasarkan daya kapilaritas. Komponen yang akan dipisahkan mempunyai aktivitas yang berbeda terhadap adsorban sehingga komponen yang non polar dan yang polar akan terpisah. Pada kromatografi kolom fase diam yang digunakan dapat berupa silika gel. Sedangkan fase geraknya dapat dimulai dari pelarut non polar kemudian kepolaran ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut yang berbeda kepolarannya dengan perbandingan tertentu sesuai dengan tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Kromatografi lapis tipis dapat dipakai untuk memilih sistem pelarut yang akan digunakan pada kromatografi kolom.

Fraksi yang diperoleh dari kolom kromatografi ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang memiliki pola kromatogram yang sama digabung, kemudian pelarutnya diuapkan sehingga akan diperoleh beberapa fraksi. Noda pada plat KLT dideteksi dengan lampu ultraviolet $\lambda_{254/366}$ untuk senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor, dengan penampak noda seperti iod, FeCl_3 , H_2SO_4 dalam metanol 10%.

Senyawa hasil isolasi sulit didapatkan berupa senyawa murni, karena terdiri dari banyak senyawa gabungan. Untuk senyawa berbentuk kristal pemurniannya dapat dilakukan dengan rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat utama yang dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok. Pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan dimurnikan. Adanya perbedaan kelarutan akibat pemanasan atau penambahan pelarut lain akan menyebabkan senyawa utama akan mengkristal lebih dahulu. Proses rekristalisasi ini diulang beberapa kali sehingga didapatkan senyawa berbentuk kristal yang lebih murni dan ditandai dengan jarak leleh yang tajam.

2.7. Karakterisasi senyawa murni (Dachriyanus., 2004; Hesse., 1991)

Karakterisasi yang dilakukan terhadap senyawa murni yakni dengan analisis fisika yakni dengan penentuan titik leleh, analisis fisiko kimia dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer inframerah, spektrometer resonansi magnet inti proton, spektrometer resonansi magnet inti karbon, spektrometer massa.

2.7.1. Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer ultraviolet (UV-VIS) dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan analisa kuantitatif, tapi penggunaannya dalam penentuan struktur senyawa organik masih terbatas. Senyawa-senyawa yang dapat dianalisa dengan spektrofotometer UV-VIS adalah senyawa-senyawa yang mempunyai gugus kromofor. Spektrofotometer UV-VIS digunakan untuk mengukur transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan elektronik. Transisi tersebut biasanya antara orbital ikatan (orbital pasangan bebas) dengan orbital non ikatan (orbital anti ikatan). Keuntungan selektif dari spektrofotometer UV-VIS adalah dapat menentukan gugus karakteristik dalam molekul-molekul yang sangat kompleks. Parameter yang diperoleh dari spektrofotometer UV-VIS adalah harga panjang gelombang maksimum (λ_{mak}) dan absorban (A) dari senyawa yang dianalisa.

2.7.2. Spektrofotometer Inframerah

Spektrofotometer inframerah dapat digunakan untuk menentukan gugus fungsi yang terdapat pada senyawa organik, tapi penggunaannya dalam penentuan struktur senyawa organik masih terbatas

Spektrofotometer inframerah berfungsi mengukur perubahan vibrasi ikatan antara atom-atom yang ada dalam senyawa organik. Parameter yang ditentukan adalah bilangan gelombang (cm^{-1}) dari puncak-puncak yang muncul pada spektrum inframerah.

2.7.3. Spektrometer Resonansi Magnet Inti

Resonansi Magnet Inti atau NMR adalah sifat suatu magnet inti yang terdapat pada ruang dan pancaran elektromagnetik, yang menyebabkan inti menyerap energi dari elektromagnetik dan memancarkan energi tersebut ke luar. Radiasi energi tersebut adalah pada frekwensi resonansi spesifik yang tergantung

dengan kekuatan medan magnet dan faktor lainnya. Hal ini menyebabkan observasi spesifik sifat kuantum mekanis magnet dari suatu inti atom.

Spektrometer resonansi magnet inti adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mendapatkan informasi fisika, kimia, elektronik dan struktur tentang suatu molekul yang berhubungan dengan pergeseran kimianya pada frekwensi resonansi dari inti pada sampel. Teknik ini dapat memberikan informasi detail mengenai topologi, dinamika dan struktur tiga dimensi molekul dalam larutan ataupun dalam bentuk padat.

2.7.4. Spektrometer Massa

Spektroskopi massa adalah teknik analisis untuk menentukan komposisi dasar dari suatu sampel atau molekul. Spektrometer massa digunakan untuk penentuan berat molekul suatu senyawa. Prinsipnya adalah ionisasi senyawa kimia untuk menghasilkan muatan atau fragmen molekul dan penentuan massa per muatan.

Alat spektrometer massa terdiri dari tiga bagian, yakni : 1). Sumber ion, yang dapat merubah fase sampel (molekul) menjadi ion. 2). Elektromagnetik, yang memisahkan ion dari massa. 3). Bagian detektor, yang menentukan nilai dari jumlah indikator yang menyediakan data untuk perhitungan keberadaan ion yang ada. Spektrometer massa dapat digunakan untuk keperluan kualitatif dan kuantitatif.

2.8. Tinjauan Umum Malaria

Malaria adalah penyakit endemik pada daerah tropis dan subtropis (Garcia et al., 1997). Malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit intraselluler *Plasmodium sp.*

Jenis Plasmodium yang penyebab malaria pada manusia :

1. *P. vivax*

Malaria vivax, sederhana, jinak atau tertian, merupakan penyebab kira kira 43 % kasus malaria pada manusia.

2. *P. malariae*

Malaria malariae, quartana, menyebabkan kira kira 7 % malaria di dunia.

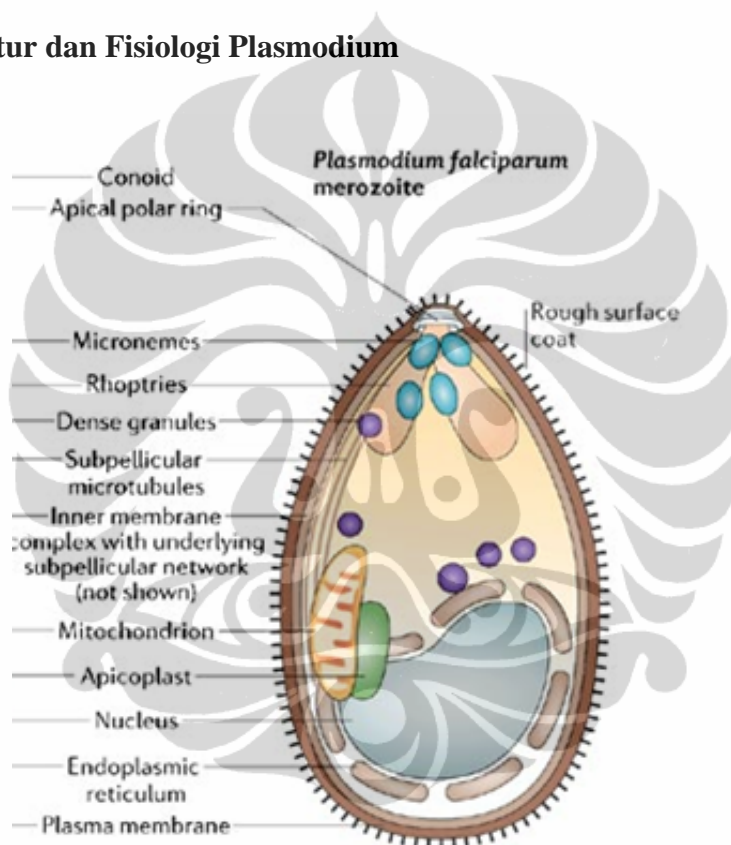
3. *P. falciparum*

Malaria falciparum, ganas, tropika, adalah malaria yang paling patogenik dan seringkali berakibat fatal dan menyebabkan kematian. Plasmodium ini merupakan penyebab separuh kasus malaria pada manusia.

4. *P. ovale*

Malaria ovale atau tertiana, jarang ditemui dan pada umumnya terbatas di Afrika dan pulau di Pasifik Barat.

2.8.1. Struktur dan Fisiologi Plasmodium



[diunduh dari www.nature.com, pada Februari 2010]
Gambar 2.1 Struktur merozoit *Plasmodium falciparum*

2.8.2. Fisiologi Plasmodium (Noble et al., 1989)

Selama endositosis, tetesan tetesan kecil sitoplasma inang ditelan melalui invaginasi membran plasma, dengan pembentukan vakuola - vakuola makanan. Hemoglobin dan protein hospes lainnya yang dimakan dan dicernakan di dalam

vakuola - vakuola ini oleh protease parasit dan memberikan sebagai sumber utama asam amino bebas untuk biosintesis protein plasmodium. Hemozoin sebagai hasil samping degradasi hemoglobin yang tidak larut dapat dilihat sebagai endapan berpigmen gelap dalam sitoplasma sel inang. Sintesis protein dalam Plasmodium adalah khas, dimana tidak memerlukan penggunaan organel inang tambahan. Prekursor untuk sintesis lipid seperti asam lemak bebas, kolesterol diambil dari sel inang. Parasit Plasmodium membutuhkan asupan gula sederhana yang berkelanjutan untuk produksi energi, karena Plasmodium tidak menyimpan karbohidrat sebagai polisakarida. Di dalam sel inang, plasmodium mengurai glukosa dengan cara anaerobik konvensional yang menghasilkan adenosin trifosfat dan asam laktat.

2.8.3. Daur Hidup Plasmodium (Noble et al., 1989)

Daur hidup Plasmodium dimulai dari zigot di dalam lambung nyamuk betina *Anopheles*. Zigot tersebut aktif dan bergerak di dalam lambung usus tengah. Parasit pada stadium ini dinamakan ookinete. Di bawah epitel usus, ookinete membulat, membentuk kista disebut ookista. Didalam ookista terdapat beratus ratus sporozoit. Fase sporogoni di dalam daur hidup ini memerlukan waktu 7 sampai 10 hari, dan selama itu, infektifitas sporozoit naik lebih dari 10.000 kali. Sporozoit memasuki seluruh tubuh nyamuk, banyak diantaranya masuk kedalam kelenjar ludah dan dengan demikian berada di dalam posisi yang baik untuk menginfeksi hospes berikutnya saat nyamuk menghisap darah inang.

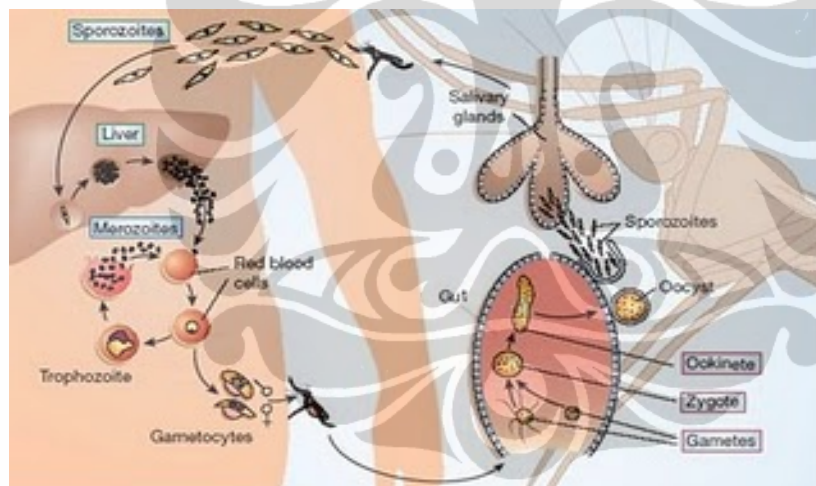
Sewaktu sporozoit dimasukkan oleh nyamuk kedalam darah manusia, mulailah serangkaian daur hidup yang melibatkan bermacam macam sel dan jaringan. Sporozoit menandai berakhirnya daur seksual. Sporozoit masuk ke berbagai jaringan, seperti parenkim hati dan makrofag tertentu. Fase ini dikenal dengan sebagai daur eksoeritrositik. Sporozoit tersebut disebut dengan trofozoit, yang mengalami skizogoni, pecah dan membebaskan merozoit jaringan.

Merozoit memasuki sel sel jaringan yang lain dan mengulangi daurnya. (kecuali *P. falciparum*). Merozoit yang masuk kedalam darah akan memasuki eritrosit, dan mulai dengan hidup fase eritrositik. Di dalam eritrosit, plasmodium

muda ini memiliki inti merah dan berbentuk cincin (dinamakan dengan signet ring). Bentuk cincin ini berubah sewaktu plasmodium masuk ke dalam eritrosit.

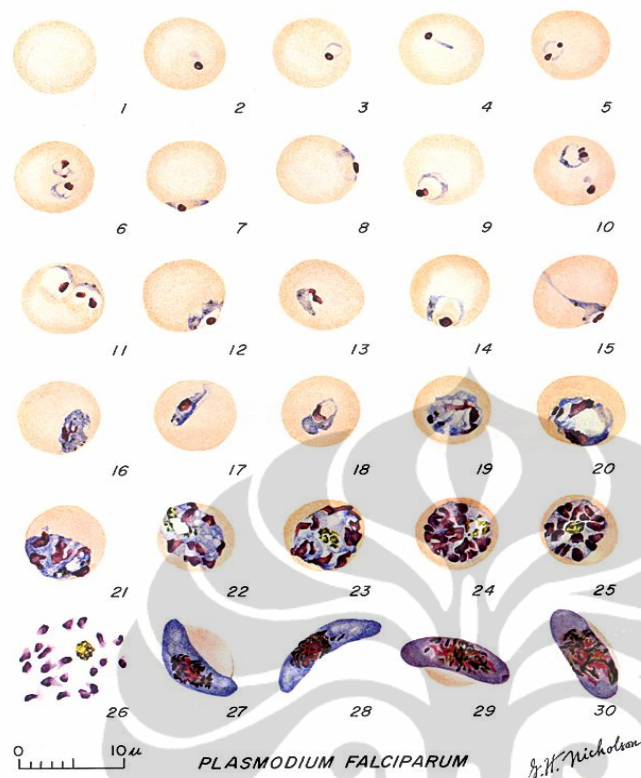
Peristiwa merogoni kemudian diulangi lagi. Beberapa merozoit di dalam sel sel darah berkembang menjadi bentuk bentuk seksual yang tumbuh menjadi mikrogametosit jantan dan makrogametosit betina. Apabila nyamuk menggigit manusia pada stadium daur hidup ini, gametosit gametosit tertelan kedalam lambung nyamuk dan mengalami pemasakan menjadi mikrogamet dan makrogamet. Mikrogamet dan makrogamet yang berbentuk seperti flagellate muncul dari mikrogametosit. Terbentuknya mikrogamet ini disebut dengan eksflagelasi. Fertilisasi berlangsung dan zigot yang terbentuk mengakhiri daur hidup ini (Gambar 2.2).

Daur hidup *Plasmodium sp*



[diunduh dari www.dpd.cdc.gov, pada Februari 2010]

Gambar 2.2 Daur hidup *Plasmodium sp*. Daur hidup plasmodium dimulai dari zigot didalam lambung betina nyamuk *Anopheles sp*. (ookinete). Ookinete membulat membentuk ookista, yang didalamnya terdapat sporozoit. Sporozoit masuk kedalam tubuh manusia melalui gigitan nyamuk *Anopheles sp*. Sporozoit akan sampai dihati dan berkembang menjadi trofozoit. Trofozoit masuk kedalam sel darah merah dan berkembang menjadi merozoit. Sebagian merozoit dapat membelah kembali menjadi merozoit dan sebagian lainnya akan berkembang menjadi gametosit. Nyamuk *Anopheles sp* akan menghisap darah manusia dan membawa bentuk gametosit ini. Didalam lambung nyamuk akan terjadi pematangan gametosit, dan terjadi fertilisasi membentuk zigot.



[diunduh dari www.nature.com, pada Februari 2010]

Gambar 2.3 Tahap-tahap Perkembangan Plasmodium di dalam sel darah merah. Sel darah merah yang belum terinfeksi(1), (2-18) Trophozoit (2-10 adalah trophozoit bentuk cincin), (19-26) Skizont, (27,28) Makrogametosit matang, (29,30) mikrogametosit matang.

2.8.4. Obat Antimalaria

Obat antimalaria berdasarkan struktur molekul dan aktivitasnya dapat dibedakan atas beberapa kelompok, sebagai berikut : (CCDR., 1997; Robert et al., 2001)

8-aminokuinolin. Berbagai turunan senyawa ini digunakan secara luas pada pengobatan dari hipnozoit (reservoir hati) yang disebabkan oleh *P. vivax* dan *P. ovale*. Primaquin adalah salah satu turunan dari 8-aminokuinolin, dewasa ini digunakan juga sebagai pencegah malaria, mengeliminasi *P. falciparum* penyebab infeksi. Obat antimalaria yang juga termasuk golongan ini adalah tafekuinson,

dimana tafekuinon digunakan sebagai obat untuk pengobatan malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum*.

4-aminokuinolin. Diantaranya adalah klorokuin dan amodiakuin. Golongan ini merupakan senyawa antimalaria yang sangat kuat untuk pengobatan dan pencegahan malaria. 4-aminokuinolin pada konsentrasi tinggi dapat terakumulasi pada bagian makanan dan bersifat asam dalam vakuola dari *Plasmodium* dan bersifat toksik terhadap parasit tersebut.

Kuinolin-metanol. Merupakan bentuk lain dari 4-aminokuinolin. Bentuk ini lebih aktif dibandingkan dengan 4-aminokuinolin pada taraf intra-eritrosit. Kuinin adalah salah satu dari golongan ini. Kuinin memiliki daya toksik yang sangat efektif terhadap *P. falciparum*, berinteraksi secara lemah pada heme, tetapi diketahui menghambat pembentukan polimer heme secara *in vitro*.

Aril-alkohol. Pengobatan golongan ini sebagai obat anti malaria terbatas, karena adanya resistensi dan juga sediaan dibuat dalam bentuk sediaan injeksi. Senyawa obat dari golongan ini diantaranya adalah halofantrin, pironaridin.

Folat antagonis. Obat antimalaria dari golongan folat antagonis ini berperan sebagai inhibitor pirimidin parasit dan DNA parasit. Bentuk senyawa folat antagonis yaitu : (i) inhibitor dihidroksi antifolat reduktase (DHFR), berupa primetamin dan klorpoguanil. (ii) inhibitor dihidropteroat sitase (DHFS), yaitu sulfon dan sulfonamide dikenal dengan sulfadoksin dan dapson. Penggunaan obat ini biasanya dalam bentuk kombinasi antara satu dan dua, atau dikombinasi dengan obat antimalaria lainnya. Malaron adalah bentuk kombinasi proguanil dan atovakuinon, banyak digunakan dalam pengobatan malaria.

Artemisin dan Turunannya. Artemisin dan tiga turunannya (artesunat, arteeter dan artemisisnin) adalah antimalaria yang sangat aktif. Arteeter dianjurkan oleh WHO sebagai obat esensial untuk pengobatan yang sangat baik terhadap malaria multi resistensi.

2.9. Uji Aktivitas Biologis

2.9.1. Uji toksisitas larva udang *A. salina* Leach (Brine Shrimp Lethality Test)

Toksisitas dari suatu senyawa secara umum dapat diartikan pada potensi suatu senyawa kimia untuk dapat menyebabkan kerusakan ketika senyawa tersebut mengenai atau masuk ke dalam tubuh manusia. Suatu senyawa kimia dikatakan bersifat racun akut jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu singkat, dan bersifat racun kronis jika senyawa tersebut dapat menimbulkan efek racun dalam jangka waktu panjang (karena kontak yang berulang-ulang walaupun dalam jumlah yang sedikit) (Satmoko, 2002).

Untuk skrining dan fraksinasi fisiologi aktif dari ekstrak tanaman dapat dilakukan uji standar toksisitas akut (jangka pendek). Suatu metode yang digunakan secara luas dalam penelitian bahan alam untuk maksud tersebut adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer, 1982). BSLT merupakan salah satu cara yang cepat dan murah untuk uji aktifitas farmakologi dari ekstrak tanaman dengan menggunakan hewan laut yaitu larva udang *A. salina* Leach. Uji ini mengamati mortalitas larva udang yang disebabkan oleh senyawa uji. Senyawa yang aktif akan menghasilkan mortalitas yang tinggi.

Uji toksisitas dengan metode BSLT ini memiliki spektrum aktifitas farmakologi yang luas, prosedurnya sederhana, cepat dan tidak membutuhkan biaya yang besar, serta hasilnya dapat dipercaya. Dengan alasan-alasan tersebut, maka uji ini sangat tepat digunakan dalam penelitian bahan alam (Alam, 2002).

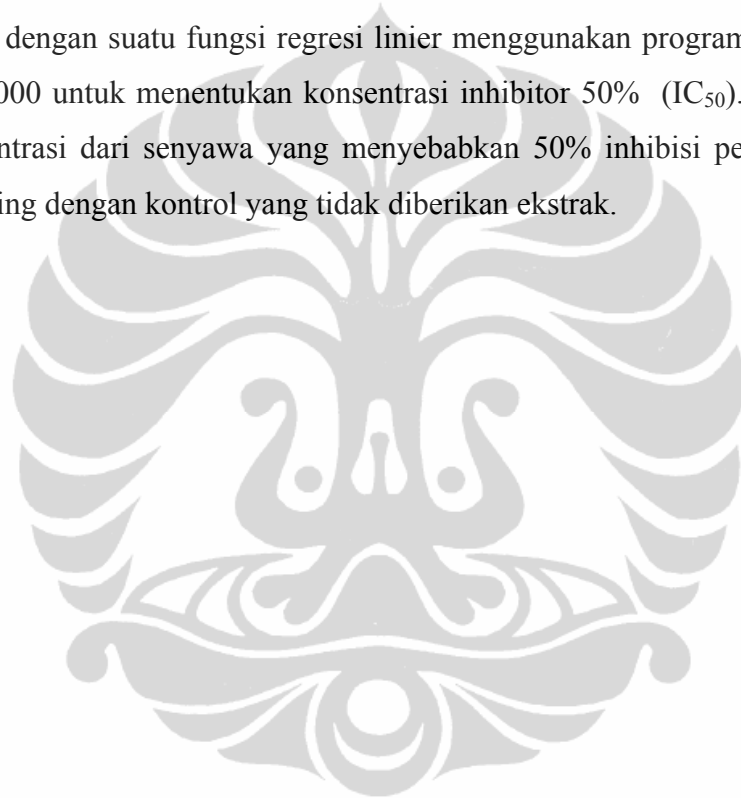
Batas toksisitas dapat diukur dalam ukuran LC_{50} yaitu dosis yang menyebabkan 50% hewan percobaan mati dengan selang kepercayaan 95% dengan menggunakan metoda analisis probit. Toksisitas senyawa murni dikatakan aktif jika $LC_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ dan ekstrak dikatakan aktif jika $LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$. (Alam, 2002).

2.9.2. Uji bioaktivitas antimalaria (Trager et al., 1976; Linn et al., 2005)

Dewasa ini pengujian antimalaria secara *in vitro* sering dilakukan. Sebelumnya yaitu tahun 1947, uji aktivitas antimalaria dilakukan secara *in vitro* terhadap malaria burung. Metoda pengkulturan kontiniu parasit malaria

(*P. falciparum*) secara *in vitro* merupakan suatu hal yang sangat berarti dalam pencarian teknik untuk menilai aktivitas secara kuantitatif.

Parasit *P. falciparum* klon 3D7 dipropagasi dalam 24 lubang papan kultur secara *in vitro* yang mengandung ekstrak dengan berbagai konsentrasi yang berbeda. Setiap sampel dilarutkan dalam DMSO secara terpisah untuk mendapatkan larutan induk 0,01 M, dan disimpan pada suhu -20°C , sampai saat digunakan. Pertumbuhan parasit dipantau dengan membuat suatu pulsan darah setiap hari. Data respon pertumbuhan parasit pada bermacam macam konsentrasi dan dianalisa dengan suatu fungsi regresi linier menggunakan program komputer Sigma-plot 2000 untuk menentukan konsentrasi inhibitor 50% (IC_{50}). Nilai IC_{50} adalah konsentrasi dari senyawa yang menyebabkan 50% inhibisi pertumbuhan relatif dibanding dengan kontrol yang tidak diberikan ekstrak.



BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Bahan dan Alat

3.1.1 Tanaman

Tanaman yang diteliti adalah kulit batang *Calophyllum canum* Hook.f. yang diperoleh dari daerah Kalimantan tengah (Palangkaraya) dan sudah dideterminasi oleh Ismail Rahman Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong Bogor. (Lampiran 1).

3.1.2 Bahan Kimia

Silika gel 60 GF 254 (70-230 mesh, Merck), Silika gel 60 GF254 (230-400 mesh, Merck), lempeng KLT (E. Merck 05554), H₂SO₄ 10 % sebagai penampak noda pada KLT, aquades, RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), hipoksantin (Sigma), larutan Giemsa, minyak imersi (Merck), gentamisin (Sigma), klorokuin (Sigma), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) (GibcoBRL), sel darah merah (Palang Merah Indonesia), serum darah (Palang Merah Indonesia), dimetilsulfoksida teknis (lokal). Berbagai pelarut teknis yang telah didestilasi *n*-heksana, aseton, etil asetat, *n*-butanol, diklorometan, kloroform, metanol dan etanol (lokal).

3.1.3 Kultur *Plasmodium falciparum*

Kultur *Plasmodium falciparum* yang digunakan pada penelitian ini adalah Kultur *Plasmodium falciparum* klon 3D7.

3.1.4 Hewan Uji

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

3.1.5 Alat-alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan maserasi, peralatan partisi, penguap putar (*rotary evaporator* Buchii), peralatan kromatografi kolom berbagai ukuran (Pyrex), peralatan kolom kromatografi vakum (Buchii), spektrofotometer UV-VIS (Hitaci), spektrofotometer infra merah (FTIR, Prestige-21 Shimadzu), Resonansi

Magnet Inti (500 MHz, Jeol) dan kromatografi cair- Spektrometri Massa Mariner Biored (70 ev), alat penentuan titik leleh Fisher Scientific serial 903N 0056. LAF (*Laminar air flow* Forma Scientific), (Heraeus), *candle jar* Scott. mikroskop binokuler (Axioskop, Zeiss), kaca objek, tube 1 mL, pipet mikro (Eppendorf), GC MS (Shimadzu), lemari pendingin.

3.2 Metode Penelitian

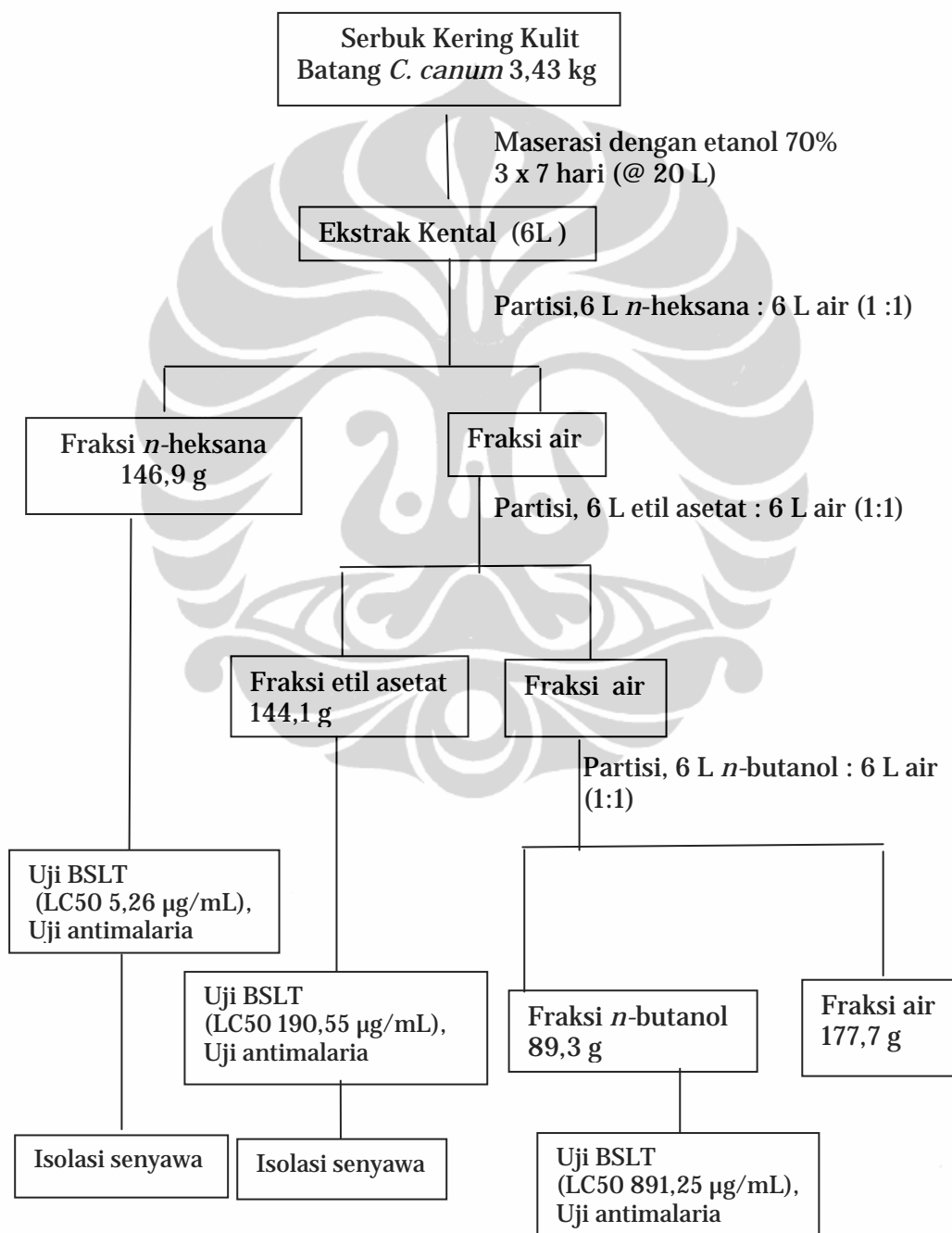
Isolasi dan penentuan struktur serta pengujian antimalaria pada kulit batang tanaman *C. canum* Hook.f. dilakukan melalui tahapan penelitian yang meliputi :

- 3.2.1 Penyiapan bahan, pembuatan ekstrak dan fraksi
- 3.2.2 Uji toksisitas fraksi terhadap larva udang *A. salina* Leach
- 3.2.3 Uji antimalaria fraksi secara *in vitro*
- 3.2.4 Isolasi senyawa murni
- 3.2.5 Penentuan struktur molekul
- 3.2.6 Uji toksisitas senyawa murni terhadap larva udang *A. Salina* Leach
- 3.2.7 Uji antimalaria senyawa murni secara *in vitro*

3.2.1 Penyiapan Bahan, Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Kulit batang tanaman *C. canum* Hook.f. yang digunakan pada penelitian ini dikumpulkan pada bulan Juli 2009 dari Hutan di Kalimantan Tengah (Palangkaraya). Kulit batang tersebut dibersihkan dari lumut-lumut, kemudian dirajang. Selanjutnya hasil rajangan dikeringkan pada suhu kamar selama 2 minggu dan selanjutnya dengan oven suhu 50°C. Selanjutnya sampel kering tersebut dihaluskan dengan mesin penggiling sehingga menjadi serbuk halus berukuran 100 mesh. Sejumlah 3,43 Kg serbuk kering kulit batang *C. canum* Hook.f. dimaserasi dengan 20 L pelarut etanol 70 % selama 7 hari, maserasi dilakukan 3 kali. Hasil maserasi disaring dan filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan penguap putar vakum pada suhu lebih kurang 45°C, sehingga diperoleh ekstrak kental (6 L). Selanjutnya ekstrak kental tersebut dilakukan partisi berturut turut dengan campuran pelarut dengan kepolaran yang meningkat mulai dari *n*-heksana : air (1:1), etil asetat : air (1:1) dan *n*-butanol : air (1:1), masing-masing sejumlah 12 L, sehingga didapat fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi

n-butanol dan fraksi air. Selanjutnya hasil partisi (fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol) diuapkan dengan penguap putar, dan didapatkan berbagai fraksi berupa ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dikeringkan di oven vakum, sehingga diperoleh ekstrak kering dari fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol. Masing masing ekstrak kering tersebut ditimbang dan dihitung rendemennya. Bagan alir ekstraksi dan fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Ekstraksi dan Fraksinasi Kulit Batang *Calophyllum canum* Hook.f.

3.2.2 Uji Toksisitas Fraksi Terhadap Larva Udang *A. salina* Leach

Masing masing fraksi dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) yang dikembangkan oleh Meyer menggunakan larva udang *A. salina* Leach.

Penetasan *A. salina* Leach

Pembiakan udang dilakukan dalam sebuah kotak yang telah dibagi menjadi dua bagian dengan sekat, sekat berlubang dimasukkan air laut buatan secukupnya. Air laut buatan terdiri dari aquades, natrium klorida 30 g/L dan natrium bikarbonat 0,15 g/L. Salah satu sisi kotak ditutup dengan aluminium foil dan telur udang dimasukkan kedalamnya, kemudian kotak diletakkan dibawah cahaya lampu. Dalam waktu 16 – 24 jam telur – telur menetas menjadi larva yang disebut nauplii (Harmita et al., 2008)

Penyiapan Larutan Uji

Larutan uji disiapkan dengan menimbang sejumlah 4 mg masing masing fraksi didalam vial, kemudian ditambahkan 10 μL DMSO. Selanjutnya masing masing fraksi tersebut dilarutkan air laut buatan hingga 2 mL. Didapatkan larutan induk pertama dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Selanjutnya dilakukan pengenceran dengan mengambil 1000 μL larutan induk pertama dicukupkan volumenya menjadi 2000 μL (larutan induk kedua, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Dari larutan induk kedua diambil sejumlah 200 μL dan dicukupkan menjadi 1000 μL (larutan induk ketiga, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Sejumlah 100 μL larutan induk ketiga diencerkan hingga menjadi 1000 mL (larutan induk keempat, 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Sebagai kontrol, disiapkan vial yang mengandung 10 μL DMSO dan ditambahkan air laut hingga 2 mL (larutan pertama). Selanjutnya larutan pertama diencerkan dengan perlakuan sama seperti sampel, yaitu sejumlah 1000 μL larutan pertama diencerkan dengan air laut buatan hingga 1 mL (larutan kedua). Sejumlah 200 μL larutan kedua diencerkan dengan air laut buatan hingga 1 mL (larutan ketiga). Sejumlah 200 μL larutan ketiga diencerkan dengan air laut buatan hingga 1 mL (larutan keempat).

Uji Toksisitas Metode Meyer

Sebanyak 10 larva udang dalam 100 μL air laut dimasukkan kedalam vial untuk diuji, kemudian ditambahkan 100 μL larutan sampel untuk setiap konsentrasi, sehingga konsentrasi larutan sampel menjadi setengah dari konsentrasi larutan yang dibuat, yakni 1000, 500, 100 dan 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Percobaan dilakukan dengan 3 x pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan tanpa penambahan larutan uji, yakni menggunakan 100 μL berbagai konsentrasi larutan DMSO dalam air laut. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva udang yang masih hidup dan yang sudah mati. Nilai LC_{50} ditemukan dengan program komputer sederhana untuk analisis probit pada tingkat kepercayaan 95 %. Suatu fraksi atau ekstrak dikatakan aktif jika mempunyai nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Senyawa murni dikatakan aktif bila nilai $\text{LC}_{50} \leq 200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.3 Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Secara *in vitro*

Uji aktivitas antimalaria berbagai fraksi dilakukan untuk melihat aktivitas fraksi terhadap pertumbuhan parasitemia *P. falciparum* secara *in vitro*.

Persiapan kultur parasit

Kultur parasit *P. falciparum* klon 3D7 dipelihara secara *in vitro* dengan metode standar (Trager et al., 1976). Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C, dibiakkan dalam medium RPMI-1640 yang ditambahkan dengan 5 % hematokrit dan 10 % serum darah manusia.

Persiapan serum dan medium.

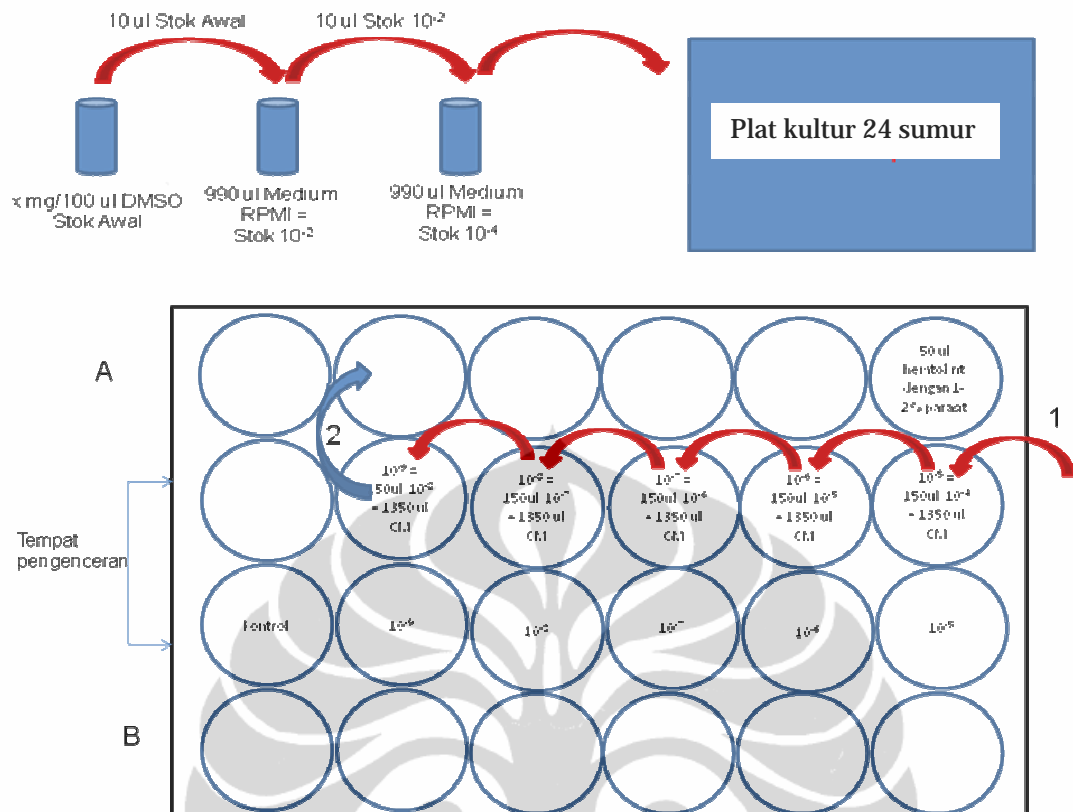
Serum diperoleh dengan cara memasukkan darah pada tabung 50 mL yang tidak mengandung antikoagulan, kemudian serum dipisahkan dari darah dengan sentrifugasi pada 2000 g selama 5 menit. Selanjutnya, serum diinaktivasi pada suhu 56°C selama 1 jam, dan disimpan dalam suhu -20°C sampai digunakan. Medium kultur RPMI-1640, diberi tambahan suplemen gentamisin 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, hipoksantin 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 25 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid), dan larutan tersebut dipertahankan pada pH 7,4 dengan menambahkan larutan natrium bikarbonat. Pembuatan larutan standar antimalaria

dan senyawa uji, dilakukan dengan segera sebelum percobaan dengan cara melarutkan klorokuin kedalam DMSO 10^{-2} M. Senyawa uji dilarutkan dengan pelarut yang sama untuk mencapai dosis yang diinginkan.

Persiapan sampel uji.

Pertama adalah dengan membuat larutan induk, yakni dengan cara : sejumlah 100 mg masing masing fraksi yang diuji ditimbang dan dimasukkan kedalam tube 1 mL dan ditambahkan 100 μ L DMSO, kemudian divortek selama 1 menit hingga sampel uji menjadi larut. Sejumlah 10 μ L larutan induk di masukkan kedalam tube 1 mL, kemudian ditambahkan 990 μ L larutan medium kompleks, sehingga diperoleh larutan sampel dengan konsentrasi 10^{-2} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Sejumlah 10 μ L larutan konsentrasi 10^{-2} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam tube 1 mL dan ditambahkan 990 μ L medium kompleks, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10^{-4} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Sejumlah 150 μ L larutan sampel konsentrasi 10^{-4} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam sumur plat kultur, dan ditambahkan 1350 μ L medium kompleks, sehingga konsentrasi larutan dalam sumur tersebut menjadi 10^{-5} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$.

Sejumlah 150 μ L larutan sampel konsentrasi 10^{-5} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam sumur plat kultur berikutnya, dan ditambahkan 1350 μ L medium kompleks, sehingga konsentrasi larutan dalam sumur tersebut menjadi 10^{-6} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Sejumlah 150 μ L larutan sampel konsentrasi 10^{-6} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam sumur plat kultur berikutnya, dan ditambahkan 1350 μ L medium kompleks, sehingga konsentrasi larutan dalam sumur tersebut menjadi 10^{-7} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Sejumlah 150 μ L larutan sampel konsentrasi 10^{-7} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam sumur plat kultur, dan ditambahkan 1350 μ L medium kompleks, sehingga konsentrasi larutan dalam sumur tersebut menjadi 10^{-8} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Sejumlah 150 μ L larutan sampel konsentrasi 10^{-8} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ dimasukkan kedalam sumur plat kultur, dan ditambahkan 1350 μ L medium kompleks, sehingga konsentrasi larutan dalam sumur tersebut menjadi 10^{-9} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$. Skema pembuatan sampel dan pengenceran sampel dapat dilihat pada gambar 3.2.



Gambar. 3.2. Skema pembuatan sampel uji dan pengenceran sampel uji pada plat kultur 24 sumur (Eijkman, 2010)

Uji aktivitas anti malaria fraksi *in vitro*.

Uji aktivitas antimalaria senyawa murni menggunakan plat kultur (10 x 10 cm) yang memiliki 24 lubang, masing masing lubang dengan kapasitas 3 mL). Kedalam masing masing sumur berturut turut diisi larutan medium, 10 % serum dan 50 μ L sel darah merah yang mengandung parasit *P. falciparum* serta sampel yang akan diuji (konsentrasi 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$) dimasukkan kedalam 5 sumur berikutnya sedemikian rupa sehingga volume akhir mencapai 1 mL. Plat kultur disimpan dalam inkubator suhu 37°C dan diamati setiap hari selama 3 hari. Untuk percobaan standar, 50 μ L klorokuin dalam variasi konsentrasi 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} M, secara berurutan dimasukkan kedalam 5 sumur.

Pertumbuhan parasit dimonitor tiap hari yakni, H_0 adalah jumlah parasit sebelum diberi sampel uji, H_1 dan H_2 (merupakan jumlah parasit pada hari

pertama dan kedua setelah diberikan sampel uji). Pengamatan dilakukan dengan cara mengoleskan 15 μ L kultur parasit pada gelas objek dan kemudian dibuat apusan. Apusan darah tersebut difiksasi dengan metanol, dikeringkan dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% selama 10 menit. Setelah dibilas dan dikeringkan, gelas objek tersebut diperiksa dibawah mikroskop binokuler dan parasitemia dihitung di bawah perbesaran 1000x. Data respon konsentrasi fraksi terhadap pertumbuhan parasit dianalisis dengan regresi linier menggunakan program komputer Xp Sigma-plot untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC_{50}). IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit 50% relatif terhadap kontrol (Kalauni et al., 2006)

Perhitungan aktivitas antimalaria

Perhitungan ini dilakukan untuk menentukan % parasitemia dan efek inhibisi fraksi yang diuji.

Persen parasitemia adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dibagi dengan jumlah eritrosit total dikali 100%. Perhitungan menggunakan metoda Bourdy *et al.*, (2004), sebagai berikut :

$$\text{Persen parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi parasit}}{\text{Jumlah total eritrosit}} \times 100\%$$

Persen inhibisi diperoleh dari pengurangan antara parasitemia kontrol dan parasitemia perlakuan, dibagi dengan parasitemia kontrol dan dikalikan dengan 100 % atau seperti ditunjukkan pada persamaan berikut:

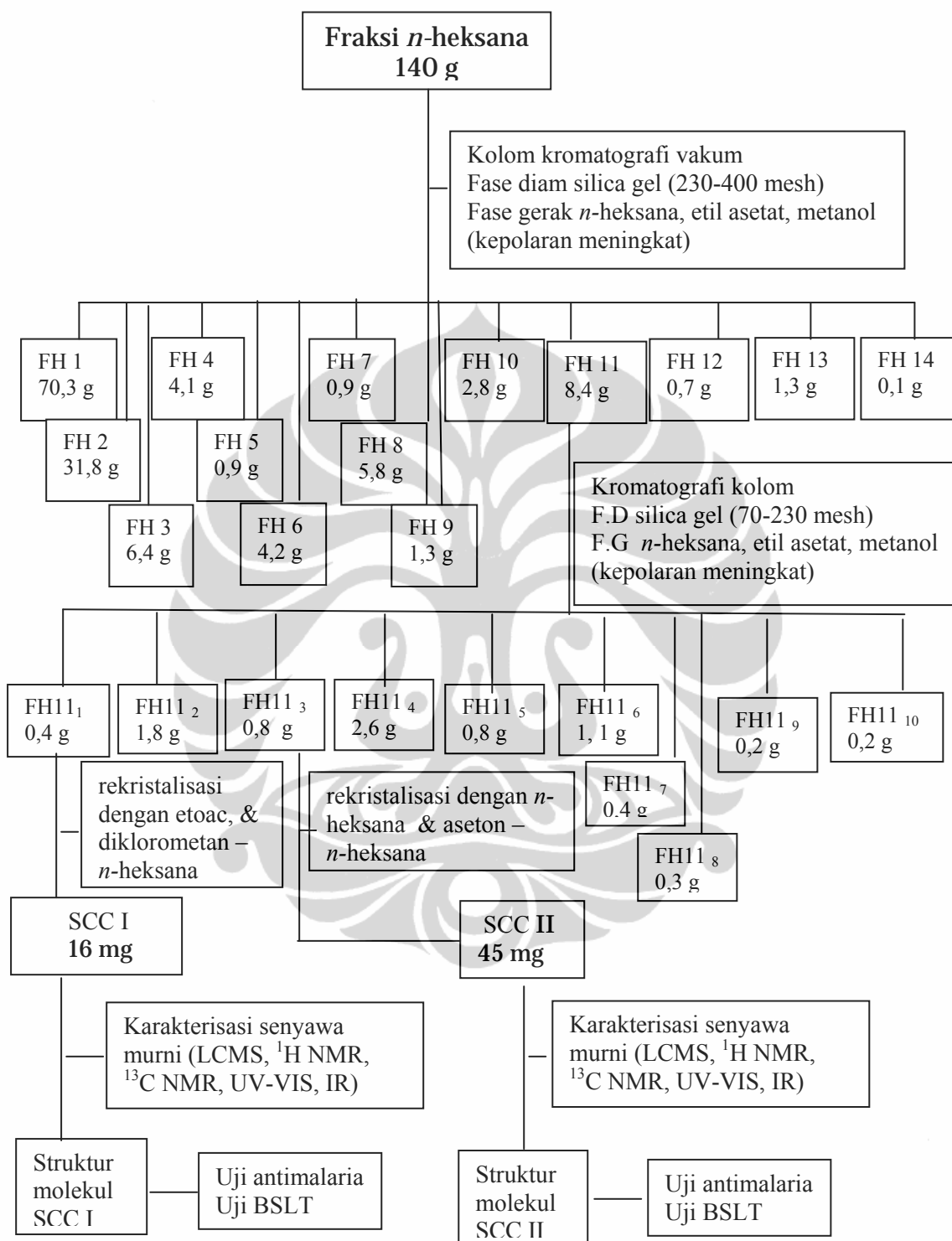
$$\text{Persen inhibisi} = \frac{\text{parasitemia kontrol} - \text{parasitemia perlakuan}}{\text{Parasitemia kontrol}} \times 100 \%$$

Konsentrasi hambatan 50 % fraksi ditentukan dengan analisis regresi linier menggunakan program komputer Xp Sigma-plot untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC_{50}). Berdasarkan perpotongan garis 50 %, kurva yang dibentuk antara persen pertumbuhan sb-y dan ini menggunakan analisis regresi linier program komputer Xp Sigma-plot.

3.2.4 Isolasi Senyawa

Sebanyak 140 g fraksi *n*-heksana *C. canum* Hook.f. difraksinasi dengan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan fase diam 100 g silika gel 60 (230-400 mesh). Sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut mulai dari *n*-heksana dengan etil asetat dan etil asetat dengan metanol. Pelarut *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan sebagai berikut; 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 masing masingnya 400 mL dan etil asetat : metanol dengan perbandingan, diantaranya 9:1, 7:3, 5:5, 3:7, 1:9, 0:10, dimana setiap perbandingan digunakan 400 mL pelarut. Setiap 100 mL eluat ditampung dan diuapkan dengan penguap putar sehingga diperoleh 60 fraksi, Hasil kolom dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT), fraksi yang sama digabung sehingga diperoleh 14 fraksi (FH 1 – FH 14).

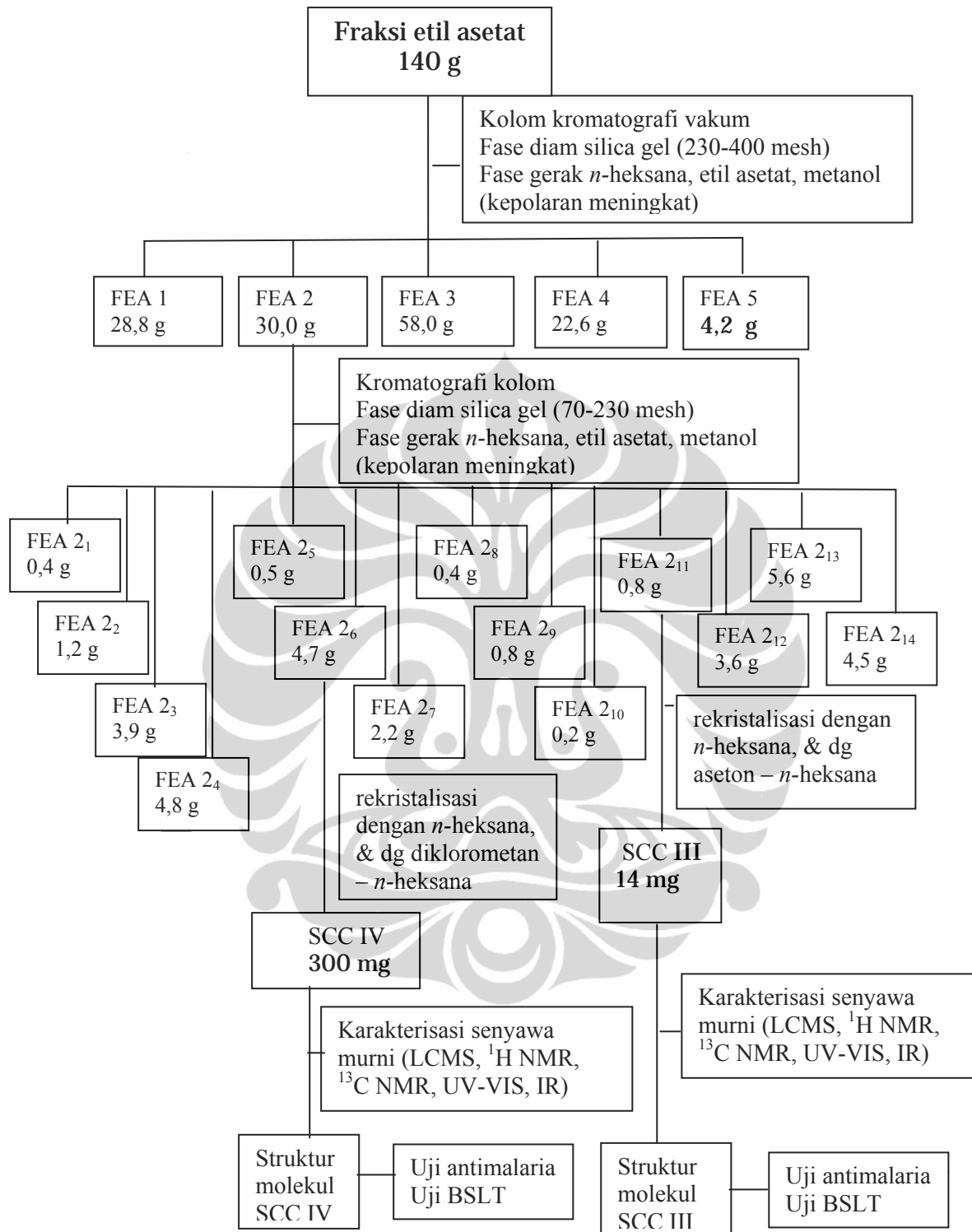
Fraksi 11 (FH 11) sejumlah 8,4 g dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom dengan sejumlah 84 g silika gel 60 (70-230 mesh) sebagai fase diam dan fase gerak adalah *n*-heksana : etil asetat (100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, masing masingnya 1000 mL), kemudian dilanjutkan dengan etil asetat dan metanol dengan kepolaran meningkat yakni, 100:0, 90:10, 50:50, 100:0 masing masing 500 mL. Setiap 100 mL eluat ditampung dan diuapkan dengan penguap putar. Dari kromatografi kolom tersebut diperoleh 90 fraksi, selanjutnya dilihat dengan KLT, fraksi yang sama digabung kembali, sehingga diperoleh 10 fraksi gabungan (FH 11₁ – FH 11₁₀). Pada fraksi gabungan 1 (FH 11₁) terdapat kristal yang selanjutnya kristal tersebut dimurnikan dengan pelarut etil asetat, menghasilkan kristal jarum berwarna putih. Kristal tersebut dimurnikan lebih lanjut dengan cara rekristalisasi berulang ulang dengan pelarut diklorometana - *n*-heksana, sehingga didapat Kristal sebanyak 16 mg (Senyawa *Calophyllum canum* (SCC) I). Fraksi 3 (FH 11₃) memperlihatkan adanya kristal putih kekuningan, yang selanjutnya dicuci dengan pelarut *n*-heksana, kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi dengan pelarut aseton– *n*-heksana, sehingga diperoleh kristal berbentuk jarum berwarna putih (SCC II) sebanyak 45 mg. Bagan alir isolasi dan permurnian senyawa murni SCC I dan SCC II dapat dilihat pada gambar 3.3.



Gambar 3.3. Bagan Alir Isolasi dan Pemurnian Senyawa Kimia dari Fraksi *n*-heksana Kulit Batang *Calophyllum canum* Hook.f.

Sejumlah 140 g fraksi etil asetat difraksinasi dengan cara kromatografi kolom vakum dengan menggunakan 60 g silika gel 60 (230-400 mesh) sebagai fase diam, dan fase gerak berbagai pelarut dengan kepolaran yang meningkat mulai dari *n*-heksana dan etil asetat 10:1, 5:1, 1:1, 0:1, masing masingnya sejumlah 300 mL campuran pelarut, dan dilanjutkan dengan campuran etil asetat dan metanol dengan perbandingan 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:8, masing masingnya 300 mL. Setiap 100 mL eluat ditampung dan diuapkan dengan penguap putar. Dari kromatografi kolom vakum diperoleh 36 fraksi, dan berdasarkan analisis hasil KLT diperoleh 5 fraksi gabungan yakni FEA 1 - FEA 5. Sejumlah 30 g FEA 2 dimurnikan lebih lanjut dengan kromatografi kolom dengan fase diam 300 g silika gel 60 (70-230 mesh) dan sebagai fase gerak adalah campuran pelarut dengan kepolaran meningkat, mulai dari *n*-heksana, etil asetat dengan perbandingan 98:2, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 30:70, 0:100, masing masingnya 1000 mL dan dilanjutkan dengan etil asetat metanol dengan perbandingan 90:10, 80:20, 50:50, 100:0, masing masingnya 1000 mL. Setiap 100 mL eluat ditampung dan diuapkan dengan penguap putar, dari kolom tersebut diperoleh 140 fraksi. Berdasarkan KLT dari fraksi yang diperoleh, pola kromatografi yang sama digabung sehingga diperoleh 14 fraksi gabungan yakni FEA 2₁-FEA 2₁₄. Fraksi 9 (FEA 2₉) memperlihatkan adanya kristal. Kristal tersebut dimurnikan dengan menggunakan cara rekristalisasi dengan pelarut *n*-heksana, dan selanjutnya dikristalisasi dengan aseton – *n*-heksana, sehingga diperoleh kristal kuning sebanyak 14 mg (SCC III).

Pemurnian lebih lanjut dilakukan terhadap fraksi 6 (FEA 2₆), yakni dengan cara memurnikan endapan yang terbentuk dengan pelarut *n*-heksana dan selanjutnya rekristalisasi berulang ulang dengan pelarut aseton - *n*-heksana. Kristal yang diperoleh berwarna putih kekuningan sebanyak 300 mg (SCC IV). Bagan alir isolasi dan pemurnian senyawa murni SCC III dan SCC IV dapat dilihat pada gambar 3.4.



Gambar 3.4 Bagan Alir Isolasi dan Pemurnian Senyawa Kimia dari Fraksi etil asetat Kulit Batang *Calophyllum canum* Hook.f.

3.2.5 Penentuan struktur molekul

Penentuan struktur molekul senyawa hasil isolasi berdasarkan analisis fisika yakni dengan penentuan titik leleh, serta analisis fisiko kimia dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS, spektrofotometer infra merah, spektrometer resonansi magnetik inti proton, spektrometer resonansi magnetik inti karbon dan spektrometer massa.

Penentuan Titik Leleh

Penentuan titik leleh dilakukan dengan menggunakan alat *Fisher Scientific*. Sedikit senyawa murni diletakkan diantara dua kaca tipis (tempat sampel). Kemudian alat pengukur dinyalakan, sehingga akan menyebabkan kenaikan suhu pada tempat sampel, yang dapat dideteksi dengan thermometer yang ada pada alat tersebut. Senyawa dikatakan murni jika memiliki jarak leleh yang tajam yakni 1-2 °C.

Spektrofotometer Infra Merah (Depkes RI, 1995)

Sejumlah 1 mg sampel yang akan diuji dijadikan digerus dengan 300 mg KBr *IR P*, dan selanjutnya dicetak seperti sebuah cakram dengan diameter 13 mm. Cakram dibuat dengan cara dikomopresikan pada hampa udara pada tekanan lebih kurang $7,5 \times 10^{-3}$ mmHg. Tempatkan cakram yang dihasilkan dalam alat pemegang yang sesuai dengan spektrofotometer. Pada penelitian ini digunakan alat FTIR Prestige-21 Shimadzu, yang diukur pada panjang gelombang 2,5 μm – 16 μm . Data spektroskopi infra merah merupakan grafik % transmittan dengan bilangan gelombang (cm^{-1})

Spektrofotometer UV-VIS (Depkes RI, 1995)

Sampel uji (SCC III dan SCC IV), dipersiapkan dengan cara melarutkan masing-masingnya dengan metanol sehingga konsentrasi menjadi $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Kemudian larutan tersebut dimasukkan kedalam kuvet 1 cm, dan dilakukan pengukuran pada alat spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 200 – 38 nm.

Spektrometer Resonansi Magnet Inti

Sejumlah 10 mg senyawa murni dilarutkan dengan 4 mL pelarut khusus untuk NMR. Senyawa SCC I dilarutkan dalam CDCl_3 , sedangkan senyawa SCC III dan SCC IV dilarutkan dengan CD_3COCD_3 . Selanjutnya diukur dengan alat NMR.

Spektrometer massa

Digunakan LCMS untuk menghitung BM senyawa murni. Alat yang digunakan adalah HP. Sejumlah 1 mg senyawa murni dilarutkan dengan 1 mL pelarut metanol. Sejumlah 10 μL sampel diinjeksikan pada kolom yang terdapat pada alat LCMS. Sebagai fase diam adalah C-18 dan fase gerak adalah pelarut metanol p.a yang mengandung 1 % asam asetat, dengan kecepatan alir 1 mL per detik.

3.2.6 Uji Toksisitas Senyawa Murni Terhadap Larva Udang *A. salina*

Uji toksisitas terhadap senyawa murni dilakukan dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) menggunakan larva udang *A. salina* Leach. Metoda BSLT terhadap senyawa murni sama dengan metoda BSLT terhadap fraksi seperti yang disebutkan sebelumnya. Perbedaannya hanya pada persiapan sampel senyawa murni

Persiapan Sampel Senyawa Murni

Sejumlah 2 mg masing masing senyawa murni ditimbang pada vial 5 mL dan dilarutkan dengan 10 μL DMSO dengan bantuan sonifikasi. Selanjutnya ditambahkan dengan sejumlah 1000 μL air laut, sehingga diperoleh larutan induk pertama dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sejumlah 1000 μL larutan induk pertama dimasukkan kedalam vial 5 mL dan ditambahkan dengan 1000 μL air laut, sehingga diperoleh larutan induk kedua dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Selanjutnya sejumlah 200 μL larutan induk kedua dimasukkan kedalam vial 5 mL, dan ditambahkan dengan 800 μL air laut, sehingga diperoleh larutan induk ketiga dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sejumlah 100 μL larutan induk ketiga dimasukkan kedalam vial 5 mL dan ditambahkan dengan air laut sejumlah 900 μL , sehingga diperoleh larutan induk keempat dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cara pembuatan kontrol sama dengan cara pembuatan kontrol pada uji BSLT pada fraksi, seperti yang telah disebutkan sebelumnya.

3.2.7 Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa murni

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas senyawa murni terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum* klon 3D7 secara *in vitro*. Metoda uji antimalaria terhadap senyawa murni sama dengan metoda uji antimalaria fraksi seperti diatas, namun persiapan sampel uji berbeda dibandingkan pada persiapan sampel uji fraksi.

Persiapan Sampel Uji Senyawa Murni

Pertama adalah dengan membuat larutan induk, yakni dengan cara : sejumlah 10 mg masing masing fraksi yang diuji ditimbang dan dimasukkan kedalam tube 1 mL dan ditambahkan 100 μ L DMSO, kemudian divortek selama 1 menit hingga sampel uji menjadi larut. Selanjutnya perlakuan adalah sama dengan cara pembuatan larutan sampel fraksi. Sehingga didapatkan larutan sampel dengan konsentrasi 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , dan 10^{-9} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$.

Konsentrasi hambatan 50 % senyawa murni ditentukan dengan analisis regresi linier menggunakan program komputer Xp Sigma-plot untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC_{50}). Berdasarkan perpotongan garis 50 %, kurva yang dibentuk antara persen pertumbuhan sb-y dan ini menggunakan analisis regresi linier program komputer Xp Sigma-plot.

Nilai IC_{50} memperlihatkan penghambatan pertumbuhan parasitemia perlakuan yang dibandingkan dengan pertumbuhan parasitemia control. Senyawa dikatakan memiliki aktivitas antimalaria jika senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit, minimum atau jika suatu senyawa memiliki nilai IC_{50} pada rentang konsentrasi yang diuji yakni maksimum pada konsentrasi 10^{-5} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan Bahan, Pembuatan Ekstrak dan Fraksi

Seleksi tumbuhan dilakukan berdasarkan pengetahuan kemotaksonomi dari suku Clusiaceae yang dilaporkan mengandung senyawa-senyawa yang khas dan bermanfaat. Bagian tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit batang.

Hasil maserasi serbuk kering kulit batang *C. canum* Hook.f. dengan pelarut etanol 70 % didapat 6 L ekstrak kental. Hasil partisi ekstrak kental dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol, diperoleh sejumlah 146,9 g fraksi *n*-heksana (rendemen 3,38 %), 144,1 g fraksi etil asetat (rendemen 3,32 %), 89,3 g fraksi *n*-butanol (rendemen 2,06 %), dan 177,7 g fraksi air (rendemen 5,18 %)

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

Hasil uji toksisitas terhadap larva udang *A. salina* Leach yang dari fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol dapat dilihat pada tabel 4.1. Semua fraksi memperlihatkan aktivitas toksisitas yang cukup potensial, yakni dengan nilai LC₅₀ yang kecil dari 1000 ppm. Fraksi *n*-heksana memperlihatkan toksisitas yang paling tinggi dengan LC₅₀ 5,26 µg/mL, diikuti oleh fraksi etil asetat dengan LC₅₀ 190,55 µg/mL, dan terakhir adalah fraksi *n*-butanol dengan LC₅₀ 891,25 µg/mL (Tabel 4.1).

Hasil uji toksisitas berbagai fraksi terhadap larva udang *A. salina* Leach menjadi pertimbangan dalam memilih fraksi yang akan dimurnikan lebih lanjut. Fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat memiliki toksisitas yang lebih tinggi diantara ketiga fraksi yang diuji. Sehingga fraksi *n*-heksana dan etil asetat dipilih untuk dimurnikan kandungan kimianya.

Tabel 4.1 Hasil Uji Toksisitas Larva Udag *A. salina* Leach.

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$) @ 100 μL	Awal			Mati			Mortalitas (%)	LC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
F. <i>n</i> - heksana	10	10	10	10	0	4	2	15,38	5,26
	100	10	10	10	7	7	7	75,00	
	500	10	10	10	10	10	10	100,00	
	1000	10	10	10	10	10	10	100,00	
F. etil asetat	10	10	10	10	0	0	1	1,49	190,55
	100	10	10	10	3	3	3	2,28	
	500	10	10	10	5	7	4	61,91	
	1000	10	10	10	9	10	9	96,43	
F. <i>n</i> - butanol	10	10	10	10	0	0	0	0,00	891,25
	100	10	10	10	1	0	2	4,48	
	500	10	10	10	3	4	3	26,00	
	1000	10	10	10	4	4	5	60,47	
Kontrol	Vial I	10	10	10	0	0	0	0,00	-
	Vial II	10	10	10	0	0	0	0,00	
	Vial III	10	10	10	0	0	0	0,00	
	Vial IV	10	10	10	0	0	0	0,00	

4.3 Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Secara *In Vitro*

Hasil uji aktivitas antimalaria fraksi yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode kultur berkelanjutan tidak memperlihatkan aktivitas penghambatan pertumbuhan parasit yang berarti. Hal ini terjadi diduga karena pada fraksi yang diuji aktivitas antimalaria tidak terlihat karena masih banyak campuran senyawa lain yang dapat menghambat aktivitas antimalaria dari suatu senyawa aktif. Data penghambatan pertumbuhan parasitemia dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Hasil uji aktivitas antimalaria dikatakan tidak bergantung dengan dosis (*not dose dependent*) jika perubahan konsentrasi sampel tidak memperlihatkan perubahan hambatan pertumbuhan parasitemia. Pada hasil uji seperti ini tidak dapat ditentukan nilai IC₅₀ dari sampel uji. Hasil uji aktivitas antimalaria dikatakan bergantung dengan dosis (*dose dependent*) jika perubahan konsentrasi sampel memperlihatkan perbedaan hambatan pertumbuhan parasitemia yang signifikan. Sampel uji yang bergantung dengan dosis dapat ditentukan nilai IC₅₀nya.

Tabel 4.2 Data Penghambatan Parasitemia oleh Fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol

Sampel (mg μ L ⁻¹)	Parasitemia (%)		Rata rata (%)	Parasitemia (%)		Rata rata (%)	Pertumbuhan (%)	Keterangan
F.<i>n</i>-heksana								<i>Tidak tergantung dosis</i>
Kontrol	2,83	2,92	2,87	3,70	3,60	3,50	100,00	
10 ⁻⁹	2,83	2,92	2,87	3,50	3,50	3,50	100,00	
10 ⁻⁸	2,83	2,92	2,87	3,40	3,40	3,40	97,10	
10 ⁻⁷	2,83	2,92	2,87	3,20	3,30	3,25	92,90	
10 ⁻⁶	2,83	2,92	2,87	3,20	3,50	3,35	92,90	
10 ⁻⁵	2,83	2,92	2,87	3,30	3,50	3,40	97,10	
f.etilasetat								<i>Tidak tergantung dosis</i>
Kontrol	2,83	2,92	2,87	3,70	3,60	3,50	100,0	
10 ⁻⁹	2,83	2,92	2,87	3,20	3,50	3,35	95,70	
10 ⁻⁸	2,83	2,92	2,87	3,30	3,60	3,45	98,60	
10 ⁻⁷	2,83	2,92	2,87	3,40	3,70	3,55	101,00	
10 ⁻⁶	2,83	2,92	2,87	3,50	3,80	3,65	104,00	
10 ⁻⁵	2,83	2,92	2,87	3,60	3,90	3,75	107,00	
f.butanol								<i>Tidak tergantung dosis</i>
Kontrol	2,83	2,92	2,87	3,70	3,60	3,50	100,00	
10 ⁻⁹	2,83	2,92	2,87	3,50	3,80	3,65	104,00	
10 ⁻⁸	2,83	2,92	2,87	3,60	3,90	3,75	107,00	
10 ⁻⁷	2,83	2,92	2,87	3,20	3,50	3,35	95,70	
10 ⁻⁶	2,83	2,92	2,87	3,30	3,50	3,40	97,40	
10 ⁻⁵	2,83	2,92	2,87	3,00	3,00	3,00	85,71	

4.4 Isolasi Senyawa Murni

Pemurnian yang dilakukan terhadap fraksi *n*-heksana diperoleh sejumlah 16 mg senyawa murni SCC I dan 45 mg senyawa SCC II. Sedangkan dari fraksi etil asetat diperoleh senyawa murni SCC III (14 mg) dan SCC IV (300 mg).

4.5 Penentuan Struktur Molekul Senyawa Murni

Senyawa hasil isolasi dari ekstrak *n*-heksana dan etil asetat kulit batang *C. canum* Hook. f. diperoleh 4 senyawa yaitu SCC I, SCC II, SCC III, SCC IV. Penentuan struktur senyawa tersebut diatas dilakukan dengan menganalisis data spektroskopi yang meliputi spektroskopi massa (MS), inframerah (IR), UV-VIS, resonansi magnetik inti proton (¹H-NMR), resonansi magnetik inti karbon (¹³C-NMR) dan spektroskopi NMR-2D meliputi DEPT, HMQC, HMBC dan COSY.

Senyawa SCC I

Senyawa SCC I berupa kristal jarum berwarna putih, memiliki titik leleh 263-264°C. Data EIMS menunjukkan puncak ion molekuler $[M]^+$ ada m/z 426 ini menunjukkan bahwa senyawa mempunyai berat molekul 426 (lampiran 2). Data IR memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang 1714 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur C=O dan pada bilangan gelombang 2927 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur asimetrik ikatan -C-C- alifatik (lampiran 3).

Analisis spektrum resonansi magnetik inti karbon (^{13}C NMR), ^1H NMR dan HMQC diketahui bahwa senyawa SCC I mengandung 30 atom karbon, yang terdiri dari 8 gugus metil (CH_3) yakni pada pergeseran kimia 7,0; 14,8; 18,1; 18,9; 20,5; 31,9; 32,6; 35,2 ppm. Terdapat 11 gugus metilen (CH_2) yang dapat dilihat pada pergeseran kimia 18,4; 22,5; 30,7; 32,6; 32,9; 35,5; 35,8; 36,2; 39,4; 41,5; dan 41,7 ppm. 4 gugus metin (CH) ditunjukkan pada pergeseran kimia 42,9; 53,3; 58,4 dan 59,6 ppm. Dan 7 atom C quartener ditunjukkan pada pergeseran kimia 28,4; 30,2; 38,5; 38,9; 37,6; 42,3; dan 213,5 ppm (lampiran 4). Pergeseran kimia pada 213,0 ppm menunjukkan adanya gugus keton (C=O) yang didukung oleh spektrum IR pada bilangan gelombang 1714 cm^{-1} .

Spektrum resonansi magnetik inti proton senyawa SCC I menunjukkan pergeseran kimia pada 0,72; 0,86; 0,88; 0,95; 0,99; 1,0; 1,04; 1,18 ppm. Menunjukkan adanya 8 gugus metil (tipe triterpen). Semua metil pada senyawa ini memiliki puncak dengan multifilisitas *singlet*, kecuali pada 0,88 ppm memperlihatkan puncak dengan multifilisitas *doublet* (lampiran 5).

Spektroskopi HMQC dari senyawa SCC I memperlihatkan adanya korelasi langsung antara hidrogen dengan karbon. Karbon pada pergeseran kimia 22,5 ppm terikat pada proton H 1,95 ppm. C 42,3 ppm terikat pada proton H 1,53 ppm, C 58,4 ppm pada proton H 1,53 ppm, C 41,4 ppm pada proton H 2,38 dan 1,74 ppm. Karbon pada pergeseran kimia 18,4 ppm terikat dengan proton H pada pergeseran kimia 1,21 ppm. C 53,3 ppm terikat pada proton H 1,38 ppm, C 59,6 ppm dengan proton H 1,52 ppm, C 35,8 ppm dengan proton H 1,48 ppm. Karbon pada C 30,7 ppm dengan proton H 1,33 ppm, C 32,6 ppm terikat pada proton H 1,48 ppm. C 36,2 ppm terikat dengan proton H 1,75 ppm, C 42,9 ppm terikat dengan proton H 2,39 ppm, C 35,5 ppm dengan H 1,19 ppm, C 39,4 ppm

dengan H 1,46 ppm. Karbon pada pergeseran kimia 32,9 ppm terikat dengan proton H 1,28 ppm. Karbon C 7,0 ppm terikat dengan H 0,88 ppm. Karbon pada pergeseran kimia 14,8 ppm terikat dengan proton H 0,72 ppm, C 18,1 ppm dengan H 0,86 ppm, C 20,4 ppm dengan H 0,99 ppm. Karbon C 32,3 ppm terikat dengan H 1,18 ppm, C 31,9 ppm dengan H 1,00 ppm, dan C 35,2 ppm dengan H 0,99 ppm (lampiran 6-9). Data hubungan hidrogen dan karbon dapat dilihat pada tabel 4.3.

Spektroskopi HMBC senyawa SCC I memperlihatkan adanya korelasi tidak langsung antara atom hidrogen dengan karbon (data dapat dilihat pada tabel 4.3). H 2,25 ppm dengan C 213,5 dan 42,4 ppm, H 2,38 dengan C 58,4 ppm, H 1,28 ppm berkorelasi dengan karbon C 32,3, 30,1 dan 35,5 ppm. H 1,38 ppm berkorelasi dengan C 32,6, 41,4 dan 35,8 ppm. Proton H 1,48 ppm berkorelasi dengan C 35,5 ppm. Proton H 1,46 ppm berkorelasi dengan C 35,5 ppm. Proton H 1,28 ppm berkorelasi dengan C 30,1, 32,3 dan 35,5 ppm. Proton H 0,88 ppm berkorelasi dengan C 213,5, 59,6 dan 42,3 ppm. Proton H 0,72 ppm berkorelasi dengan C 58,4 dan 41,4 ppm. H 0,86 ppm berkorelasi dengan C 53,3 dan 37,6 ppm. H 1,04 ppm berkorelasi dengan C 53,3, 32,6, 39,8 dan 42,9 ppm. H 0,99 ppm berkorelasi dengan C 35,5 dan 38,5 ppm. Proton H 1,18 ppm berkorelasi dengan C 30,1, 36,2, 39,4 dan 42,9 ppm. H 1,00 ppm berkorelasi dengan C 39,4, 35,5, 32,9 dan 28,3 ppm. H 0,95 ppm berkorelasi dengan C 35,5 dan 38,5 ppm (lampiran 10-20).

Spektroskopi COSY senyawa SCC I memperlihatkan adanya hubungan proton dengan proton yang ada pada molekul tersebut. Proton H 2,25 berhubungan dengan H 0,88 ppm. Proton H 0,95, 1,00 dan 1,46 ppm saling berdekatan. Proton H 1,28 berhubungan dengan proton H 1,75 ppm (lampiran 21).

Senyawa SCC I hanya mengandung atom C, H dan O, dimana jumlah atom C adalah 30 dan jumlah atom O adalah 1 (dari gugus keton pada pergeseran kimia 213,0 ppm), maka dapat dihitung jumlah atom hidrogen.

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

1

Dengan demikian rumus molekul senyawa tersebut adalah C₃₀H₅₀O.

Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (double bond equivalen) sebagai berikut:

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

Dimana : F = jumlah cincin dan atau ikatan rangkap

X = jumlah atom C atau tetravalent

Y = jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

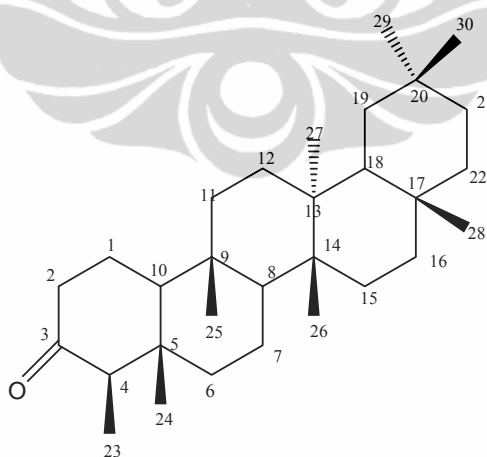
Z = jumlah atom N, P, atau atom trivalent

Dari rumus tersebut senyawa SCC I mempunyai

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

Dari perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa SCC I mempunyai 5 cincin siklik dan 1 ikatan rangkap. Analisis data ^1H - dan ^{13}C -NMR terlihat jumlah atom karbon, hidrogen dan oksigen serta jumlah cincin mengarah dugaan bahwa senyawa tersebut merupakan suatu triterpen pentasiklik dan satu gugus karbonil.

Berdasarkan data spektroskopi senyawa SCC I yang diperoleh dan dibandingkan dengan data spektroskopi senyawa friedelin, dapat disimpulkan bahwa isolate SCC I adalah friedelin (gambar 4.1) (Mahato, 1994). Data spektroskopi senyawa SCC I dengan friedelin dapat dilihat pada tabel 4.2



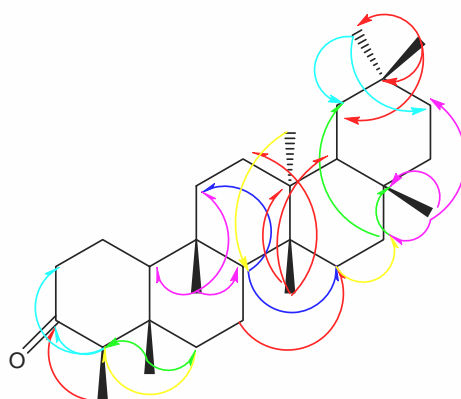
Gambar 4.1 Struktur senyawa SCC I

Tabel 4.3 Perbandingan pergeseran kimia ^{13}C -NMR, senyawa SCC I dengan friedelin literatur (diukur pada 500 Hz dengan pelarut CDCl_3) (Mahato, 1994).

Atom C	SCC I (sampel) δc (ppm)	Friedelin (literatur) δc (ppm)
1	22,5	22,3
2	42,3	42,1
3	<u>213,5</u>	213,2
4	58,4	58,2
5	41,7	41,5
6	41,4	41,3
7	18,4	18,2
8	53,3	53,1
9	37,6	37,4
10	59,6	59,4
11	35,8	35,6
12	30,7	30,5
13	39,8	39,7
14	38,5	38,3
15	32,6	32,4
16	36,2	36,6
17	30,1	30,0
18	42,9	42,8
19	35,5	35,3
20	28,3	28,1
21	39,4	39,2
22	32,9	32,7
23	7,0	6,8
24	14,8	14,6
25	18,1	17,9
26	18,9	18,6
27	20,4	20,2
28	32,3	32,1
29	31,9	31,8
30	35,2	35,0

Tabel 4.4 Nilai pergeseran kimia proton, karbon senyawa SCC I (diukur pada 500 Hz dengan pelarut CDCl_3)

No	^{13}C NMR SCC I (ppm)	^1H NMR SCC I (ppm)	HMBC senyawa SCC I (ppm)			
1	22,5 (CH ₂)	1,95				
2	42,3 (CH ₂)	1,53				
3	213,5 (C)	-				
4	58,4 (CH)	2,25 (<i>q</i>)	213,5	42,3		
5	41,7 (C)	-				
6	41,4 (CH ₂)	2,38 & 1,74	58,4	59,6		
7	18,4 (CH ₂)	1,21	32,6			
8	53,3 (CH)	1,38	32,6	35,8	41,4	
9	37,6 (C)	-				
10	59,6 (CH)	1,52				
11	35,8 (CH ₂)	1,57				
12	30,7 (CH ₂)	1,33				
13	39,8 (C)	-				
14	38,5 (C)	-				
15	32,6 (CH ₂)	1,48	36,2			
16	36,2 (CH ₂)	1,75	30,1			
17	30,1 (C)	-				
18	42,9 (CH)	2,38	59,6	58,4		
19	35,5 (CH ₂)	1,19				
20	28,3 (C)	-				
21	39,4 (CH ₂)	1,46	35,5			
22	32,9 (CH ₂)	1,28	30,1	35,5	32,3	
23	7,0 (CH ₃)	0,88 (<i>d</i> ,)	213,5	59,6	42,3	
24	14,8 (CH ₃)	0,72 (<i>s</i>)	58,4	41,4		
25	18,1 (CH ₃)	0,86 (<i>s</i>)	53,3	37,6		
26	18,9 (CH ₃)	1,04 (<i>s</i>)	53,3	32,6	42,9	39,8
27	20,4 (CH ₃)	0,99 (<i>s</i>)	35,5	38,5		
28	32,3 (CH ₃)	1,18 (<i>s</i>)	30,1	36,2	39,4	42,9
29	31,9 (CH ₃)	1,00 (<i>s</i>)	42,9	39,4		
30	35,2 (CH ₃)	0,95 (<i>s</i>)	28,3	31,9	35,5	32,9



Gambar 4.2 HMBC Senyawa SCC I

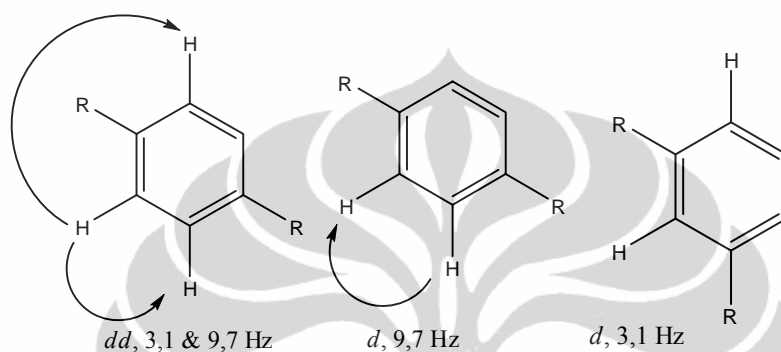
Senyawa SCC III

Senyawa SCC III berupa kristal jarum berwarna kuning, memiliki titik leleh 204-205°C. Dari data LCMS menunjukkan puncak ion molekuler [M+H] pada m/z 313.15 ini menunjukkan bahwa senyawa mempunyai berat molekul 312 (lampiran 12). Data IR memberikan serapan pada bilangan gelombang 3228 cm^{-1} (OH), 1687 cm^{-1} (C=O), 1637, dan 1595 cm^{-1} (C=C aromatik) (lampiran 10). Analisis Spektrum UV-VIS senyawa SCC III memberikan serapan maksimum pada 237,5, 261,0, 312,5 dan 375,0 nm (lampiran 11). Adanya empat buah serapan maksimum tersebut memperlihatkan bahwa senyawa SCC III memiliki gugus kromofor. Gugus kromofor adalah gugus fungsi yang dapat menyerap sinar UV, jika senyawa tersebut tidak berikatan dengan aoksokrom (gugus yang tidak menyerap sinar UV) (Creswell et al., 1982).

Spektrum ^1H NMR memperlihatkan adanya 2 buah gugus metil yakni pada pergeseran kimia $\delta_{\text{H}} = 1,65$ ppm (*singlet*) dan 1,78 ppm (*singlet*) yakni metil yang tidak memiliki tetangga proton. Pada pergeseran kimia 3,36 ppm (*doublet*) adalah satu gugus metilen dengan tetangga karbon yang mempunyai 1 atom hidrogen. Pada pergeseran kimia 5,28 ppm merupakan gugus metin yang berasal dari prenil yakni metin vinilik, sinyal triplet diberikan oleh tetangga atom karbon yang memiliki 2 atom hidrogen (CH_2) (lampiran 13-16).

Empat buah metin aromatik (Gambar 4.2) yakni pada pergeseran kimia 6,49 ppm (*singlet*) merupakan proton H aromatik yang tidak memiliki tetangga proton aromatik baik pada posisi *orto* maupun pada posisi *meta*. Metin aromatik berikutnya adalah pada pergeseran kimia 7,34 ppm (*dd*, J 3,1 & 9,7 Hz), sinyal

tersebut merupakan sinyal yang diberikan oleh metin yang memiliki tetangga dua proton aromatik dengan posisi *orto* dan *meta*. Metin aromatik ketiga pada pergeseran kimia 7,42 ppm (*d*, *J* 9,7 Hz) merupakan proton aromatik yang memiliki tetangga 1 proton pada posisi *meta*. Proton aromatik ke empat pada 7,57 ppm (*d*, *J* 3,1 Hz) yaitu proton yang memiliki tetangga proton pada posisi *meta*. Pada pergeseran kimia 13,27 ppm (*b,s*) merupakan proton dari OH yang membentuk ikatan hidrogen dengan oksigen pada keton).



Gambar 4.3 Sinyal ^1H NMR dari proton aromatik senyawa SCC III

Spektrum ^{13}C NMR dan spektrum DEPT menggambarkan adanya 18 atom C yakni terdiri dari 2 atom C primer, 1 buah C sekunder, 5 buah C tersier dan 10 atom C quarterner. Nilai pergeseran kimia masing masing atom karbon dapat dilihat pada tabel 4.3. Karbon C primer yakni pada pergeseran kimia 18,0 dan 25,4 ppm. Satu buah C sekunder terdapat pada pergeseran kimia 22,0 ppm. Lima buah atom karbon tersier pada pergeseran kimia 94,0, 109,4, 119,7, 123,3 dan 125,0 ppm. C quarterner yakni pada pergeseran kimia 103,5, 109,4, 111,3, 121,9, 131,7, 150,7, 156,8, 161,4, 164,0, dan 181,3 ppm. Salah satu C quarterner yang ada merupakan C dari cincin keton yakni pada 181.3 ppm (lampiran 19 - 20).

Spektroskopi HMQC senyawa SCC III memperlihatkan adanya korelasi antara karbon dan hidrogen langsung diantaranya : C 94,0 dengan 6,49 ppm, 119,7 dengan 7,42 ppm, 125,0 dengan 7,34, 109,4 dengan 7,57, 22,0 dengan 3,36 ppm, 123,3 dengan 5,28 ppm, 18,0 dengan 1,78, 25,9 dengan 1,65 ppm (lampiran 31 - 33).

Spektroskopi HMBC senyawa SCC III memperlihatkan adanya korelasi hidrogen dengan beberapa karbon tetangganya, diantaranya: H 6,49 dengan C pada 103,5, 111,3, 156,8 dan 164,0 ppm. H 7,42 dengan C pada 121,9, 154,7,

109,4 dan 150,7 ppm. H 7,34 dengan C pada 109,4 dan 150,7 ppm. H 7,57 dengan C pada 119,7, 125,0, 150,7 dan 181,3 ppm. H 22,0 dengan C pada 164,0, 161,4, 131,7 123,3, 111,3 ppm. H 13,27 dengan C pada 103,5, 111,3 dan 161,4 ppm (lampiran 34 – 39).

Analisis data spektroskopi resonansi magnet inti proton dan karbon, dan spektroskopi dua dimensi HMQC, HMBC (lampiran 19 – 28) dugaan awal bahwa senyawa SCC III, mempunyai 18 buah atom C dan 16 atom H dan 2 atom O yakni O pada keton dan pada OH.

Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (*double bound equivalen*) sebagai berikut :

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

Dimana : F = jumlah cincin dan atau ikatan rangkap

X = jumlah atom C atau tetravalent

Y = jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

Z = jumlah atom N, P, atau atom trivalent

Dari rumus tersebut senyawa SCC III mempunyai

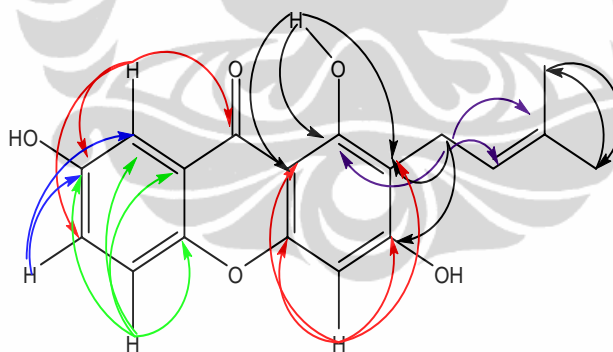
$$F = 18 - (0,5 \times 16) + 1 = 11$$

Dari perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa SCC III mempunyai jumlah cincin siklik dan atau ikatan rangkap sebanyak 11 buah.

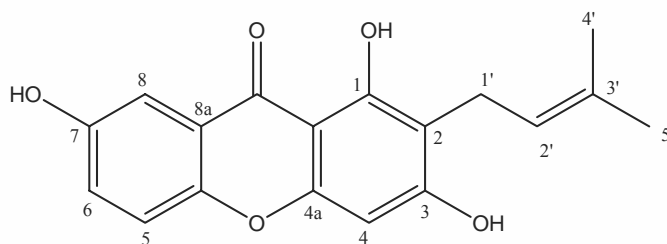
Untuk memperkirakan struktur senyawa SCC III dilakukan penelusuran dengan membandingkan profil pergeseran kimia ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HMBC dan HMQC serta dengan membandingkan senyawa SCC III dengan literatur (Carpenter et al., 1969). Dengan demikian senyawa SCC III adalah 2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton. (gambar 4.4 dan 4.5)

Tabel 4.5 Nilai pergeseran kimia proton, karbon, HMBC senyawa III dari *Calophyllum canum* Hook.f.

No	¹³ C NMR	¹ H NMR	Multifilisitas, <i>J</i>	HMBC (ppm)				
1	161,4	-						
2	111,3	-						
3	164,0	-						
4	94,0	6.49	1H, <i>s</i>	103,5	111,3	156,8	164,0	
4a	156,8							
5	119,7	7.42	1H, <i>d</i> , <i>J</i> =9,7 Hz	121,9	154,7	109,4	150,7	
5a	154,8	-						
6	125,0	7.34	1 H, <i>dd</i> , <i>J</i> =3,1 & 9,7 Hz	109,4	150,7			
7	150,7	-						
8	109,4	7.57	1H, <i>d</i> , <i>J</i> =3,1 Hz	125,0	150,7	181,3		
8a	121,9	-						
9	181,3	-						
9a	103,5	-						
1'	22,0	3.36	2H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,3 Hz	164,0	161,4	131,7	123,3	111,3
2'	123,3	5.28	1 H, <i>t</i> , <i>J</i> =1,2 Hz					
3'	131,7							
4'	18,0	1.78	3 H, <i>s</i>	25,4				
5'	25,4	1.65	3 H, <i>s</i>	17,8				
OH		13,27	1 OH	103,5	111,3	161,4		



Gambar 4.4. HMBC senyawa SCC III



Gambar 4.5. Struktur Senyawa SCC III (2-(3,3-dimetilalil), 1,3,7-trihidroksisanton)

Senyawa SCC IV (= SCC II)

Senyawa SCC IV (=SCC II): diperoleh sebagai kristal jarum berwarna kuning muda, dengan titik leleh 220-221 °C. Dari data IR memberikan pita serapan 1683 cm^{-1} (merupakan serapan oleh vibrasi ulur dari inti keton, C=O), dan 1631 dan 1595 cm^{-1} (merupakan vibrasi ulur dari C=C aromatik) (lampiran 40). Spektrum UV-VIS memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 218,0, 288,0 dan 315,5 nm (lampiran 41). Adanya serapan pada sinar UV merupakan serapan akibat adanya gugus kromofor yakni dari ikatan rangkap terkonjugasi pada cincin benzen. Spektrum ^1H NMR dengan pelarut aseton, pada frekwensi 500 MHz ada 5 buah metin yakni terdiri dari 4 buah proton aromatik pada 6,30 ppm (1H, *dd*, $J = 8,5$ dan $3,1$ Hz proton substitusi *orto*), 5,98 ppm (1H, *s*), 5,93 ppm (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz, 1 proton substitusi orto), 7,38 ppm (1H, *d*, $J = 3,1$ Hz, 1 proton substitusi orto) dan 1 metin alifatik pada 2,09 ppm. 7 buah metilen terlihat pada pergeseran kimia 3,23, 2,94, 2,09, 1,73, dan 1,38 ppm. 3 buah metil pada 0,90, 0,95 dan 1,00 ppm (lampiran 45 - 49).

Spektrum ^{13}C NMR dengan pelarut aseton dan pada frekwensi 125 MHz serta spektrum DEPT, terdapat 6 buah C quartener 206,8 ppm C dari keton, 168,5 ppm merupakan C keton inti kumarin, 162,9 ppm C aromatik yang terikat dengan O pada inti kumarin, 159,5, 159,0 105,0, 103,2 ppm adalah C quarterner pada cincin aromatik. Ada 5 buah C tersier yaitu pada 110,4, 100,5, 111,6, 128,2 dan 29,0 ppm. 6 buah metilen pada 54,0, 46,2, 45,3, 39,1, 32,3, dan 25,1 ppm. Dan 3 metil yakni 14,4, 22,9, 22,6 ppm (lampiran 43-44 dan 65). Data LC-MS menunjukkan puncak ion molekuler $[\text{M}+\text{H}]^+$ pada 315,15 (lampiran 42), data ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai berat molekul $[\text{M}]^+ = 314$ dengan rumus molekul $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$.

Spektroskopi HMQC senyawa SCC IV memperlihatkan adanya korelasi langsung karbon dengan hidrogen, diantaranya : C 110,4 dengan H 5,98 ppm, C 111,6 dengan H 5,93 ppm, C 100,5 dengan H 6,30 ppm, C 128,2 dengan H 7,38 ppm, C 54,0 dengan H 3,09 ppm, C 45,3 dengan H 3,23 ppm, C 32,3 dengan H 1,38 ppm, C 25,1 dengan H 1,64 ppm, C 14,4 dengan H 0,91 ppm, C 46,2 dengan H 2,83 ppm, C 39,1 dengan H 2,95 ppm, C 29,0 dengan H 2,00 ppm, C 22,6 dengan H 0,95 ppm dan C 22,9 dengan H 1,00 ppm (lampiran 50 – 53).

Spektroskopi HMBC senyawa SCC IV memperlihatkan korelasi hidrogen dengan karbon yang ada didekatnya (tidak langsung), yakni; H 5,98 dengan C 105,0 ppm, H 5,93 dengan C 159,5, 159,0, 103,2 dan 46,2 ppm, H 6,30 dengan C 162,9, 103,2 dan 159,5 ppm, H 7,38 dengan C 159,0 ppm, H 3,09 dengan C 206,8 dan 25,1 ppm, H 3,23 dengan C 206,8, 25,1 dan 32,3 ppm, H 1,38 dengan C 45,3, H 1,64 dengan C 45,3 ppm, H 0,91 dengan C 32,3 ppm, H 2,83 dengan C 103,2, 111,6 dan 29,1 ppm, H 2,95 dengan C 22,6, 29,0, 159,5 dan 103,2 ppm, H 2,00 dengan C 22,6, 39,1 ppm, H 0,95 dengan C 39,1 ppm, dan H 1,00 dengan C 22,6 dan 39,1 ppm (lampiran 54 – 63).

Dari data spektroskopi COSY senyawa SCC IV memperlihatkan adanya korelasi diantara proton dari molekul tersebut. Proton H 0,95 ppm berkorelasi dengan proton H 1,00 dan 2,00 ppm. Proton H 0,90 berkorelasi dengan proton H 1,64 ppm. proton H 1,40 berkorelasi dengan H 1,64 ppm (lampiran 64).

Dari data spektroskopi resonansi magnet inti proton dan karbon, dugaan awal bahwa senyawa SCC IV 20 buah atom C dan jumlah atom H adalah 26 dan 3 atom O.

Jumlah cincin dan ikatan rangkap dari senyawa dapat dihitung dengan menggunakan rumus indeks kekurangan hidrogen (*double bound equivalen*) sebagai berikut :

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

Dimana : F = jumlah cincin dan atau ikatan rangkap

X = jumlah atom C atau tetravalent

Y = jumlah atom H, halogen atau atom monovalen

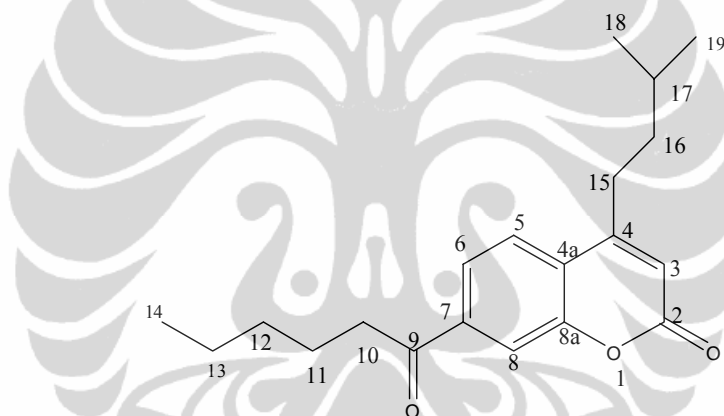
Z = jumlah atom N, P, atau atom trivalent

Dari rumus tersebut senyawa SCC IV mempunyai

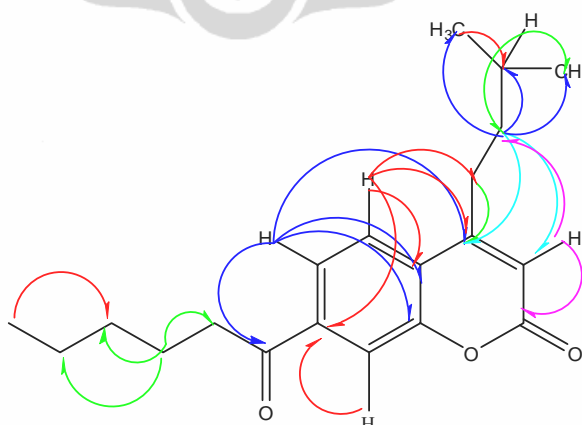
$$F = 21 - (0,5 \times 28) + 1 = 8$$

Dari perhitungan tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa SCC IV mempunyai jumlah cincin siklik dan atau ikatan rangkap sebanyak 8 buah.

Untuk memperkirakan struktur senyawa SCC IV dilakukan penelusuran dengan membandingkan profil pergeseran kimia ^{13}C NMR, ^1H NMR, HMBC, HMQC dan COSY (lampiran 32 – 54). Dengan demikian senyawa SCC IV diduga adalah suatu senyawa turunan kumarin dengan rumus molekul $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$ dengan nama 4-(17,17-dimetilalil)-7-(9-karbonilseksil)-kumarin atau canum kumarin. (gambar 4.6 dan 4.7)



Gambar 4.6. Struktur Senyawa SCC IV [4-(17,17-dimetilalil)-7-(9-karbonilseksil)-kumarin



Gambar 4.7. HBMC Senyawa SCC IV

Tabel 4.6 Nilai pergeseran kimia proton, karbon, HMBC senyawa IV dari *C. canum* Hook.f.

No	¹³ C NMR	¹ H NMR	Multifilisitas, <i>J</i>	HMBC (ppm)			
1	-						
2	168,5	-					
3	110,4	5,98	1 H, <i>s</i>	105,0			
4	103,2	-					
4a	159,5	-					
5	111,6	5,93	1 H, <i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz	159,5	159,0	103,2	46,2
6	100,5	6,30	1 H, <i>dd</i> , <i>J</i> =3,1 & 8,5 Hz	162,9	103,2	159,5	
7	159,0	-					
8	128,2	7,38	1 H, <i>d</i> , <i>J</i> =3,1 Hz	159,0			
8a	162,8	-					
9	206,8	-					
10	54,0	3,09	2H, <i>m</i>	206,8	25,1		
11	45,3	3,23	2 H, <i>m</i>	206,8	25,1	32,3	
12	32,3	1,38	2H, <i>m</i>	45,3			
13	25,1	1,64	2H, <i>d</i>	45,3			
14	14,4	0,91	3 H, <i>t</i>	32,3			
15	46,2	2,83	2 H, <i>m</i>	103,2	111,6	29,1	
16	39,1	2,95	2H, <i>m</i>	22,6	29,0	159,5	103,2
17	29,0	2,00	1 H, <i>m</i>	22,6	39,1		
18	22,6	0,95	3 H, <i>d</i>	39,1			
19	22,9	1,00	3 H, <i>d</i>	22,6	39,1		

4.6 Uji aktivitas Antimalaria Senyawa Murni

Uji antimalaria dari tiga senyawa murni yang berhasil diisolasi memperlihatkan bahwa, senyawa SCC I dan SCC III tidak memperlihatkan aktivitas antimalaria, sedangkan senyawa SCC IV memperlihatkan aktivitas antimalaria, namun aktivitas antimalariannya lemah.

Uji aktivitas antimalaria yang dilakukan pada penelitian ini adalah pengujian secara *in vitro*, dengan menggunakan metode yang diperkenalkan oleh Trager dan Jensen (1969). Dengan uji ini dapat dilihat aktivitas antimalaria suatu senyawa dengan menganalisis penurunan pertumbuhan parasitemia yang diberikan perlakuan dengan senyawa uji. Uji secara *in vitro* ini menggambarkan aktivitas antimalaria terhadap parasit *P. falciparum* pada fase eritrosit, karena parasit ditumbuhkan seolah olah berada dalam sel darah merah tubuh. Kondisi

lingkungan pun di kondisikan menyerupai tubuh, yakni diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran gas karbon dioksida. (Trager et al., 1969)

Tiga senyawa kimia yang berhasil diisolasi dari tanaman *C. canum* Hook.f. di uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*. Setiap sampel diuji dengan lima variasi konsentrasi yakni 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} mg μ L $^{-1}$, dimana masing masing sampel dilakukan pengujian dengan dua kali pengulangan. Kontrol adalah parasit yang tidak diberikan senyawa uji. Hambatan pertumbuhan dihitung berdasarkan hasil perbandingan dengan pertumbuhan pada kelompok kontrol tanpa obat. Efek hambatan pertumbuhan merupakan nilai rata rata dari eksperimen yang dilakukan secara duplo. (Data uji aktivitas antimalaria senyawa murni dapat dilihat pada tabel 4.5)

Tabel 4.7. Data uji aktivitas antimalaria senyawa murni terhadap pertumbuhan *P. falciparum*

Sampel (mg μ L $^{-1}$)	Parasitemia (%)		Rata rata (%)	Parasitemia (%)		Rata rata (%)	Pertumbuhan (%)	Keterangan
SCC I								
Kontrol	1,5	1,3	1,4	3,1	3	3,05	100,00	Tidak tergantung dosis
10^{-9}	1,5	1,3	1,4	2,8	2,6	2,7	88,50	
10^{-8}	1,5	1,3	1,4	2,8	2,6	2,7	88,50	
10^{-7}	1,5	1,3	1,4	2,8	2,6	2,7	88,50	
10^{-6}	1,5	1,3	1,4	2,8	2,6	2,7	88,50	
10^{-5}	1,5	1,3	1,4	2,8	2,6	2,7	88,50	
SCC III								
Kontrol	1,5	1,3	1,4	3,1	3	3,05	100,00	Tidak tergantung dosis
10^{-9}	1,5	1,3	1,4	2,7	2,75	2,75	89,30	
10^{-8}	1,5	1,3	1,4	2,7	2,75	2,75	89,40	
10^{-7}	1,5	1,3	1,4	2,7	2,75	2,75	89,30	
10^{-6}	1,5	1,3	1,4	2,7	2,75	2,75	89,30	
10^{-5}	1,5	1,3	1,4	2,7	2,75	2,75	89,30	
SCC IV								
Kontrol	0,8	0,8	0,8	2,2	2,1	2,15	100,00	Tergantung dosis Aktivitas lemah
10^{-9}	0,8	0,8	0,8	1,9	1,9	1,9	88,40	
10^{-8}	0,8	0,8	0,8	1,7	1,7	1,7	79,10	
10^{-7}	0,8	0,8	0,8	1,4	1,4	1,4	65,20	
10^{-6}	0,8	0,8	0,8	1,3	1,3	1,3	60,50	
10^{-5}	0,8	0,8	0,8	1,2	1,3	1,25	58,10	
Klorokuin								
kontrol	0,45	0,5	0,47	3,7	4	3,85	100,00	Tergantung dosis $IC_{50} 3 \times 10^{-9}$
10^{-9}	0,45	0,5	0,47	2,3	2,8	2,55	66,20	
10^{-8}	0,45	0,5	0,47	0,3	0,8	0,55	14,30	
10^{-7}	0,45	0,5	0,47	0,08	0,09	0,085	2,20	
10^{-6}	0,45	0,5	0,47	0,03	0,03	0,035	0,90	
10^{-5}	0,45	0,5	0,47	0,01	0,01	0,005	0,10	

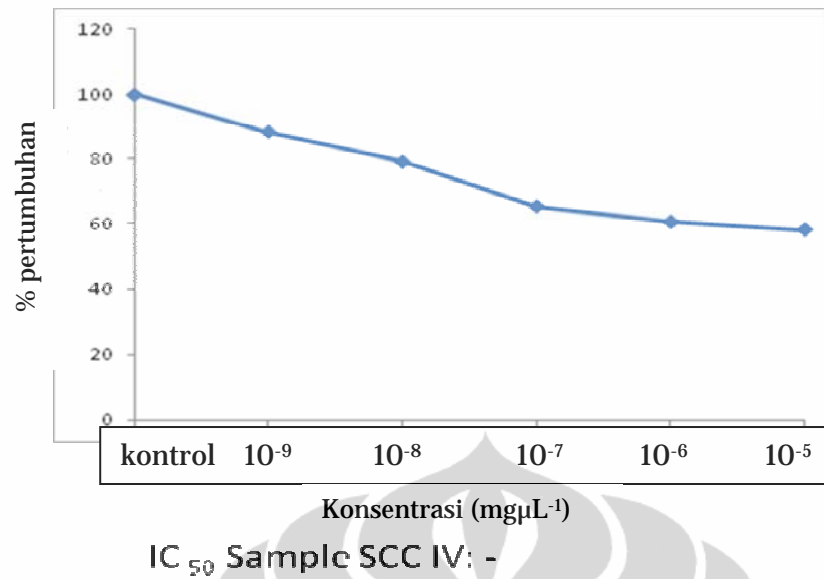
Senyawa SCC I dan senyawa SCC II memperlihatkan penurunan parasitemia yang sangat lemah, dan penurunan tersebut tidak berhubungan dengan dosis perlakuan (*not dose dependent*). Pada senyawa SCC I, semua konsentrasi uji memperlihatkan penurunan parasitemia sebanyak 11,48 %. Perbedaan konsentrasi tidak memperlihatkan terjadinya perbedaan aktivitas inhibisi terhadap parasit. Senyawa SCC I adalah friedelin yang termasuk kedalam golongan triterpen. Pada penelitian ini terlihat bahwa triterpen jenis friedelin tidak memberikan aktivitas hambatan pertumbuhan parasit.

SCC III memperlihatkan aktivitas antimalaria yang sangat lemah dan juga aktivitas tersebut tidak tergantung dengan dosis perlakuan. Semua konsentrasi senyawa uji yang dibuat hanya mampu menyebabkan hambatan pertumbuhan parasitemia sebesar 10,66 %. SCC III merupakan senyawa kimia turunan santon, dan berbagai senyawa turunan santon telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria. Penelitian mengenai aktivitas antimalaria santon dari tanaman *Garcinia griffithii*, didapat senyawa 1,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2,7-diprenilsanton yang memperlihatkan aktivitas antimalaria yang potensial dengan IC_{50} 7,25 μ M. sedangkan senyawa 1,7-dihidroksisanton yang diisolasi dari tanaman yang sama, tidak aktif sebagai antimalaria (Elfita, 2009). Senyawa santon dari *C. caledonicum* memperlihatkan aktivitas antimalaria yang potensial, berdasarkan uji *in vitro* yang dilakukan oleh Hay (2004). Senyawa santon tersebut adalah dimetilklabasanton, kalothwaitesisanton dan 6-deoksi- γ -mangostin (Hay, 2004).

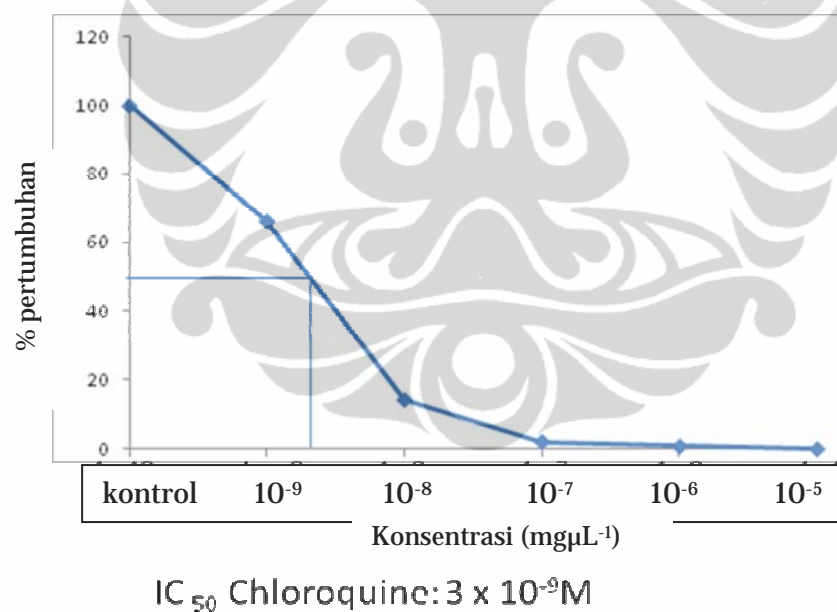
Uji Antimalaria secara *in vitro* terhadap senyawa 1,2-dihidroksi-6,8-dimetoksisanton yang diisolasi dari tanaman *Andrographis paniculata* memperlihatkan aktivitas antimalaria yang substansial dengan nilai IC_{50} 4 μ g mL^{-1} (Dua, 2004). Aktivitas antimalaria dari senyawa santon sangat berpengaruh dengan posisi ikatan hidrogen pada cincin aromatiknya. Santon yang memiliki hidroksi pada C 2 memberikan aktivitas antimalaria yang potensial, sedangkan jika posisi hidroksi berada pada C 1, 4 atau 8 memiliki aktivitas antimalaria yang sangat lemah (Dua, 2004). Aktivitas antimalaria dari senyawa santon disebabkan oleh kemampuan santon membentuk kompleks dengan heme

dan penghambatan pembentukan hemozoin. Heme adalah hasil penguraian hemoglobin oleh parasit, yang merupakan senyawa radikal yang bersifat toksik terhadap parasit plasmodium. Oleh karena itu heme tersebut akan dirubah oleh parasit menjadi bentuk yang tidak toksik yakni hemozoin (berbentuk endapan) (Ignatuschenko, 1997, 2000).

Dari ketiga senyawa murni yang diuji, ternyata senyawa SCC IV memperlihatkan aktivitas antimalaria, hanya saja aktivitas tersebut lemah karena pada konsentrasi 10^{-5} mg μ L $^{-1}$ belum didapatkan nilai IC₅₀. Pada konsentrasi 10^{-5} mg μ L $^{-1}$ senyawa hanya mampu menghambat pertumbuhan sebesar 41,87 % parasitemia. Pada konsentrasi 10^{-9} mg μ L $^{-1}$ terjadi penghambatan pertumbuhan parasit sebesar 11,60%. Hambatan pertumbuhan parasit sebesar 20,90 % dapat dilihat pada konsentrasi senyawa SCC IV adalah 10^{-8} mg μ L $^{-1}$. Pada konsentrasi 10^{-7} mg μ L $^{-1}$ memperlihatkan hambatan pertumbuhan parasit hingga 34,80 %. Selanjutnya peningkatan nilai penurunan parasitemia hingga 39,50% terjadi pada konsentrasi 10^{-6} mg μ L $^{-1}$. Dari data diatas dapat ditarik kesimpulan bahwa SCC IV memperlihatkan aktivitas hambatan terhadap pertumbuhan parasit *P. falciparum*, penurunan parasitemia ini berhubungan dengan konsentrasi senyawa (*dose dependent*). Oleh karena itu dapat dibuatkan grafik penghambatan pertumbuhan parasit terhadap dosis yang diberikan (gambar 4.8). Peningkatan konsentrasi senyawa uji memperlihatkan penurunan jumlah parasitemia. Hambatan pertumbuhan parasit yang berhubungan dengan dosis juga diperlihatkan oleh senyawa kontrol positif yaitu klorokuin. Penurunan parasitemia sangat tajam karena klorokuin memiliki aktivitas yang sangat kuat sebagai antimalaria, dengan IC₅₀ sebesar 3×10^{-9} M. (Grafik hambatan pertumbuhan parasit oleh klorokuin dapat dilihat pada gambar 4.9)



Gambar 4.8. Grafik hambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* oleh senyawa SCC IV



Gambar 4.9. Grafik hambatan pertumbuhan parasit *P. falciparum* oleh klorokuin

4.7 Uji Aktivitas Toksisitas Udang *A. salina* Leach Terhadap Senyawa Murni

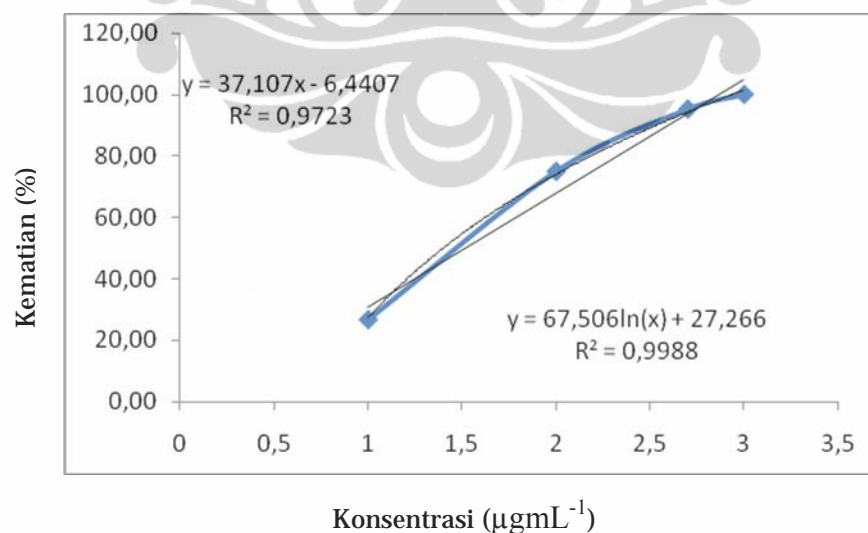
Tiga senyawa murni hasil isolasi dari tanaman *C. canum* Hook. f. telah diuji aktivitas toksik terhadap udang *A. salina* Leach. dari tiga senyawa tersebut, semuanya memiliki aktivitas toksik yang cukup kuat yakni senyawa SCC I

dengan nilai LC_{50} $8,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ (gambar 4.10), SCC III dengan IC_{50} $16,79 \mu\text{g mL}^{-1}$ (gambar 4.11) dan SCC IV dengan LC_{50} $1,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ (gambar 4.12). (data hasil BSLT senyawa SCC I, SCC III dan SCC IV dapat dilihat pada tabel 4.6)

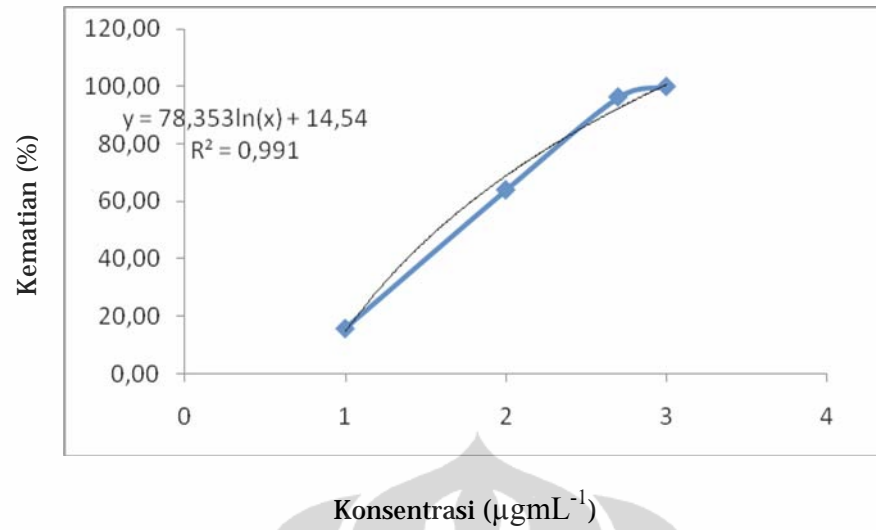
Tabel 4.8 Hasil Uji BSLT Senyawa Murni

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Awal			Mati			Mortalitas (%)	LC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
SCC I	10	10	10	10	4	3	4	26,83	8,92
	100	10	10	10	7	7	8	75,00	
	500	10	10	10	9	9	9	95,40	
	1000	10	10	10	10	10	10	100,00	
SCC III	10	10	10	10	2	3	2	15,91	16,79
	100	10	10	10	6	8	4	64,10	
	500	10	10	10	9	9	10	96,36	
	1000	10	10	10	10	10	10	100,0	
SCC IV	10	10	10	10	8	8	8	75,0	1,09
	100	10	10	10	10	9	9	96,3	
	500	10	10	10	10	10	10	100,0	
	1000	10	10	10	10	10	10	100,0	
Kontrol	Vial I	10	10	10	0	0	0	0,00	-
	Vial II	10	10	10	0	0	0	0,00	
	Vial III	10	10	10	0	0	0	0,00	
	Vial IV	10	10	10	0	0	0	0,00	

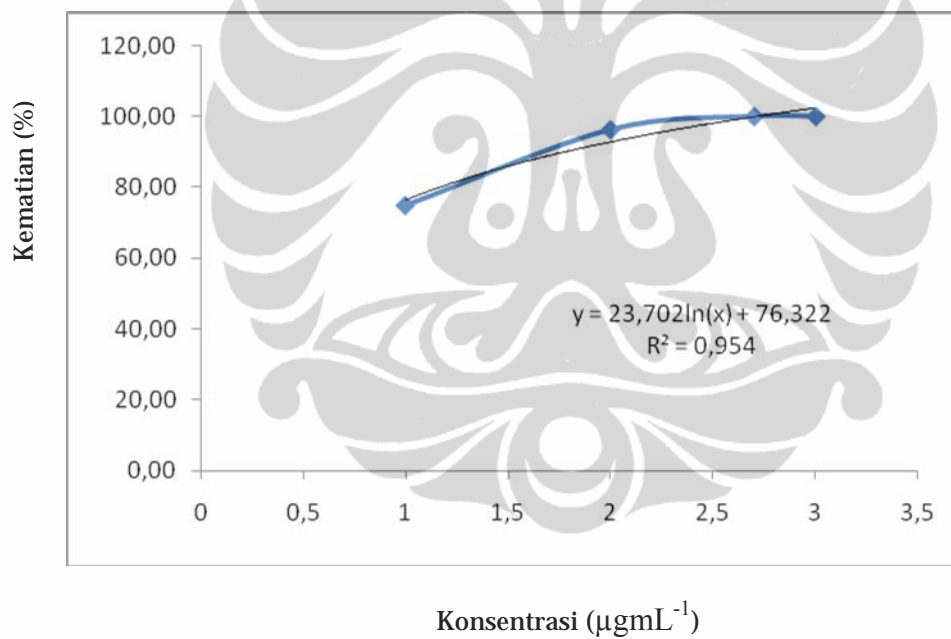
Berikut adalah grafik toksisitas senyawa murni terhadap udang *A. salina* Leach.



Gambar 4.10. Grafik toksisitas senyawa SCC I terhadap udang *A. salina* Leach.



Gambar 4.11. Grafik toksisitas senyawa SCC III terhadap udang *A. salina* Leach.



Gambar 4.12. Grafik toksisitas senyawa SCC IV terhadap udang *A. salina*

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan data penelitian yang telah diperoleh, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Uji pendahuluan aktivitas toksisitas udang *A. salina* Leach terhadap tiga fraksi yakni fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol menunjukkan aktivitas toksisitas yang cukup potensial dengan IC_{50} berturut turut 5,26, 190,55 dan 891,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
2. Dari kulit batang tanaman *Calophyllum canum* Hook.f. diisolasi tiga senyawa yaitu SCC I (friedelin), SCC III (2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton) dan SCC IV diduga adalah (4-(17,17-dimetilalil)-7-(9-karbonilseksil)-kumarin atau canum kumarin).
3. Senyawa friedelin dan 2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton tidak menunjukkan aktivitas antimalaria, sedangkan senyawa canum kumarin menunjukkan aktivitas antimalaria, namun aktivitas antimalaria senyawa tersebut lemah, dengan hambatan pertumbuhan parasit pada konsentrasi 10^{-5} $\text{mg}\mu\text{L}^{-1}$ adalah 41,87 %.
4. Senyawa friedelin, 2-(3',3'-dimetilalil)-1,3,7-trihidroksisanton, dan canum kumarin memiliki toksisitas terhadap udang *A. salina* Leach yakni dengan LC_{50} berturut turut 8,92, 16,79 dan 1,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2 SARAN

1. Senyawa SCC IV memperlihatkan aktivitas antimalaria secara *in vitro*, disarankan untuk dilakukan uji aktivitas antimalaria *in vivo*, untuk melihat apakah senyawa ini memiliki aktivitas antimalaria jika diberikan secara oral kepada hewan coba.
2. Senyawa SCC I, SCC III dan SCC IV memiliki aktivitas toksik yang potensial sehingga disarankan agar dilanjutkan uji aktivitas biologi yang lain seperti antioksidan dan antikanker.



DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. (1997). *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: Andi. 27-35
- Bloland, P.B., (2001). Drugs Resistance in Malaria. *WHO*
- Bandara., et al. (1986) Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Langka. *Phytochem.* **25**, No 2, 425-428.
- Bourdy, G., P. Oporto., A. Gimenez. and E. Deharo., 2004. A. Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activities of plants used by Isoceno-Guarrani Indians. *J. of Ethno*, 93: 269-277.
- Cao, S-G., et al., (1998). Minor Coumarins from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide* and Synthesis of Cytotoxic Calanone Derivatives. *Helv. C. Acta.* **81**: Issue 5-8. 1404-1415.
- Cao, S-G., et al., (1998). Coumarins from *Calophyllum teysmannii*. *Phytochem.* **47**: Issue 5. 773-777.
- Carpenter, J., H.D, Locksley., F, Scheinmann., (1969). The Senyawa murniion structure of four xanthone from *C. canum* Hook. F. *J. Chem.Soc. C.* 486-489
- Creswell, C.J., O.A, Runquist., and M.M, Campbell., (1982). *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Edisi ke 3. Diterjemahkan oleh: K. Padmawinata dan I, Soediro. Bandung. Penerbit ITB.
- Daniel. M., (2006). *Medicinal Plants Chemistry and Properties*. USA.: Science Publishers. Hal. 98
- Dachriyanus., (2004). *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*, Padang: Andalas University Press.
- Depkes RI., (2006). Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan
- Dharmaratne, H. R. W., Sotheeswaran, S., and Balasubramaniam, S., (1984). Triterpenes and neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochem.* **23**: Issue 11. 2601- 2603.
- Dharmaratne, H.R.W., W.M.A.P, Wanigasekera. (1995). Xanthenes from root bark of *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochem.* **47**. 240-250.
- Dharmaratne, H.R.W & W.M.N..M Wijesinghe. (1997). A Trioxygenated diprenylated chromenxanthone from *Calophyllum moonii*. *Phytochem.* **46**, No 7, 1293-1295.

- Dharmaratne, H.R.W., W.M.N.M, Wijesinghe., V, Thevanasem., (1999). Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* spesies, against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *J. of Ethnopharm.* **66**, 339-342.
- Dua V.K., et al., (2004). Anti-malarial activity of some xanthenes senyawa murnied from the roots of *Andrographis paniculata*. *J. of Ethonopharm.* **95**. 247-251.
- Depkes RI., (1995). *Farmakope Indonesia IV*. Jakarta: Depertemen Kesehatan. Hal; 1061 -1073
- Elfita E., et al., (2009). Antiplasmodial and other constituents from four Indonesian *Garcinia spp.* *Phytochem.* **70**. 907 – 912.
- Eijkman., (2010). *Pelatihan Propagasi Malaria*. Lembaga Biologi Molekuler Eijkman
- Eisai Indonesia., (1986). Medicinal Herb Index In Indonesia. Eisai
- Garcia, L.S., D.A, Bruckner., (1997). *Diagnostic Medical Parasitology. 3rd Edition*. Washington DC: ASM Press.
- Gay, F., et al., (1994). In vitro resistance of *Plasmodium falciparum* to qinghaosu derivatives in West Africa, *The Lancet.* **343**. 350–351.
- Go, M.L., (2003). Novel antiplasmodial agents. *Med Res Rev.* **23**. 456-487.
- Gunatilaka, A.A.L., et al., (1984). Terpenoid and biflavonoid constituents of *Calophyllum calaba* and *garcinia spicata*. *Phytochem.* **23**. 323-328
- Guilet, D., et al., (2001). Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. *Phytochem.* **58**. 571-575.
- Ghisalberti, E.L., (1993). “Detection and Senyawa murniion of Bioactive Natural Products”, *Bioactive Natural Products; Detection, Senyawa murniion, and Structural Determination*, Ed. Steven M. Collegate and Russell J. Molyneux, London: CRC Press Inc.
- Gritter, R, J., J. M. Bobbits, and A. E. Schwarting, (1987). *Introduction to Chromatography (Pengantar Kromatografi)*, Edisi ke-2, diterjemahkan oleh K.Padmawinata, Bandung: Penerbit ITB.
- Harbone, J.B., (1987). “Metode Fitokimia”. Ed II., Diterjemahkan Oleh Kosasih Patmawinata dan Iwang Sudiro. Bandung: ITB.
- Harmita, dan Radji, M., (2008)., *Buku Ajar Analisis Hayati*, (Ed ke-3). Jakarta Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hay A.E, et al., (2004). Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii.*, *Life Sciences.* **75**. 3077-3085.

- Hesse, M., H. Meier, and B. Zeeh., (1991) *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*, 4.ü bearbeitete Auflage, New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Heyne., (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia*, Jilid III. Cetakan ke 1, Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Departemen Kehutanan. Gatot Subroto. Jakarta 1374-1380.
- Ignatushenko M.V., et al., (1997). Xanthones as antimalarial agents; studies of possible mode of action. *FEBS Lett.* **409**. 67-73.
- Iinuma, M., H, et al. (1996). Six xanthones from *Calophyllum austroindicum*. *Phytochem.* **43**. 681-685
- Iinuma, M., et al. (1997). Prenylated xanthonoids from *Calophyllum apetalum*. *Phytochem.* **46**. 1423-1429.
- Iinuma, et al. (1994). Two xanthones from root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochem.* **35**. 527-532.
- Ishikawa, T., et al., (1999). An approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarin synthesis: An enantioselective construction of 2,3-dimethyl-4-chromanone ring by quinine-assisted intramolecular Michael-type addition. *Tetrahedron Lett.* **40**. 3777-3780.
- Ito, T., et al., (2003). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. *J. of Nat. Pro.* **66**. 368-371.
- Itoigawa, M., C, et al., (2001). Cancer chemopreventive agents, 4-prenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Canc. Lett.* **169**. 15-19
- Jamilah., (2008). Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia Serta Uji Aktivitas Biologi Kulit Batang Marga *Calophyllum* spp. FMIPA UI.
- Jambou, R., et al., (2005) Resistance of *Plasmodium falciparum* field senyawa murnies to in vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6, *The Lancet* . **366**. 1960–1963.
- Kijjoa, A., et l. (2000). Xanthon from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Phytochem.* **53**. 833-836.
- Kalauni, J., and Ginsburg, H., (1992). Effect of cinnamic acid derivatives on in vitro growth of plasmodium falciparum and on the permeability of the membrane of malaria-infected eritrocytes. *Antimicrob. A. Chem.*. **36**. 1102-1108.
- Kumar, V., S. Ramachandran., M.U.S. Sultanbawa. (1976). Xantyhones and triterpenoids from timber of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochem.* **15**. 2016-2017.

- Kirk, R.G., et al., (1994). Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*. *Tetrahedron Lett.* **35**. 5821-5824.
- Laure, F., et al., (2008). Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC–DAD of *Calophyllum inophyllum* leaf extracts from French Polynesia Islands. *Anal. Chim. Acta.* **624**. 147-153.
- Linn, T.Z., et al. (2005). Cassane and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their Antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*. *J. Nat. Prod.* **68**. 706-710
- Mahato, S.B. and Kundu, A.P., 1994, review article number 98. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A Compilation and some salient features, *Phytochemistry*, **37** (6), 1517-1575.
- Natadisastra, D., T, Rusmartini., (1999). *Bunga Rampai Protozoologi Kedokteran*. Edisi 2. Jatinagor (Bandung): Bagian Parasitologi FK-Unpad
- Noble, E.R., G.A, Nolbe., (1989). *Parasitologi* “ Biologi parasit Hewan”, edisi ke 5, diterjemahkan oleh Wardiarto, editor N, Soeripto. Yogyakarta: UGM Pres. Hal 165-263.
- Reyes-Chilpa, R., et al. (2004). Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Science.* **75**. 1635-1647.
- Ravelonjato, B., Kunesch, N., Poisson, J.E, (1987). Neoflavonoids from the stem bark of *Calophyllum verticillatum*. *Phytochem.* **26**. 2973-2976..
- Sastroamijoyo. A.S., & Tjokronegoro. A. (1994). *Obat Asli Indonesia*. Jakarta: Dian Rakyat. Hal. 192
- Shen, Y-C., et al., (2005). Bioactive Pyranoxanthenes from the roots of *Calophyllum blancoi*. *Chem Pharm Bull.* **53**. 244-247.
- Soerjanegara & R.H.M.J, Lemmens., (1994). Plant Resources of Sout-East Asia 5. *Prosea*, Bogor: Pudoc. 114-138
- Silverstein, R.M., G.C. Bassler, T.C. Morrill, (1991). *Spectrometric, Identification of Organic Componuds*, 5th Ed., New York: John Willey and Sons.
- Tjitrosoepomo, G., (1996). *Taksonomi Tumbuhan*. Yogyakarta: GMU Press. 266-268
- Trager, W and Jensen, J.B., (1976). Human malaria parasites in continous culture. *Science.* **193**. 673 - 676.

Wang, L., T. Ma., G. Liu. (2006). Recent Progress In Calophyllum Coumarins As Potent Anti-HIV Agents. Edited by Liang, X-T & W-S. Fang. John Wiley & Son, Inc

Winstanley, P.A., S.A, Ward., R.W, Snow., (2002). Clinical status and implication of antimalarial drugs resistance, *Microbe and Infect.* **4**. 157-164

Yimdjo, M. C., et al. (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochem.* **65**. 2789-2795.

http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n8/Fig_tab/nrmicro1465_tab.tdMI
diunduh pada 28 Februari 2010 pukul 22.30 WIB

http://www.nature.com/nrg/journal/v4/n3/box/nrg1021_BX2.html diunduh pada tanggal 28 Februari 2010 pukul 16.25 WIB

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> diunduh pada tanggal 28 Februari 2010 pukul 16.30 WIB.

