



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, ELUSIDASI STRUKTUR DAN UJI BIOAKTIVITAS
KANDUNGAN KIMIA FRAKSI ETIL ASETAT
KULIT BATANG TANAMAN *Calophyllum macrophyllum* Scheff**

TESIS

**FRENGKI
0806422063**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**ISOLASI, ELUSIDASI STRUKTUR DAN UJI BIOAKTIVITAS
KANDUNGAN KIMIA FRAKSI ETIL ASETAT
KULIT BATANG TANAMAN *Calophyllum macrophyllum* Scheff**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains

**FRENGKI
0806422063**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : FRENGKI

NPM : 0806422063

Tanda Tangan :

Tanggal : 27 Desember 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : FRENGKI
NPM : 0806422063
Program Studi : Magister Ilmu Kefarmasian
Judul Tesis : ISOLASI, ELUSIDASI STRUKTUR DAN UJI
BIOAKTIVITAS KANDUNGAN KIMIA FRAKSI ETIL
ASETAT KULIT BATANG TANAMAN *Calophyllum
macrophyllum* Scheff

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Berna Elya, M.Si ()

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

Penguji : Prof. Dr. Sumali Wiryowidagdo ()

Penguji : Dr. Abdul Mun'im, MS ()

Penguji : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 27 Desember 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. Berna Elya Apt, M.Si, 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 sisinya.
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. Prof. 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. Seluruh karyawan dan rekan-rekan mahasiswa Program Pasca Sarjana yang melakukan penelitian di Puslit. Kimia LIPI Serpong
7. Semua pihak yang telah membantu selama penelitian dan penyelesaian tugas akhir ini.

Salam penghormatan kepada kedua orang tua kami tercinta, ayahanda Syamsuddin dan Ibunda Yasni yang telah memelihara dan mendidik kami, semoga segala amal dan jerih payah keduanya mendapat balasan disisinya, juga seluruh keluarga yang turut mendorong dan senantiasa memotivasi kami untuk menyelesaikan studi kami, terutama kepada istri tercinta dr. Hasriati dan

buah hatiku tersayang Fatimah Az zahra, juga kedua mertua ayah dan ibu, dan keluarga besar serta teman-teman yang tidak bisa disebut satu persatu.

Harapan kami semoga tesis ini dapat berguna bagi pengembangan ilmu farmasi dan menunjang disiplin ilmu yang kami ampu.

Penulis



HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan sebagai berikut,

Nama : Frengki
NPM : 0806422063
Program Studi : 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 Struktur dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat Kulit Tanaman *Calophyllum macrophyllum* Scheff”

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 memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 27 Desember 2010

Yang menyatakan,

(Frengki)

ABSTRAK

Nama : Frengki
Program Studi : Magister Ilmu Farmasi
Judul : Isolasi, Elusidasi Struktur dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Tanaman *Calophyllum macrophyllum* Scheff

Sebagian marga *Calophyllum* telah diteliti dan memiliki khasiat sebagai tanaman obat. *C. macrophyllum* Scheff merupakan salah satu jenis *Calophyllum* yang ditemukan di gunung Kerinci provinsi Jambi. Penelitian terhadap kulit batang tanaman ini diawali dengan pengeringan simplisia yang dilanjutkan dengan proses ekstraksi, partisi, isolasi dan rekristalisasi menggunakan sistem dua pelarut. Penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan secara fisika, kimia dan spektroskopi meliputi UV-Vis, IR, GC-MS/LC-MS dan RMI (^1H NMR, ^{13}C NMR). Penentuan bioaktivitas secara *in vitro* meliputi uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), uji antioksidan dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil), uji antidiabetes menggunakan enzim α -glukosidase dan uji antimalaria terhadap parasit plasmodium. Dua senyawa berhasil diisolasi yaitu turunan metil ester asam lemak (metil-oktadek-14 enoik), berupa cairan berwarna kuning dengan titik didih 173-175°C dan senyawa flavan-3-ol (5,7,2',5'-tetrahidroksi flavan-3-ol), berupa kristal berwarna coklat dengan titik leleh besar dari 300°C. Hasil uji toksisitas menunjukkan kedua senyawa toksis terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan LC_{50} masing-masing sebesar 141,2 $\mu\text{g/mL}$ dan 154,9 $\mu\text{g/mL}$. Uji antioksidan menunjukkan hanya senyawa flavan-3-ol yang memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} 5,31 $\mu\text{g/mL}$. Uji antidiabetes juga menunjukkan hanya senyawa flavan-3-ol yang memiliki aktivitas antidiabetes dengan IC_{50} 9,10 $\mu\text{g/mL}$. Tidak ada sama sekali aktivitas antimalaria diperlihatkan oleh kedua senyawa hasil isolasi.

Kata kunci : *Calophyllum macrophyllum* Scheff, *Clusiaceae*, Toksisitas Antioksidan, Antidiabetes, Antimalaria.
xii+110 halaman : 12 gambar; 18 tabel
Daftar Pustaka : 72 (1976-2008)

ABSTRACT

Name : Frengki
Study Program : Magister of Pharmacy
Title : Isolation, Elucidation and Bioactivity Assay of The Chemical Compounds of Ethyl Acetate Fraction of The Stem Bark of *Calophyllum macrophyllum* Scheff

Several of *Calophyllum* genus have been searched and proven as medicinal plants. *Calophyllum macrophyllum* Scheff is plant growing in Sumatera island in Kerinci mounted area. The dried simplicia was extracted using maceration technique, then fractionated using column chromatography and purified by crystallization using two solvents system. Molecule structure were determined using physical and spectroscopic data from LC-MS, GC-MS, UV, IR and ^1H and ^{13}C -NMR. Bioactivity were assayed for toxicity using BSLT method, antioxidant activity using DPPH method, antimalarial activity by Trager and Jensen method, and antidiabetic activity was determined by inhibitory activity of α -glycosidase enzyme. Two compounds have been isolated from ethyl acetate fraction of the stem-bark. The compounds were methyl ester derivate [(Z) methyl-octadec-14-enoic], a yellow liquid with boiling point 173-175°C and flavan-3-ol (5,7,2',5'-tetrahydroxy flavan-3-ol), a brown crystal with melting point > 300°C. Toxicity activity showed for methyl ester derivate [(Z) methyl-octadec-14-enoic] and flavan-3-ol by LC_{50} of 141.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 154.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. On the other hand, antioxidant and antidiabetic activity only showed by flavan-3-ol by IC_{50} of 5.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 9.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. No antimalarial activity showed by those isolated compounds.

Key Words : *Calophyllum macrophyllum* Scheff, *Clusiaceae*, toxicity, anti oxidant, anti diabetic, anti malaria.

xii+110 pages : 12 ilustrations; 18 tables

Bibliography : 72 (1976-2008)

DAFTAR ISI

ABTRAK	i
ABSTRACT	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Marga <i>Calophyllum</i>	5
2.2 <i>Calophyllum macrophyllum</i> Scheff.....	6
2.2.1 Taksonomi	6
2.2.2 Tinjauan Tanaman.....	7
2.3 Kandungan Kimia Marga <i>Calophyllum</i>	8
2.3.1 Senyawa Asam Organik	8
2.3.2 Senyawa Flavonoid dan Biflavonoid Amentoflavon dari Daun <i>C. brasiliense</i>	11
2.3.3 Senyawa Kumarin.....	12
2.3.4 Senyawa Santon.....	16
2.3.5 Senyawa Isoprenil keton	23
2.3.6 Senyawa Triterpena.....	24
2.3.7 Senyawa Lakton.....	25
2.4 Bioaktivitas Senyawa Marga <i>Calophyllum</i>	25
2.4.1 Aktivitas anti-HIV Senyawa Marga <i>Calophyllum</i>	25
2.4.2 Aktivitas Senyawa Kumarin.....	27
2.4.3 Aktivitas Senyawa Santon.....	28
2.4.4 Aktivitas Antibakteri dan Sitotoksik Senyawa-senyawa dari <i>C. inophyllum</i>	32
2.4.5 Aktivitas Antitumor Senyawa dari Daun <i>C. brasiliense</i>	33
2.5 Ekstraksi dan Partisi	34
2.5.1 Ekstraksi	34
2.5.2 Partisi.....	35
2.5.3 Pemisahan dan Pemurnian.....	35
2.5.4 Analisis Spektroskopi.....	36
2.6 Bioaktivitas	38
2.6.1 Uji Toksisitas	38
2.6.2 Antioksidan.....	39
2.6.3 Antidiabetes	42
2.6.4 Malaria.....	43

BAB 3. METODE PENELITIAN.....	46
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	46
3.2 Bahan dan Alat	46
3.2.1 Tanaman	46
3.2.2 Bahan Kimia	46
3.2.2 Hewan Uji.....	46
3.2.2 Peralatan	46
3.4 Cara Kerja	47
3.3.1 Pengumpulan Bahan	47
3.3.2 Determinasi Tanaman	47
3.3.3 Penyediaan Simplisia	47
3.3.4 Penapisan Fitokimia.....	47
3.3.5 Ekstraksi, Partisi, dan Isolasi.....	49
3.3.6 Identifikasi Senyawa Murni	50
3.3.7 Uji Toksisitas.....	51
3.3.8 Uji Antioksidan.....	52
3.3.9 Uji Antidiabetes	54
3.3.10 Uji Antimalaria	56
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	59
4.1 Hasil Penelitian.....	59
4.1.1 Skrining Fitokimia, Hasil Ekstraksi, Partisi, dan Isolasi....	59
4.1.2 Karakterisasi Hasil Isolasi	59
4.1.3 Bioaktivitas	60
4.2 Pembahasan.....	65
4.2.1 Pembahasan umum	65
4.2.2 Pembahasan Senyawa Hasil Isolasi	69
4.3 Pembahasan Bioaktivitas	77
4.3.1 Uji Toksisitas (BSLT).....	77
4.3.2 Uji Antioksidan.....	78
4.3.3 Uji Antidiabetes	81
4.3.4 Uji Antimalaria	82
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	85
DAFTAR REFERENSI	86
LAMPIRAN	92

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Aktivitas anti-HIV senyawa triterpen, kumarin, biflavonoida dan asam organik <i>Calophyllum brasiliense</i>	27
Tabel 2.2	Aktivitas antibakteri senyawa santon dari <i>Calophyllum</i>	29
Tabel 2.3	Aktivitas antimalaria derivat santon 1,3,5-trioksigenasisanton.....	30
Tabel 2.4	Aktivitas antimalaria derivat santon 1,3,5,6 trioksigenasisanton ...	31
Tabel 2.5	Aktivitas antimalaria derivat santon 1,3,7-trioksigenasisanton	31
Tabel 2.6	Aktivitas antimalaria senyawa santon dari <i>C. caledonicum</i>	32
Tabel 2.7	Aktivitas antibakteri dan sitotoksik senyawa <i>C.inophyllum</i>	33
Tabel 2.8	Daya hambat triterpen dan asam terhadap 3 sel tumor.....	34
Tabel 4.1	Skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang <i>C.macrophyllum</i> Schef.....	59
Tabel 4.2	Hasil uji toksisitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach	61
Tabel 4.3	Uji antioksidan hasil partisi	62
Tabel 4.4	Uji antioksidan hasil fraksinasi dan isolasi.....	63
Tabel 4.5	Hasil uji antidiabetes fraksi etil asetat dan isolat	64
Tabel 4.6	Data penghambatan parasitemia fraksi etil asetat dan isolat	65
Tabel 4.7	Analisis 2D senyawa metil ester asam lemak menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT	71
Tabel 4.5	Serapan maksimum spektrum UV menggunakan pereaksi geser ..	74
Tabel 4.9	Analisis 2D senyawa flavan-3-ol menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT	75
Tabel 4.10	Menunjukkan kemiripan antara isolat dengan senyawa pembanding 5,7,2',5' tetrahidroksi flavan-3-ol.....	77

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Foto tanaman <i>Calophyllum macrophyllum</i> Scheff.	8
Gambar 2.2	Senyawa asam organik dari <i>C. Brasiliense</i>	8
Gambar 2.3	Asam organik dari daun <i>C. thwaitesii</i> , <i>C. lankaensis</i> , <i>C.calaba</i> dan <i>C. moonii</i>	9
Gambar 2.4	Asam organik dari kulit batang <i>C. cordato-oblongum</i>	10
Gambar 2.5	Asam organik dari kulit batang <i>C. apetalum</i> , <i>C. blancot</i> , <i>C. chapelleri</i> , <i>C. brasiliense</i> dan <i>C. cuneifolium</i>	10
Gambar 2.6	Asam organik dari inti batang <i>C. calaba</i> , <i>C. soulatrii</i> Burm. f. getah <i>C. brasiliense</i> dan <i>C. cordato-oblongum</i>	11
Gambar 2.7	Asam organik dari kulit batang <i>C. cordato oblongum</i>	12
Gambar 2.8	Senyawa biflavonoid dari <i>C. calaba</i>	12
Gambar 2.9	Senyawa kumarin dari kulit batang <i>C. teysmannii</i> Miq. var. inophylloid	13
Gambar 2.10	Senyawa kumarin dari <i>C. lanigerum</i> var. <i>austrocoriaceum</i> <i>C. soulatri</i> Burm.f., dan <i>C. teysmannii</i>	14
Gambar 2.11	Senyawa kumarin dari <i>C. cordato-oblongum</i>	15
Gambar 2.12	Senyawa kumarin dari kulit batang <i>C. brasiliense</i>	15
Gambar 2.13	Senyawa benzoilkumarin dari <i>C. teysmannii</i> Miq var inophylloide.....	16
Gambar 2.14	Senyawa santon dari <i>C. tomentosum</i> Wight., <i>C. zeylonikum</i> , <i>C. apetalum</i>	17
Gambar 2.15	Senyawa turunan santon dari <i>C. zeylanicum</i> , <i>C. thwaitessi</i>	18
Gambar 2.16	Senyawa turunan santon <i>C. teysmannii</i> Miq. var inophylloide.	19
Gambar 2.17	Senyawa turunan santon <i>C. austroindicum</i>	20
Gambar 2.18	Senyawa turunan santon <i>C. inophyllum</i> , <i>C. zeylonicum</i>	21
Gambar 2.19	Senyawa santon dari <i>C. calaba</i> dan <i>C. brateanum</i> , <i>C. mooni</i>	22
Gambar 2.20	Senyawa turunan santon dari kulit akar dan biji <i>C. inophyllum</i>	23
Gambar 2.21	Senyawa turunan poliisoprenil keton dari kulit batang <i>C. enervosum</i>	24
Gambar 2.22	Senyawa triterpena dari <i>C. brasiliense</i> , <i>C. soulatri</i> Burm f., <i>C. incrasaptum</i>	24
Gambar 2.23	Senyawa lakton <i>C. lankaensis</i> , <i>C. lankaensis</i> dan <i>C. thwaitesii</i>	25
Gambar 2.24	Senyawa 4-fenilkumarin	28
Gambar 2.25	Reaksi umum antioksidan.	41
Gambar 2.26	Mekanisme reaksi <i>radical scavenger</i>	41
Gambar 3.1	Skema penelitian yang meliputi proses ekstraksi, isolasi, elusidasi dan uji bioaktivitas	58
Gambar 4.1	Fragmen-fragmen penyusun metil ester asam lemak	70
Gambar 4.2	Struktur molekul metil ester asam lemak.....	71

Gambar 4.3 Struktur molekul metil ester asam lemak hasil analisis 2D menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT	72
Gambar 4.4 Struktur inti golongan flavonoid	73
Gambar 4.5 Struktur molekul senyawa flavan-3-ol.....	75
Gambar 4.6 Struktur molekul flavan-3-ol hasil analisis 2D.....	75
Gambar 4.7 Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan	79
Gambar 4.8 Struktur flavonoid aktif antimalaria.....	83



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi <i>Calophyllum macrophyllum</i> Scheff.....	92
Lampiran 2. Spektrum Infra Merah senyawa metil ester asam lemak	93
Lampiran 3. Spektrum GC-MS metil ester senyawa asam lemak.	94
Lampiran 4. Spektrum UV-Vis senyawa metil ester asam lemak	95
Lampiran 5. Spektrum ¹ H-NMR senyawa metil ester asam lemak.	96
Lampiran 6. Spektrum ¹³ C NMR senyawa metil ester asam lemak.....	97
Lampiran 7. Spektrum DEPT senyawa metil ester asam lemak.....	98
Lampiran 8. Spektrum ¹³ C-NMR dan DEPT metil ester asam lemak	99
Lampiran 9. Spektrum HMQC senyawa metil ester asam lemak.....	100
Lampiran 10. Spektrum HMBC senyawa metil ester asam lemak.....	101
Lampiran 11. Spektrum Infra Merah senyawa flavan-3-ol.	102
Lampiran 12. Spektrum LC-MS senyawa flavan-3-ol.....	103
Lampiran 13. Spektrum UV-Vis senyawa flavan-3-ol	105
Lampiran 14. Spektrum ¹ H-NMR senyawa flavan-3-ol	106
Lampiran 15. Spektrum ¹³ C-NMR senyawa flavan-3-ol.	107
Lampiran 16. DEPT senyawa flavan-3-ol.....	108
Lampiran 17. Spektrum ¹³ C-NMR dan DEPT senyawa flavan-3-ol.	119
Lampiran 18. Spektrum HMQC senyawa flavan-3-ol.....	110
Lampiran 19. Spektrum HMBC senyawa flavan-3-ol.....	111

BAB I PENDAHULUAN

1. 1 LATAR BELAKANG

Tumbuhan merupakan salah satu bahan obat tradisional yang telah dikenal sejak dahulu kala. Dalam dasawarsa terakhir ini penggunaan obat tradisional semakin meningkat, salah satu penyebabnya adalah karena meningkatnya kepercayaan terhadap manfaat dan kegunaan tumbuhan obat dalam pemeliharaan kesehatan (Christine. 1985).

Pemilihan tumbuhan dalam rangka pencarian senyawa bioaktif baru dari bahan alam dapat dilakukan melalui pendekatan etnofarmakologi dan kemotaksonomi. Pendekatan etnofarmakologi dimaksudkan penelusuran berdasarkan pemakaian bahan alam oleh suatu etnik tertentu untuk tujuan pengobatan, sedangkan pendekatan kemotaksonomi dilakukan melalui penelusuran berdasarkan hubungan kekerabatan antar tumbuhan dengan asumsi tumbuhan yang sekerabat memiliki kandungan kimia yang sama atau paling tidak memiliki rangka atau inti senyawa aktif yang sama (Anonim. 1997; Simanjuntak. 2003).

Salah satu marga tumbuhan tingkat tinggi Indonesia yang mempunyai potensi sebagai sumber senyawa kimia bioaktif adalah *Calophyllum* dari suku Guttiferae/ Clusiaceae. Beberapa wilayah seperti Sumatera, Jawa Barat, Jawa Tengah, Kalimantan dan Papua merupakan tempat penyebarannya. Selain di Indonesia tumbuhan genus *Calophyllum* ini juga ditemukan di Vietnam, Kamboja, Thailand, Singapura, Australia bagian selatan, pulau Andaman, dan Srilangka dengan 200 jenis telah teridentifikasi (Soerianegara. 1994; Backer. 1963; Heyne. 1987).

Beberapa jenis *Calophyllum* diantaranya adalah *C. teysmannii*, *C. inophyllum*, *C. apetalum*, *C. moonii*, *C. lankaensis*, *C. caledonicum*, *C. cordata-oblongum*, *C. verticillatum*, *C. calaba*, *C. brasiliense*, *C. blancoi*, *C. australianum* FvM, *C. enervosu*, *C. insularum* dan *C. gracilipes*. *C. insularum* merupakan salah satu jenis *Calophyllum* asli Indonesia yang hampir punah. Tanaman ini ditemukan oleh Steven, P.F pada tahun 1998 di provinsi Irian Jaya.

Dari penelitian yang telah dilakukan terhadap jenis *Calophyllum*, diperoleh beberapa senyawa kimia yang memiliki aktivitas farmakologi di antaranya adalah kumarin, santon, flavonoid, biflavonoid, triterpenoid, asam-asam organik dan senyawa benzofenon (Cao S-G, *et al.* 1998; Yimdjo, *et al.* 2004; Taher, *et al.* 2005; Kirk, *et al.* 1994). Telah dilaporkan beberapa senyawa santon mempunyai aktivitas sebagai antiplatelet, antibakteri, antikembang dan anti-HIV, yaitu (+) kalanolida A dari *C. lanigerum* (Dharmaratne, *et al.* 1999, Linuma, *et al.* 1996). Senyawa santon juga aktif terhadap parasit malaria *Plasmodium falcifarum* (Hay, A.E, *et al.* 2004).

Senyawa kumarin dilaporkan memiliki aktivitas anti tumor yaitu senyawa brasimarin A, B, dan C, 4-fenilkumarin dari kulit batang *C. brasiliense* (Ito, T. 2003). Senyawa poliisoprenil keton dari kulit batang *C. enervosum* dilaporkan oleh Taher, *et al.* (2005) yaitu enervosanon, dimana senyawa ini aktif sebagai antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* (ATCC 6633), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* dan *S. aureus* (ATCC 6538).

Senyawa flavonoid juga ditemukan oleh Leslie (1994) dari *C. calaba* yaitu berupa senyawa biflavonoid amentoflavon dan merelloflavon. Epikatekin dari *C. inophyllum* juga telah diisolasi oleh Linuma, *et al.* (1994). Demikian juga untuk senyawa golongan triterpena dan asam organik seperti dilaporkan Reyes-Chilpa, *et al.* (2004) yang telah mengisolasi triterpena dari daun *C. brasiliense*, yaitu friedelin yang aktif sebagai anti-HIV dan senyawa asam yaitu asam protokatekuat dan asam shikimat dari daun *C. brasiliense*.

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

Dari penelusuran kepustakaan diketahui bahwa belum ada laporan mengenai komponen kimia dari jenis *C. macrophyllum* Scheff. Dari uraian tersebut diatas, maka dilakukan penelitian terhadap kulit batang tanaman ini yang secara kemotaksonomi berpeluang besar menemukan senyawa kimia yang aktif sebagaimana jenis *Calophyllum* lainnya.

Penelitian ini diawali dengan melakukan skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol, kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol berturut-turut. Kemudian dilanjutkan dengan uji bioaktivitas yang meliputi uji toksisitas dan uji antioksidan. Uji toksisitas dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), sedangkan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil).

Pemisahan senyawa dilakukan dengan cara kromatografi kolom yang dimonitor dengan menggunakan plat KLT pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 dan 366 serta penyemprotan dengan H₂SO₄ 5% dalam metanol yang dipanaskan, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian senyawa hasil isolasi dengan cara rekristalisasi. Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan pemeriksaan fisika, kimia dan fisikokimia (Harbone, J.B. 1987; Ghisalberti, E.L. 1993). Dari senyawa murni yang diperoleh dilakukan kembali uji bioaktivitasnya.

1.2. RUMUSAN MASALAH

Marga *Calophyllum* termasuk salah satu bagian terbesar dari komunitas hutan tropika, ditemukan hampir diseluruh pulau-pulau besar di Indonesia. Penelitian tentang kandungan kimia dan bioaktivitas dari marga *Calophyllum* telah banyak dilakukan di mancanegara seperti di Amerika, Malaysia, India, Srilangka dan Cina. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa marga *Calophyllum* ini mengandung berbagai senyawa aktif secara farmakologi, juga ditemukan senyawa-senyawa baru yang potensial sebagai bahan baku obat. Apabila tumbuhan *C. macrophyllum* Scheff mengandung senyawa aktif yang potensial, maka penyelamatan tumbuhan tersebut perlu dilakukan.

1.3. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi kandungan kimia yang aktif secara farmakologi dari kulit batang *Calophyllum macrophyllum* Scheff. Senyawa yang diperoleh selanjutnya akan dikarakterisasi secara kimia, fisika, dan spektroskopi, kemudian diuji bioaktivitasnya.

1.4. MANFAAT HASIL PENELITIAN

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah dapat melengkapi data penelitian bahan alam, mengingat tanaman ini belum ada laporannya. Temuan senyawa yang didapatkan nantinya dapat memperkaya pengetahuan dalam bidang kimia bahan alam. Uji aktivitas biologi dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Bagi peneliti sendiri penelitian ini dapat meningkatkan keterampilan dan wawasan dalam hal pencarian senyawa kimia yang mempunyai bioaktivitas dalam bahan alam terutama tumbuhan.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Bahan Alam PUSLIT Kimia LIPI, Serpong.

3.2 BAHAN DAN ALAT

3.2.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang diteliti adalah kulit batang *Calophyllum macrophyllum* Scheff yang diperoleh dari gunung Kerinci pada ketinggian 600 meter di atas permukaan laut dan sudah dideterminasi (lampiran 1).

3.2.2 Bahan Kimia

Silika gel 60 GF 254 (70-230 dan 230-400 mesh) (Merck, Jerman), lempeng KLT (E. Merck cat.05554, Jerman), H₂SO₄ 10 % sebagai penampak noda pada KLT (teknis), aquades (teknis), RPMI 1640 (Sigma-Aldirch), hipoksantin (Sigma), larutan Giemsa, minyak imersi (Merck, Jerman), 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), enzim α -glukosidase (*Saccharoyces sp.*, Oriental Yeast Co., Ltd., Jepang), bovine serum albumin (Wako pure Chemical Industries, Ltd, Jepang.), koji, paranitrofenil α -D-glukopiranososa (PNP) (Wako pure Chemical Industries, Ltd., Jepang), Na₂CO₃ (Merck cat. 1.09940, Jerman), DPPH. Pelarut teknis yang telah didestilasi : *n*-heksana, aseton, etil asetat, *n*-butanol, diklorometan, kloroform, metanol, dimetilsulfoksida dan etanol (teknis).

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach dan kultur parasit *Plasmodium falcifarum*.

3.2.4 Alat-alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah peralatan maserasi, peralatan partisi, penguap putar (*rotary evaporator* Buchi R-215, Jerman),

peralatan kromatografi kolom berbagai ukuran (Thermo Science, USA), peralatan kolom kromatografi vakum (Buchi), spektrofotometer UV-VIS (Hitaci U 2000, Jepang), spektrofotometer infra merah (Prestige-21 Shimadzu, Jepang), Resonansi Magnet Inti (Jeol JNM-ECA 500 Mhz, USA), LC-MS dan GC-MS Mariner Biorad (70 ev) (Perkin Elmer Clarus 5000, USA), 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, pipet mikro (Eppendorf), lemari pendingin, wadah inkubator, tube berbagai ukuran (pyrex) dan rak tabung reaksi.

3.3 CARA KERJA

3.3.1 Pengumpulan bahan

Bahan tanaman untuk penelitian diperoleh dari lereng gunung Kerinci pada ketinggian 600 m diatas permukaan laut pada bulan Mei 2009.

3.3.2 Determinasi tanaman

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

3.3.3 Penyediaan simplisia

Kulit batang yang dikoleksi dibersihkan dari kotoran (lumut) yang melekat, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan di bawah sinar matahari \pm 1 minggu kemudian disimpan dalam oven pada suhu 50°C. Bahan yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggiling. Selanjutnya serbuk yang diperoleh dikumpulkan dan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

3.3.4 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia terhadap ekstrak etanol 70% dilakukan terhadap senyawa kimia golongan alkaloid dengan metode Simes, *et al.* (1995) yang dimodifikasi, caranya adalah ekstrak kental etanol sebanyak \pm 300 mg ditambahkan 5 mL air suling, kemudian ditambahkan 10 mL CHCl₃-amoniak 0.05N, dikocok perlahan, biarkan sampai memisah. Lapisan CHCl₃ diambil, kemudian ditambahkan 0,5 mL H₂SO₄ 2N, kocok perlahan, biarkan sampai terjadi pemisahan. Lapisan asam dipipet dan dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan satu tetes pereaksi Meyer atau Dragendorff, positif

adanya alkaloid bila terbentuk endapan putih dengan pereaksi Meyer atau warna jingga dengan pereaksi Dragendorff.

Selanjutnya penentuan golongan flavonoid, saponin, tanin dan sterol/terpenoid, kuinon, dan kumarin adalah sebagai berikut (Ciulei. 1984)

a. Uji Flavonoid

Sejumlah ± 1 mL larutan ekstrak ditambah 1-2 mL metanol 50 %, dipanaskan pada suhu 50° C, dan setelah dingin ditambahkan logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna merah atau jingga pada filtrat.

b. Uji Saponin

Sebanyak 10 mL larutan uji flavonoid dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik, Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1-10 cm yang stabil kurang lebih 15 menit dan tidak hilang pada penambahan setetes asam klorida 2 N.

c. Uji Tanin

Sejumlah 1 mL larutan ekstrak ditambah 2 mL aquadest dan 2-3 tetes FeCl_3 . Adanya tannin diamati dengan terjadinya warna biru tua atau hitam.

d. Uji Kuinon

Sejumlah lebih kurang 5 mL larutan ekstrak ditambah natrium hidroksida 1 N, Adanya kuinon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah.

e. Uji Steroid / Terpenoid

Sejumlah ± 1 mL larutan ekstrak ditambah 0,5 mL anhidrida asetat dan 0,5 mL CHCl_3 , selanjutnya ditambah H_2SO_4 pekat setetes demi setetes sebanyak 0,2 mL ke dasar tabung dan diamati terjadinya warna ungu.

f. Uji Kumarin

Sejumlah ± 2 gram ekstrak ditambahkan 10 mL kloroform kemudian dipanaskan selama 10 menit, selanjutnya didinginkan dan disaring. Filtrat diuapkan kemudian ditambahkan 10 mL air panas, selanjutnya didinginkan. Tambahkan 0,5 mL ammonia 10%. Adanya kumarin ditunjukkan dengan adanya fluoresensi hijau/biru pada sinar UV (366 nm).

3.3.5 Ekstraksi, Fraksinasi, dan Isolasi.

Kulit kayu *C. macrophyllum* Scheff yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender, kemudian ditimbang dan diperoleh serbuk sebanyak 3,2 kg. Serbuk tersebut diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan etanol 70% selama 3 x 24 jam dengan tiga kali pengulangan sampai diperoleh filtrat yang bening (penyarian dianggap telah maksimum), kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak etanol pekat. Ekstrak etanol pekat selanjutnya dipartisi dengan *n*-heksana : air (1:1), diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Kemudian fraksi air dipartisi kembali dengan etil asetat sama banyak, diperoleh fraksi etil asetat dan fraksi air. Fraksi air yang diperoleh dipartisi lagi dengan *n*-butanol, diperoleh fraksi *n*-butanol dan fraksi air. Pelarut masing-masing fraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak kering, kemudian ditimbang.

Fraksinasi dilakukan dengan teknik kromatografi kolom cepat menggunakan fase diam silika G 60 (230-400 mesh) dan fase gerak *n*-heksana yang ditingkatkan kepolarannya dengan penambahan etil asetat dan metanol secara gradien. Pola noda diidentifikasi dengan teknik kromatografi lapis tipis pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 dan 366. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabung dan diuji bioaktivitasnya.

Selanjutnya dilakukan fraksinasi lebih lanjut terhadap fraksi terpilih menggunakan kolom kromatografi lambat dengan fase diam silika G 60 (170-230 mesh) dengan eluen yang kepolarannya ditingkatkan secara gradien atau isokratik dengan eluen yang telah disesuaikan sebelumnya. Pola noda diidentifikasi dengan teknik kromatografi lapis tipis pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 dan 366 dan penampak noda seperti larutan FeCl_3 , H_2SO_4 5% dalam metanol, atau pereaksi lainnya. Fraksi yang menunjukkan pola noda yang sama digabung.

Pemisahan dapat dilanjutkan dengan metode preparatif menggunakan lempeng KLT preparatif, diperoleh noda-noda yang terpisah satu sama lain, dikerok dan dilarutkan dengan pelarut yang cocok serta dipisahkan dari silikanya dengan cara disaring, kemudian pelarut diuapkan sehingga didapatkan senyawa murni. Pemurnian dapat juga dilakukan dengan metode rekristalisasi menggunakan campuran pelarut berdasarkan perbedaan titik didih. Diharapkan

dengan menguapnya pelarut akan menyebabkan senyawa utama mencapai titik jenuh lebih dahulu sehingga membentuk kristal, sedangkan pengotor masih dalam keadaan terlarut, akibatnya senyawa utama dapat segera dipisahkan.

3.3.6 Identifikasi Senyawa Murni

Terhadap isolat dilakukan identifikasi dan penentuan struktur molekul dengan cara fisika, KLT, spektrofotometri UV-Visible, IR, MS, spektroskopi resonansi magnetik inti proton (H^1 -NMR) dan karbon (C^{13} -NMR) serta teknik NMR-2D yang meliputi HMQC dan HMBC.

a. Pemeriksaan fisika

Terhadap isolat dikarakterisasi titik didih/titik lelehnya menggunakan *Fisher-Jhon Melting Point apparatus* (Shriner, *et al.* 1980). Caranya yaitu dengan meletakkan sebutir kristal atau setetes minyak pada wadah yang ada pada alat tersebut. Kemudian suhu dinaikkan secara perlahan-lahan. Titik leleh ditandai dengan mulai meleburnya kristal sampai seluruhnya berubah wujud menjadi cair. Senyawa dikatakan murni ditandai dengan titik leleh yang tajam $\pm 2^\circ$. Terhadap sampel cair titik didih ditentukan oleh menguapnya sampel secara sempurna pada temperatur tertentu.

b. Pemeriksaan kromatografi

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

c. Pemeriksaan spektrum ultraviolet

Pemeriksaan dilakukan dengan alat spektrometer UV-Vis 1601 (Shimadzu), yaitu dengan melarutkan 2 mg sampel dalam metanol sampai 2 mL sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 $\mu g/mL$. Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 10, 5, 2, atau 1 $\mu g/mL$. Kemudian masing-masing

konsentrasi dimasukkan kedalam kuvet, pelarut dimasukkan pada kuvet lain dan diukur absorbansinya secara bersamaan (pilih konsentrasi yang memberikan nilai adsorban 0,2-0,8).

d. Pemeriksaan spektrum Infra merah (IR)

Menggunakan alat spektrofotometer infra merah (Prestige-21 Shimadzu, Jepang), yaitu dengan menggerus sejumlah 1 mg sampel dengan 100 mg KBr secara homogen, kemudian diukur serapan infra merahnya.

e. Pemeriksaan spektrum massa dengan LC-MS

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

3.3.7 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. BSLT dilakukan terhadap ekstrak fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol kulit batang tanaman *C. macrophyllum* Scheff, serta isolat yang berhasil diperoleh.

a. Penetasan *Artemia salina* Leach.

Pembiakan udang dilakukan dalam sebuah kotak yang telah dibagi menjadi dua bagian dengan sekat berlubang dimasukkan air laut secukupnya. Salah satu sisi kotak ditutup dengan aluminium foil, kemudian kotak diletakkan di bawah lampu UV selama 48 jam. Larva yang menembus daerah terang setelah berumur 48 jam siap digunakan untuk uji toksisitas

b. Penyiapan sampel uji.

Larutan induk dibuat dengan melarutkan 4 mg sampel dengan 10 μ L DMSO dan ditambahkan dengan air laut dengan kadar garam 3,8 % hingga 2 mL. Kadar larutan induk adalah 2000 μ g/mL. Fraksi yang akan diuji disiapkan pada konsentrasi 1000, 500, 100 dan 10 μ g/mL. Sebagai blanko tanpa larutan uji dibuat dengan cara 10 μ L DMSO ditambahkan air laut hingga 2 mL.

c. Uji toksisitas Metode Meyer.

Sebanyak 10 larva udang dalam 100 μL air laut dimasukkan ke dalam vial uji, kemudian ditambahkan 100 μL larutan sampel. Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Sebagai kontrol dilakukan dengan 100 μL larutan blanko kemudian ditambahkan air laut hingga 200 μL . Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah larva udang yang masih hidup dan yang sudah mati, kemudian dihitung mortalitasnya seperti persamaan berikut :

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{Akumulasi mati}}{\text{Akumulasi mati} + \text{Akumulasi hidup}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Nilai LC_{50} ditentukan melalui persamaan regresi (sumbu x adalah $[\log k]$, sedangkan sumbu y adalah % mortalitas) dengan bantuan program komputer sederhana *Mic. Excel*. Suatu fraksi atau ekstrak dikatakan aktif bila mempunyai nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$, untuk senyawa murni dikatakan aktif bila mempunyai nilai $\text{LC}_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ (Alam. 2002)

3.3.8 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil). Ekstrak fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol serta isolat kulit batang *C. macrophyllum* Scheff dilarutkan dalam metanol dan dibuat dalam konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$ sebagai larutan induk. Kemudian dibuat dalam berbagai konsentrasi (10; 20; 30; dan 50 $\mu\text{g/mL}$) dan (5; 10; 50; 100 dan 200 $\mu\text{g/mL}$) untuk masing-masing ekstrak dan isolat yang diperoleh. Kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sampai 1600 μL metanol, kemudian ditambahkan 400 μL larutan DPPH 1 mM dalam metanol sehingga volume total menjadi 2 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit, selanjutnya serapan diukur pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai pembanding kuersetin (konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 $\mu\text{g/mL}$). Nilai LC_{50} ditentukan melalui persamaan regresi (sumbu x adalah konsentrasi, sedangkan sumbu y adalah % inhibisi) dengan bantuan program komputer sederhana *Mic. Excel*

a. Pembuatan larutan DPPH (BM 394,32)

Sejumlah 3,94 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL metanol, dalam botol gelap. Untuk setiap pengujian dibuat baru.

b. Pembuatan larutan blanko

Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan cara memipet 1600 μ L metanol, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 400 μ L larutan DPPH, lalu dikocok sampai homogen, inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

c. Pembuatan larutan kuersetin sebagai pembanding

- Pembuatan larutan induk kuersetin konsentrasi 1000 μ g/mL

Sejumlah 1,0 mg kuersetin ditimbang dan dilarutkan dalam 1 mL metanol, kemudian dikocok hingga homogen

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

Dipipet 10, 20, 30, 40 dan 50 μ L larutan induk kuersetin kedalam 5 tabung reaksi. Pada masing-masing tabung ditambah dengan metanol sampai volume 1600 μ L, kemudian ditambahkan 400 μ L DPPH sehingga volume total menjadi 2 mL, kocok hingga homogen. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

- Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm

d. Persiapan larutan uji

Ekstrak etil asetat

- Pembuatan larutan induk bahan uji konsentrasi 1000 μ g/mL

Sejumlah 2,0 mg ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam 2 mL metanol, kemudian dikocok dan dilarutkan hingga homogen

- Pembuatan larutan seri bahan uji konsentrasi 10, 20, 30, dan 50 μ g/mL

Dipipet 20, 40, 60 dan 100 μ L larutan induk bahan uji kedalam 4 tabung reaksi. Pada masing-masing tabung ditambah dengan metanol sampai volume 1600 μ L, kemudian ditambahkan 400 μ L DPPH sehingga volume total menjadi 2 mL, kocok hingga homogen. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Senyawa murni

- Pembuatan larutan induk bahan uji konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$

Sejumlah 2,0 mg isolat ditimbang dan dilarutkan dalam 2 mL metanol, kemudian dikocok dan dilarutkan hingga homogen

- Pembuatan larutan seri bahan uji konsentrasi 5, 10, 50, 100, dan 200 $\mu\text{g/mL}$

Dipipet 10, 20, 100, 200 dan 400 μL larutan induk bahan uji kedalam 4 tabung reaksi. Pada masing-masing tabung ditambah dengan metanol sampai volume 1600 μL , kemudian ditambahkan 400 μL DPPH sehingga volume total menjadi 2 mL, kocok hingga homogen. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

Pengukuran absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm.

e. Penghitungan

Nilai LC_{50} ditentukan melalui persamaan regresi (sumbu x adalah konsentrasi, sedangkan sumbu y adalah % inhibisi) dengan bantuan program komputer sederhana *Mic. Excel*.

3.3.9 Uji Efek Antidiabetes

Uji antidiabetes dilakukan terhadap ekstrak fraksi etil asetat dan senyawa hasil isolasi. Langkah-langkah uji diabetes terhadap enzim α -glukosidase adalah sebagai berikut:

a. Penyiapan enzim α -glukosidase

Sebanyak 1 mg α -glukosidase dilarutkan dalam 100 mL dapar fosfat (pH 7) yang mengandung 200 mg *bovine serum albumin*. Kemudian 1 mL larutan enzim diencerkan lagi dengan 25 mL dapar fosfat.

b. Penyiapan sampel

Larutan sampel dalam 5 μL DMSO ditambah dengan 495 μL dapar fosfat 0,1M dan 250 μL 0,02M p-nitrofenil α -D-glukopiranososa (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 μL enzim α -glukosidase yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 μL 0,2M

Na₂CO₃. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

c. Penyiapan sampel tanpa enzim

Larutan sampel 5 µL dalam DMSO ditambah dengan 495 µL 0,1M dapar fosfat dan 250 µL 0,02M p-nitrofenil α-D-glukopiranososa (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 µL dapar fosfat pH 7 0,1M, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 µL 0,2M Na₂CO₃. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

d. Penyiapan blangko

Sebanyak 5 µL DMSO ditambah dengan 495 µL 0,1M dapar fosfat dan 250 µL 0,02M p-nitrofenil α-D-glukopiranososa (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 µL enzim α-glukosidase yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 µL 0,02M Na₂CO₃. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

e. Penyiapan standar

Sebanyak 5 µL larutan ekstrak etil asetat koji dalam DMSO ditambah dengan 495 µL 0,1M dapar fosfat dan 250 µL 0,02M p-nitrofenil α-D-glukopiranososa (PNP), sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Kedalam sampel ditambahkan 250 µL enzim α-glukosidase yang telah diencerkan, sampel diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah masa inkubasi selesai ditambahkan 1000 µL 0,02M Na₂CO₃. Sampel diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm.

Nilai LC₅₀ ditentukan melalui persamaan regresi (sumbu x adalah konsentrasi, sedangkan sumbu y adalah % inhibisi) dengan bantuan program komputer sederhana *Mic. Excel*

3.3.10 Uji Antimalaria

Uji Aktivitas antimalaria dilakukan terhadap fraksi etil asetat dan senyawa hasil isolasi untuk melihat aktivitas inhibisinya terhadap pertumbuhan parasitemia *P. falciparum* secara *in vitro*.

a. Persiapan kultur parasit

Kultur parasit *P. falciparum* klon 3D7 dipelihara secara *in vitro* dengan metode standar (Trager and Jensen, 1976). Kultur tersebut diinkubasi pada suhu 37°C dengan aliran gas CO₂, dibiakkan dalam medium RPMI-1640 yang ditambahkan dengan 5 % hematokrit dan 10 % AB⁺ serum darah manusia.

b. 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 rpm 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 µg mL⁻¹, hipoksantin 50 µg 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.

c. Uji aktivitas anti malaria senyawa murni secara *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 µL RBC⁺ (red blood concentrate) yang mengandung 1-2% parasit *P. falciparum* serta senyawa murni yang akan diuji sedemikian rupa sehingga volume akhir mencapai 1 mL. Plat kultur disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C dengan aliran gas CO₂ dan diamati setiap hari selama 3 hari. Untuk percobaan standar, 150 µL klorokuin dalam variasi konsentrasi 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ dan 10⁻⁹ M, secara berurutan dimasukkan kedalam 5 sumur. Selanjutnya 150 µL

larutan senyawa uji pertama dengan variasi konsentrasi 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} M dimasukkan kedalam 5 sumur berikutnya.

Pertumbuhan parasit dimonitor tiap hari (H_0 sampai dengan H_2), 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.

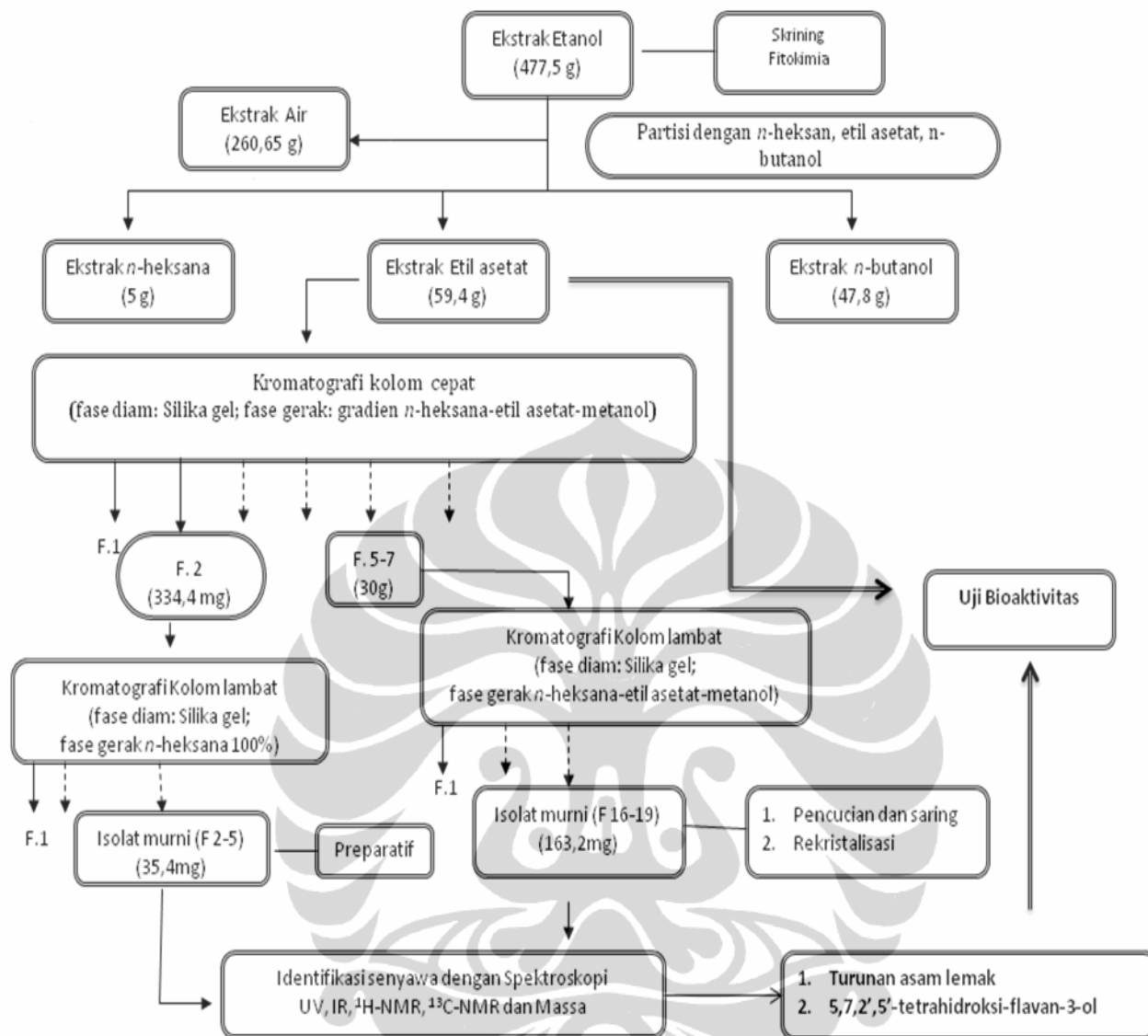
d. Perhitungan aktivitas antimalaria

Perhitungan menggunakan metoda Bourdy *et al.* 2004, sebagai berikut :

$$\text{Persen parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi parasit}}{\text{Jumlah total eritrosit}} \times 100\% \quad (3.2)$$

$$\text{Persen inhibisi} = \frac{\text{Parasitemia kontrol} - \text{Parasitemia perlakuan}}{\text{Parasitemia kontrol}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Data respon konsentasi sampel uji terhadap pertumbuhan parasit dianalisis dengan regresi linier menggunakan program komputer *Microsoft excel* untuk menentukan konsentrasi penghambatan 50 % (IC_{50}) (Kalauni, *et al.* 2006).



Gambar 3.1 Skema penelitian yang meliputi proses ekstraksi, isolasi, elusidasi dan uji bioaktivitas

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Skrining fitokimia, hasil ekstraksi, partisi, dan isolasi

- a. Dari uji pendahuluan kandungan kimia terhadap ekstrak etanol kulit batang tanaman *C. macrophyllum* Sheff menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid dan flavonoid, selengkapnya tersaji pada **Tabel 4.1**

Tabel 4.1 Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang *C. macrophyllum* Scheff

No	Golongan	Pengamatan Sampel
1	Alkaloid	+
2	Flavonoid	+
3	Steroid/Terpenoid	-
4	Tanin	-
5	Kuinon	-
6	Kumarin	-
7	Saponin	-

- b. Dari 3,2 kg serbuk kering kulit batang tanaman *C. macrophyllum* Sheff diperoleh ekstrak kental etanol sebanyak 477,5 g. Hasil partisi ekstrak tersebut diperoleh masing-masingnya fraksi *n*-heksana 5 g, fraksi etil asetat 59,3 g, fraksi *n*-butanol 47,8 g, dan fraksi air sebanyak 260,55 g.
- c. Dari fraksi etil asetat berhasil diisolasi 2 senyawa murni yaitu S1 dan S2. Molekul S1 berupa minyak berwarna kuning keemasan dan beraroma khas dengan titik didih 173-175°C sebanyak 35,4 mg yang memiliki R_f 0,25 dengan fase gerak 100% *n*-heksana. Sedangkan molekul S2 berupa kristal berwarna coklat dengan titik leleh $> 300^\circ\text{C}$ sebanyak 163,2 mg, yang memiliki R_f 0,7 dengan perbandingan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (2:8).

4.1.2 Karakterisasi Hasil Isolasi

a. Isolat 1 (S1)

Spektrum UV isolat 1 (S1) dalam pelarut metanol memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang (λ_{maks}) 221 dan 281 nm. Data spektrum IR

diperoleh serapan pada bilangan gelombang (ν) 2922, 2850, 1462, 1739, 1166 cm^{-1} . Pemeriksaan berat molekul senyawa S1 dengan GC-MS menunjukkan berat molekul relatif pada m/z 296 dengan waktu retensi 20,95 menit dalam pelarut metanol. Pemeriksaan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dalam pelarut CDCl_3 memperlihatkan signal proton pada pergeseran kimia (δ_{H}) 5,34; 3,67; dan 0,88 ppm. Adanya kumpulan signal proton pada pergeseran kimia (δ_{H}) antara 1 sampai 2,4 ppm. Sedangkan pemeriksaan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dalam pelarut CDCl_3 memperlihatkan signal karbon pada pergeseran kimia (δ_{C}) 174,4; 130,1; 129,8; 51,5 dan 14,9 ppm. Adanya kumpulan signal karbon pada pergeseran kimia (δ_{C}) antara 25 sampai 35 ppm. Dari data UV, IR, GC-MS, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa S1 mempunyai rumus molekul $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$.

b. Isolat 2 (S2)

Spektrum UV isolat 2 (S2) dalam pelarut metanol memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang (λ_{maks}) 222 dan 278 nm. Data spektrum IR diperoleh serapan pada bilangan gelombang (ν) 3454, 3496, 3174, 3153, 2989, 2931, 1620, 1440, dan 1143 cm^{-1} . Pemeriksaan berat molekul senyawa S1 dengan LC-MS menunjukkan berat molekul relatif pada m/z 290. Pemeriksaan spektrum $^1\text{H-NMR}$ dalam pelarut CD_3OD memperlihatkan signal proton pada pergeseran kimia (δ_{H}) 6,97 (1H, *d*, J 1,5); 6,80 (*dd*, 1,5 & 8,5); 6,76 (1H, *d*, 8,5); 5,94 (1H, *d*, J 1,8 Hz); 5,91 (1H, *d*, J 1,8 Hz); 4,81 (1H, *s*); 4,18 (1H, *m*); 2,86 (1H, *dd*, J 16,5 dan 5 Hz); dan 2,73 (1H, *dd*, J 5 dan 16,5 Hz) ppm. Sedangkan pemeriksaan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dalam pelarut CD_3OD memperlihatkan signal karbon pada pergeseran kimia (δ_{C}) 158,1; 157,7; 157,5; 146; 145,9; 119,5; 115,9; 115,4; 96; 95,5; 80; 67,6; dan 29,4 ppm. Dari data UV, IR, GC-MS, RMI senyawa S2 mempunyai rumus molekul $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$.

4.1.3 Bioaktivitas

a. Uji Toksisitas Fraksi Terhadap Udang *Artemia salina*

Hasil uji toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach yang dilakukan terhadap fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol serta isolat 1 dan isolat 2 dapat dilihat pada **Tabel 4.2** berikut,

Tabel 4.2 Hasil uji toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach

Sampel	Konsent ppm	Log K	Hidup awal			Hidup akhir			Akum.	Akum.	%	LC ₅₀ (µg/mL)
									mati	Hidup	Mortalitas	
Fraksi <i>n</i> -heksana	10	1	10	10	10	8	8	10	4	46	8	85.11
	100	2	10	10	10	5	7	4	18	20	47.37	
	500	2.7	10	10	10	1	2	1	44	4	91.67	
	1000	3	10	10	10	0	0	0	74	0	100	
Fraksi Etil asetat	10	1	10	10	10	10	10	9	1	71	1.39	269.2
	100	2	10	10	10	3	6	8	14	42	25	
	500	2.7	10	10	10	5	3	5	31	25	55.36	
	1000	3	10	10	10	4	5	3	49	12	80.33	
Fraksi <i>n</i> -butanol	10	1	10	10	10	7	8	7	8	43	15.69	69.18
	100	2	10	10	10	5	6	5	22	21	51.16	
	500	2.7	10	10	10	2	0	3	47	5	90.38	
	1000	3	10	10	10	0	0	0	77	0	100	
S1	10	1	10	10	10	10	10	10	0	59	0	141.2
	100	2	10	10	10	9	9	8	4	29	12.12	
	500	2.7	10	10	10	2	1	0	31	3	91.18	
	1000	3	10	10	10	0	0	0	61	0	100	
S2	10	1	10	10	10	10	10	10	0	60	0	154.9
	100	2	10	10	10	7	5	5	13	30	30.23	
	500	2.7	10	10	10	6	3	2	32	13	71.11	
	1000	3	10	10	10	1	1	0	60	2	96.77	

b. Uji Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap fraksi-fraksi hasil partisi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat dengan IC₅₀ 47,43 µg/mL, fraksi *n*-butanol memiliki IC₅₀ 113,89 µg/mL, sedangkan fraksi *n*-heksana tidak aktif sama sekali dengan IC₅₀ 6265,5 µg/mL dengan kuersetin sebagai pembanding. Selengkapnya tersaji pada **Tabel 4.3** berikut :

Tabel 4.3 Data Uji antioksidan ekstrak hasil partisi

No.	Sampel	Kons	Abs	% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)	Ket
1	Blanko		1.116			
			1.169			
2	Standar Kuersetin	25	0.21	82.46	14.56	Aktif
		20	0.35	70.23		
		15	0.55	53.21		
		10	0.78	33.62		
		5	1.04	11.38		
3	Fraksi <i>n</i> -butanol	50	0.84	28,19	113,89	Aktif
		30	0.95	19,56		
		20	0.98	17,25		
		10	1.01	14,16		
4	Fraksi etil asetat	50	0.51	56,37	47.43	Aktif
		30	0.84	29.86		
		20	0.99	15,96		
		10	1	14,16		
5	Fraksi <i>n</i> -heksana	50	0.85	0.32	6265,5	T.Aktif
		30	1.06	0.1		
		20	1.16	0.01		
		10	1.17	0.00		

Sedangkan uji antioksidan hasil fraksinasi dan isolasi menunjukkan hanya fraksi gabungan 1KCV dan 2KCV aktif antioksidannya dengan IC₅₀ 34,3 dan 36,5 µg/mL. Senyawa hasil isolasi (isolat 1 dan isolat 2) yang diuji antioksidannya hanya isolat 2 (S2) yang menunjukkan aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ 5,31 µg/mL, sedangkan isolat 1 (S1) tidak menunjukkan daya antioksidannya (IC₅₀ 1220,73 µg/mL). Uji aktivitas Antioksidan ini menggunakan kuersetin sebagai standar. Selengkapnya dapat dilihat pada tabel **Tabel 4.4** berikut :

Tabel 4.4 Data uji antioksidan hasil fraksinasi dan isolasi

No.	Sampel	Kons	Abs	% Inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)	Ket
	Blanko		2.180 2.182			
1	Standar Quersetin	25	0.205	89.49	5.63	Aktif
		20	0.348	82.17		
		15	0.547	71.96		
		10	0.776	60.23		
		5	1.036	40.89		
2	Fraksi 1KCV	200	0.103	94.72	34.3	Aktif
		100	0.091	95.33		
		50	0.098	94.98		
		25	1.542	20.96		
3	Fraksi 2KCV	200	0.108	94.46	36.5	Aktif
		100	0.112	94.26		
		50	0.09	95.39		
		25	1.81	7.227		
4	Senyawa 1 (S1)	200	2.125	2.53	1220.73	Tdk Aktif
		100	2.166	0.64		
		50	2.151	1.330		
		10	2.154	1.193		
		5	2.141	1.789		
5	Senyawa 2 (S2)	200	0.112	94.86	5.31	Aktif
		100	0.100	95.41		
		50	0.095	95.64		
		10	0.825	65.15		
		5	1.193	45.30		

c. Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi α -Glukosidase

Uji aktivitas antidiabetes dengan mekanisme inhibisi α -glukosidase dengan standar koji terhadap fraksi etil asetat dan senyawa hasil isolasi menunjukkan bahwa fraksi etil asetat aktif sebagai antidiabetes dengan IC₅₀ 26,198 µg/mL, sedangkan dari senyawa hasil isolat hanya S2 yang menunjukkan aktivitas antidiabetesnya dengan IC₅₀ 9,10 µg/mL. Sebaliknya senyawa S1 tidak menunjukkan aktivitas menghambat enzim α -glukosidase (IC₅₀ 1424,78 µg/mL). Uji aktivitas antidiabetes ini menggunakan ekstrak etil asetat koji sebagai standar. Selengkapnya pada **Tabel 4.5** dibawah ini :

Tabel 4.5 Data uji aktifitas antidiabetes fraksi etil asetat dan isolat

Sampel	Abs	Kons	% Inh	IC ₅₀ (µg/mL)	Ket
Blanko	1.792				
Standar EA koji	0.135	25	92.46	3.65	Aktif
	0.215	12.5	88.0		
	0.586	6.25	67.29		
	1.053	3.125	41.24		
Fraksi EA	0.931	25	48.05	26.19	Aktif
	1.241	12.5	30.75		
	1.405	6.25	21.59		
	1.5	3.125	16.29		
S1	1.16	25	2.66	1424.78	Tidak Aktif
	0.918	12.5	2.80		
	1.018	6.25	2.13		
	1.336	3.125	1.93		
S2	0.298	25	83.37	9.10	Aktif
	0.727	12.5	59.43		
	1.245	6.25	30.52		
	1.411	3.125	21.26		

d. Uji Aktivitas Antimalaria Secara *In Vitro*

Hasil uji aktivitas antimalaria fraksi etil asetat yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode kultur berkelanjutan tidak memperlihatkan aktivitas penghambatan pertumbuhan parasit *plasmodium*. Hal yang sama juga ditunjukkan senyawa utama yang berhasil diisolasi dari fraksi ini. Data penghambatan parasitemia dapat dilihat pada **Tabel 4.6** berikut ini,

Tabel 4.6 Data penghambatan parasitemia fraksi etil asetat dan isolat

Sampel	Parasitemia (%)		Rata2 (%)		Parasitemia (%)		Rata2 (%)		Pertumbuhan (%)	Keterangan
Fraksi EA										
Kontrol	2,83	2,92	2,874	3,7	3,6	3,5	100,0			
10 ⁻⁹	2,83	2,92	2,874	3,5	3,8	3,65	104			Tidak terkait dosis
10 ⁻⁸	2,83	2,92	2,874	3,6	3,9	3,75	107			
10 ⁻⁷	2,83	2,92	2,874	3,2	3,5	3,35	95,71			
10 ⁻⁶	2,83	2,92	2,874	3,3	3,5	3,4	97,14			
10 ⁻⁵	2,83	2,92	2,874	3	3	3	85,71			
Isolat2 (S2)										
Kontrol	1,5	1,3	1,4	3,1	3,0	3,05	100,0			Tidak terkait dosis
10 ⁻⁹	1,5	1,3	1,4	2,7	2,8	2,75	90,16			
10 ⁻⁸	1,5	1,3	1,4	2,7	2,8	2,75	90,16			
10 ⁻⁷	1,5	1,3	1,4	2,7	2,8	2,75	90,16			
10 ⁻⁶	1,5	1,3	1,4	2,7	2,8	2,75	90,16			
10 ⁻⁵	1,5	1,3	1,4	2,7	2,8	2,75	90,16			
Klorokuin										
kontrol	0,45	0,5	0,475	3,7	4	3,85	100,0			Terkait dosis
10 ⁻⁹	0,45	0,5	0,475	2,3	2,8	2,55	66,2			
10 ⁻⁸	0,45	0,5	0,475	0,3	0,8	0,55	14,3			
10 ⁻⁷	0,45	0,5	0,475	0,08	0,09	0,085	2,2			
10 ⁻⁶	0,45	0,5	0,475	0,03	0,03	0,035	0,9			
10 ⁻⁵	0,45	0,5	0,475	0,01	0,01	0,005	0,1			

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pembahasan Umum

Ekstraksi kandungan kimia dari kulit batang tumbuhan *C. macrophyllum* Scheff dilakukan dengan menghaluskannya dengan menggunakan blender. Penghalusan ini bertujuan untuk memperluas permukaan sampel agar kontak antara pelarut dengan sampel semakin luas sehingga mempermudah penetrasi pelarut kedalam sel dan proses pelarutan senyawa-senyawa yang terkandung didalam sampel menjadi sempurna. Penyarian sampel dilakukan dengan cara maserasi karena merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana baik dalam penggunaan alat-alat maupun dalam proses pengerjaannya yaitu cukup dengan merendam sampel dalam pelarut organik selama 3 hari sambil sesekali dikocok,

kemudian disaring. Perendaman dilakukan tiga kali sampai filtrat mencapai bening, karena dianggap proses penyarian telah sempurna. Etanol 70% digunakan sebagai pelarut dalam maserasi ini karena selain lebih aman daripada metanol juga mampu melarutkan hampir semua senyawa organik baik polar maupun non polar.

Ekstrak etanol 70% yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya secara *in vacuo*, karena dalam keadaan vakum tekanan uap pelarut akan menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya sehingga dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa temolabil yang ada dalam sampel. Ekstrak etanol dikeringkan dan ditimbang diperoleh ekstrak kental etanol 477,5 g.

Partisi dilakukan dengan menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Pelarut *n*-heksana akan menarik senyawa-senyawa non polar karena sifatnya yang non polar, etil asetat untuk menarik senyawa-senyawa yang semi polar dan senyawa polar ditarik dengan pelarut *n*-butanol yang bersifat polar. Partisi diawali dengan pelarut *n*-heksana : air dengan perbandingan sama (1:1) selama 1 hari 3 kali berturut-turut sampai eluat (*n*-heksana) bening, dimana diasumsikan senyawa-senyawa non polar telah ditarik pelarut *n*-heksana secara sempurna. Selanjutnya menggunakan pelarut semi polar dengan perbandingan yang sama, etil asetat : air (1:1) selama 1 hari 3 kali berturut-turut sampai eluat (etil asetat) bening, dimana diasumsikan senyawa-senyawa semi polar telah ditarik pelarut etil asetat secara sempurna. Hal yang sama juga dilakukan terhadap *n*-butanol yang bersifat polar. Namun karena *n*-butanol dan air sama-sama polar, batas antara kedua pelarut sangat lama terbentuk yang membutuhkan waktu yang lebih lama. Pelarut hasil partisi kemudian diuapkan secara *in vacuo* dengan menggunakan *rotary evaporator*, khusus pelarut air dikeringkan dalam oven 50°C. Ekstrak kering kemudian ditimbang dengan berat masing-masing: *n*-heksana 5 g; etil asetat 59,4 g; *n*-butanol 47,8 g; dan ekstrak kental fraksi air 260,55g.

Penelusuran senyawa aktif diawali dari uji fitokimia ekstrak etanol. Uji fitokimia dimaksudkan untuk mengidentifikasi kemungkinan golongan senyawa kimia apa saja yang dikandung oleh kulit batang *C. macrophyllum* Scheff. Hasil

uji fitokimia menunjukkan bahwa kulit batang *C. macrophyllum* Scheff mengandung senyawa kimia golongan alkaloid dan flavonoid.

Penelusuran senyawa aktif farmakologi dilanjutkan dengan uji bioaktivitas terhadap hasil partisi dari ekstrak etanol yaitu fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol. Uji bioaktivitas meliputi uji toksisitas dan uji antioksidan. Uji awal toksisitas dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Masing-masing menunjukkan daya toksis yang cukup potensial dengan LC₅₀ sebesar 85,11; 269,15; dan 69,18 µg/mL. Data ini menunjukkan semua fraksi berpotensi mengandung senyawa aktif secara farmakologi. Sedangkan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil). Fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan paling kuat dengan IC₅₀ sebesar 47,43 µg/mL dan fraksi *n*-butanol memiliki IC₅₀ sebesar 113,89 µg/mL, sedangkan fraksi *n*-heksana tidak aktif sama sekali meredam radikal DPPH. Data diatas cukup menjadi jawaban dipilihnya fraksi etil asetat untuk diproses lebih lanjut karena diduga senyawa golongan flavonoid banyak terkandung dalam fraksi etil asetat.

Penelusuran senyawa aktif antioksidan dilanjutkan dengan menggunakan kromatografi kolom cepat. Sebanyak 50,3 g fraksi etil asetat difraksinasi dengan teknik kromatografi kolom cepat menggunakan fase diam silika G 60 (230-400 mesh) sebanyak 400 g dan fase gerak *n*-heksana yang ditingkatkan kepolarannya dengan penambahan etil asetat dan metanol secara bergradien (*n*-heksana-etil asetat-metanol : 100%; 20:1; 10:1; 5:1; 1:1; 100; 20:1; 10:1; 5:1; 3:1 dan 1:1). Eluen yang digunakan masing-masing fraksi sama yaitu 400 ml. Hasil kromatografi kolom cepat sebanyak sebelas fraksi, pelarutnya diuapkan secara *in vacuo* menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi-fraksi ini dimonitor dengan menggunakan plat KLT pada sinar UV dengan λ_{max} 254 dan 366 dan penyemprotan dengan H₂SO₄ 5% dalam metanol, kemudian dipanaskan agar noda tidak mudah menguap. Noda yang menunjukkan kemiripan (R_f) digabung untuk dimurnikan lebih lanjut.

Dari sebelas fraksi ini setidaknya fraksi ke-5 s/d 7 (1KCV) memperlihatkan pola noda yang sama, demikian juga dengan fraksi 8 s/d 11

Universitas Indonesia

(2KCV). Fraksi yang memperlihatkan pola noda yang sama tersebut digabung dan ditimbang masing-masing sebanyak 30g, dan 15,7g. Fraksi 1 (*n*-heksana 100%) sebanyak 566,4 mg berwujud minyak kuning muda; fraksi 2 berwujud minyak kuning keemasan sebanyak 334,4mg; fraksi 3 sebanyak 926,1 mg berwujud minyak hijau muda dan fraksi 4 berupa endapan coklat sebanyak 2g. Hasil penelusuran aktivitas antioksidan dari fraksi 1-4 tidak menunjukkan aktivitas antioksidan, sebaliknya fraksi gabungan 5-7 (1KCV) dan fraksi gabungan 8-11 (2KCV) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} masing-masingnya adalah 34,3 dan 36,5 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi ke 2 menarik unuk diisolasi karena berwarna kuning dan diharapkan mendapatkan senyawa santon.

Pola noda fraksi ke-2 pada plat KLT cukup sederhana dengan pengembang *n*-heksana 100% dan kemungkinan mudah untuk mendapatkan senyawa murni. Fraksi ini kemudian di kromatografi kolom lambat menggunakan silika G 60 (70-230 mesh) dengan metode isokratik (*n*-heksana 100%). Pemilihan eluen secara isokratik diharapkan kecepatan pemisahan komponen senyawa berlangsung konstan.

Hasil kolom ditampung dengan vial masing-masing sebanyak 5 ml sebanyak 22 fraksi. Tampungan 3-5 memperlihatkan kesamaan pola noda dengan warna kuning pada plat KLT, masih mengandung pengotor dengan R_f yang hampir sama namun masih terpisah satu sama lain. Inilah yang mendasari pemisahan dilanjutkan secara preparatif dengan menggunakan plat KLT preparatif. Pemisahan hasil preparatif ini berhasil diperoleh senyawa murni yang berwarna kuning dan beraroma khas sebanyak 35,4 mg (S1).

Fraksi 1KCV dimurnikan dengan kolom kromatografi lambat dengan fase diam silika G 60 (70-230 mesh) sebanyak 289 g dengan eluen yang kepolarannya juga dinaikkan secara bertingkat (*n*-heksana-etil asetat-metanol: *n*-heksana 100%; 95:5; 85:15; 70:30; 60:40; 50:50; 30:70; 20:80; 10:90; 100% etil asetat, etil asetat-metanol: 95:5; 90:10; 80:20; 50:50; 30:70; dan 100% metanol). Eluen yang digunakan tiap perbandingannya sebanyak 500 ml. Eluat ditampung masing-masing sebanyak 150 ml dan diperoleh 68 fraksi tampungan, kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator*. Pola noda diidentifikasi dengan teknik

kromatografi lapis tipis pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 dan 366 dan penyemprotan dengan H₂SO₄ 5% dalam metanol kemudian dipanaskan agar noda tidak mudah menguap. Fraksi yang menunjukkan pola noda yang sama digabung dan diperoleh 14 fraksi gabungan.

Pada tampungan ke-16-19 terbentuk kristal berwarna coklat. Kristal tersebut dipisahkan dari fraksinya dan dimurnikan lebih lanjut dari pengotornya dengan cara pencucian dengan *n*-heksana dilanjutkan dengan rekristalisasi menggunakan campuran metanol dan diklormetana, disimpan semalaman. Diklormetana bersifat semipolar, dengan berat jenis dan titik didih lebih kecil dari metanol. Dari sifat diklormetana tersebut diharapkan senyawa-senyawa semi polar akan tertarik, selain itu posisi pelarut ini dalam campuran dengan metanol berada pada bagian atas dan juga akan lebih cepat menguap sehingga diharapkan senyawa-senyawa semi polar akan menempel pada dinding vial, sebaliknya senyawa polar akan berada didasar vial. Hasil rekristalisasi ini diidentifikasi dengan teknik kromatografi lapis tipis pada sinar UV dengan λ_{\max} 254 dan 366 dan penyemprotan dengan H₂SO₄ 5% dalam metanol. Proses rekristalisasi dilakukan berulang kali sampai diperoleh senyawa murni yang ditandai dengan noda tunggal pada plat KLT (R_f 0,7) dengan pengembang *n*-heksana-etil asetat (2:8) dan dari hasil identifikasi dengan LC-MS juga menunjukkan puncak tunggal.

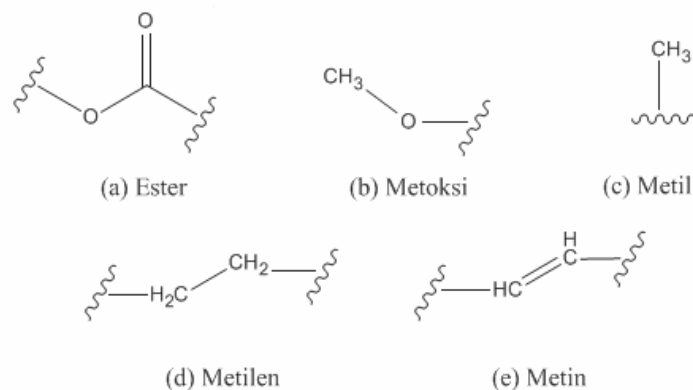
4.2.2 Pembahasan Senyawa Hasil Isolasi

a. Isolat 1 (S1)

Hasil isolasi ekstrak etil asetat kulit batang *Calophyllum macrophyllum* Scheff berupa minyak berwarna kuning sebanyak 35,4 mg dengan bau yang khas dan titik didih 173-175°C. Analisis dengan spektroskopi UV-Vis menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang (λ_{\max}) 221 nm dan 281 nm, menunjukkan adanya ikatan rangkap dan gugus karbonil. Analisis GC-MS menunjukkan senyawa ini memiliki berat molekul 296. Dari spektrum infra merah menunjukkan pita serapan tajam pada bilangan gelombang ν : 2922 dan 2850 cm⁻¹ membuktikan adanya vibrasi ulur dari gugus -C-H alifatis, hal ini diperkuat dengan adanya puncak serapan yang tajam pada daerah bilangan gelombang ν :

1462 cm^{-1} membuktikan adanya vibrasi tekuk gugus -C-H alifatis. Adanya puncak serapan pada bilangan gelombang ν : 1739 cm^{-1} bukti adanya gugus ester. Hal ini diperkuat dengan adanya gugus -C-O, dengan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang 1166 cm^{-1} . Berdasarkan data spektrum infra merah tersebut dapat diperkirakan bahwa molekul ini merupakan suatu senyawa asam lemak rantai lurus.

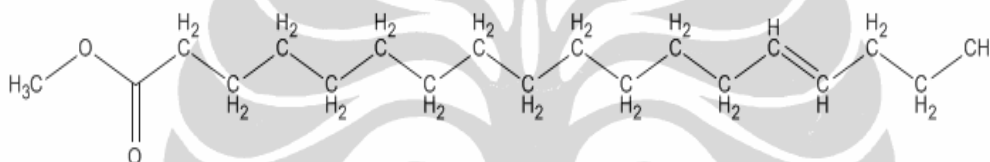
Penentuan struktur selanjutnya dilakukan dengan memanfaatkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$. Adanya signal proton (2H) pada pergeseran kimia (δ_{H}) 5,34 ppm, menunjukkan ikatan rangkap non aromatis, hal ini diperkuat dari data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ yang menunjukkan adanya (2C) ikatan metin (-CH) pada pergeseran kimia (δ_{C}) 130,09 dan 129,84 ppm. Adanya metoksi ditandai dengan adanya signal proton (3H) pada pergeseran kimia (δ_{H}) 3,66 ppm yang diperkuat dari data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ yang menunjukkan adanya karbon (CH_3) yang terikat dengan atom Oksigen (-O- CH_3) pada pergeseran kimia (δ_{C}) 51,52. Adanya signal proton (3H) pada pergeseran kimia (δ_{H}) 0,88 ppm yang diperkuat dari data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ menunjukkan adanya ikatan metil (- CH_3) pada pergeseran kimia (δ_{C}) 14,19 ppm. Adanya kumpulan signal proton pada pergeseran kimia (δ_{H}) antara 1 sampai 2,4 ppm dan diperkuat dari data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dengan pergeseran kimia (δ_{C}) antara 25 sampai 35 ppm menunjukkan adanya ikatan metilen (- CH_2), hal ini dipertegas dengan spektrum DEPT. Dari penjelasan diatas dapat disimpulkan bahwa molekul tersebut memiliki ester, metoksi, metil, metilen, dan metin dimana fragmentasi molekul tersebut dapat digambarkan seperti pada **Gambar 4.1** berikut,



Gambar 4.1 Fragmen-fragmen yang menyusun molekul metil ester asam lemak

Dari hasil penjumlahan puncak-puncak spektrum DEPT karbon menunjukkan 1 atom C kuertener, 2 gugus $-CH$ (metin), 2 gugus CH_3 (metil), dan dengan 2 atom O maka diperkirakan rumus molekul senyawa tersebut adalah $C_5H_8O_2$ dengan perkiraan berat molekulnya 100. Dari hasil pengukuran GC-MS berat molekul senyawa ini adalah 296, sehingga selisihnya adalah 196 yang merupakan bobot gugus 14 metilen (CH_2) sehingga rumus molekul yang sebenarnya adalah $C_{19}H_{36}O_2$.

Dari rumus molekul diatas $C_{19}H_{36}O_2$ dapat dihitung jumlah ikatan rangkap dengan rumus $F = X - 0,5Y + 0,5Z + 1$ diperoleh 2, bila lima fragmen (a), (b), (c), (d), dan (e) ini digabung maka akan diperoleh kemungkinan struktur molekul sebagai berikut:



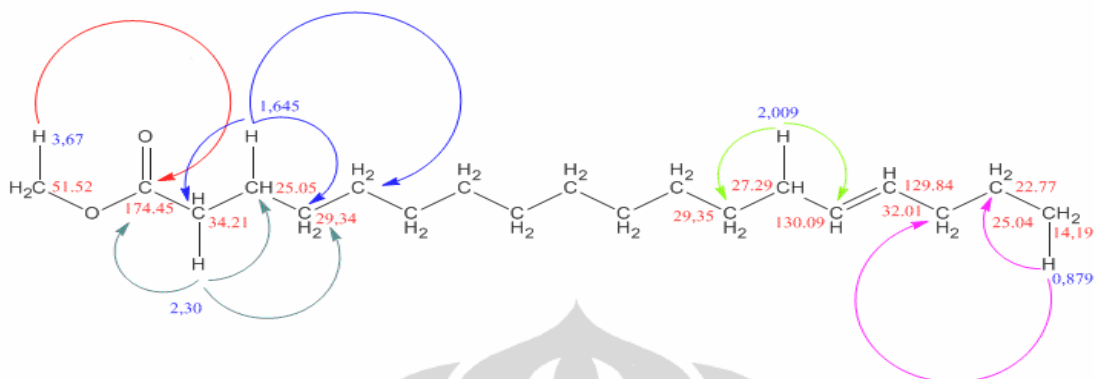
Gambar 4.2 Struktur molekul mrtil ester asam lemak

Untuk memperkuat dugaan struktur diatas maka dilakukan analisis 2D dengan menggunakan teknik HMQC dan HMBC seperti pada **Tabel 4.7** berikut:

Tabel 4.7 Analisis 2D senyawa metil ester asam lemak menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT

H-NMR	HMQC	HMBC (δ ppm)					DEPT
	δ ppm	1	2	3	4	5	
3,67	51,52	174,45					CH_3
	22,77						CH_2
	32,01						CH_2
5,33	129,84						CH
5,33	130,09						CH
2,01	27,29	29,35	130,09				CH_2
1,65	25,05	29,34	34,21	29,41			CH_2
2,30	34,21	25,05	29,41	174,45			CH
0,88	14,19	22,77	32,01				CH_3

Hasil analisis 2D dengan menggunakan teknik HMQC dan HMBC seperti pada **Tabel 4.7** diatas dapat digambarkan seperti berikut,

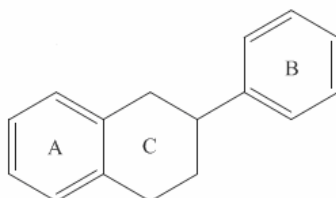


Gambar 4.3. Struktur molekul metil ester asam lemak hasil analisis 2D dengan menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT

b. Isolat 2 (S2)

Hasil isolasi dari ekstrak etil asetat kulit batang *Calophyllum macrophyllum* Scheff berupa kristal berwarna coklat sebanyak 163,2 mg dengan titik leleh lebih dari 300°C. Analisis dengan spektroskopi UV-Vis menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang (λ_{maks}) 218 nm dan 280,5 nm. Analisis LC-MS menunjukkan senyawa ini memiliki berat molekul 290. Dari penyidikan spektrum infra merah senyawa ini menunjukkan pita serapan tajam pada bilangan gelombang ν : 3454 dan 3496 cm^{-1} membuktikan adanya vibrasi ulur dari gugus -OH, hal ini diperkuat dengan adanya puncak serapan yang tajam pada daerah bilangan gelombang ν : 1440 cm^{-1} membuktikan adanya vibrasi tekuk gugus -OH. Adanya puncak serapan pada bilangan gelombang ν : 3174 cm^{-1} dan 3153 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus aromatis (vibrasi ulur -C-H aromatis) dan diperkuat dengan adanya puncak pita serapan pada bilangan gelombang 1620 cm^{-1} (vibrasi ulur -C=C- aromatis). Adanya puncak serapan pada bilangan gelombang ν : 2989 cm^{-1} dan 2931 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi ulur dari -CH, sedangkan adanya puncak serapan pada daerah bilangan gelombang ν : 1143 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-O-C. Berdasarkan data spektrum infra merah tersebut dapat diperkirakan bahwa molekul S2 mengandung gugus OH, C-H aromatis, C-H alifatis & C-O.

Penentuan struktur selanjutnya dilakukan dengan memanfaatkan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ yang menunjukkan adanya cincin aromatis (A) dengan proton gandengan meta yang memiliki pergeseran kimia pada 5,91 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) dan 5,94 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) (lihat Gambar 4.4). Adanya proton aromatis pada pergeseran kimia 6,76 (1H, *d*, $J = 8,5$); 6,80 (*dd*, $J = 1,5$ & 8,5); 6,97 (1H, *d*, $J = 1,5$) menunjukkan adanya cincin aromatis kedua (B) yang memiliki proton gandengan orto dan meta (lihat gambar b). Adanya 5 buah proton aromatik diperkuat oleh spektrum RMI ^{13}C dengan adanya 5 ikatan $-\text{CH}$ pada pergeseran kimia (δC) 95,5; 96; 115,4; 115,9; dan 119,5 ppm. Selain dua pasang cincin aromatik senyawa S2 ini menunjukkan adanya 2 proton dengan ikatan geminal kopling yaitu proton-proton dengan pergeseran kimia pada daerah 2,73 (1H, *dd*, $J = 5$ dan 16,5 Hz) dan 2,86 (1H, *dd* = 5 dan 16,5 Hz). Adanya proton pada daerah 4,81 (1H, *m*) menunjukkan adanya proton yang terperisai (deshielding) yang diperkirakan terikat pada atom karbon yang mengikat oksigen diperkuat dengan spektrum RMI ^{13}C pada pergeseran kimia 80 ppm. Adanya pergeseran kimia pada 4,18 (1H, *s*) menunjukkan adanya proton yang terikat dengan gugus $-\text{OH}$ pada karbon siklis non aromatis yang diperkuat dengan spektrum RMI ^{13}C pada pergeseran kimia 67,6 ppm. Selanjutnya karbon siklis non aromatis tersebut dianggap sebagai cincin ketiga (C). Adanya puncak-puncak karbon kuartener pada 145,9; 146; 157,5; 157,7 dan 158,1 ppm diduga merupakan karbon yang terikat dengan gugus $-\text{OH}$. Dua cincin aromatis A dan B tersebut kemungkinan dihubungkan dengan cincin C non aromatis, diduga molekul diatas memiliki kerangka golongan flavonoid.



[Sumber : Apak, *et. al.* 2007]

Gambar 4.4. Struktur inti golongan flavonoid

Selanjutnya penentuan pola hidroksi senyawa golongan flavonoid ini dilakukan dengan penambahan pereaksi geser menggunakan spektrometer UV-Vis

Universitas Indonesia

(Hitaci). Spektrum UV yang dihasilkan dengan pelarut MeOH memberikan 2 pita serapan maksimum λ_{maks}^{MeOH} 219 nm; dan 280,5 nm (**Tabel 4.8**).

Tabel 4.8 Serapan maksimum spektrum UV menggunakan pereaksi geser

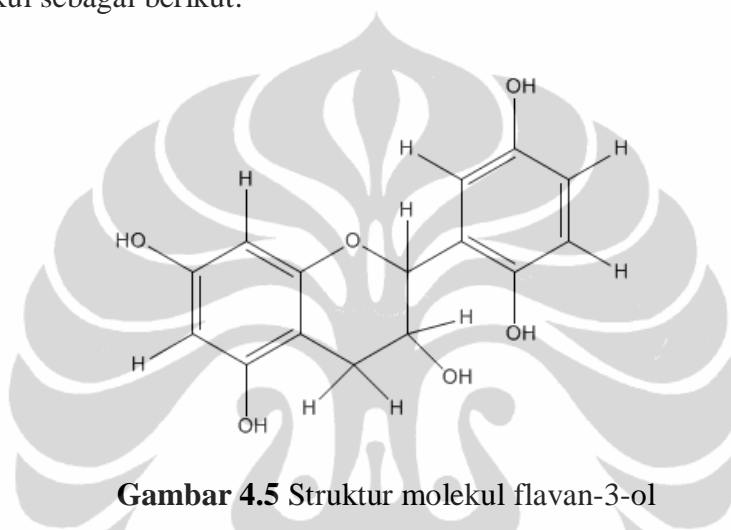
Pereaksi Geser	Serapan Maksimum (λ_{max} (nm))	
	Pita I	Pita II
MeOH (pembanding)	280,5	219
MeOH + NaOH	289,5	219,5
MeOH + NaOAc	280,5	223
MeOH + AlCl ₃	280,5	218,5
MeOH + AlCl ₃ + HCl	280	218

Penambahan pereaksi NaOH memperlihatkan pergeseran batokromik dengan intensitas naik. Pola spektrum tersebut menunjukkan adanya gugus hidroksi (OH) pada posisi 7 yang bersifat asam pada cincin benzen (pita II). Pergeseran batokromik yang tipis tersebut disebabkan keasaman yang berkurang dari gugus 7-hidroksi tersebut. Sedangkan kenaikan 9,5 nm pada susunan sinamoil (pita I) menunjukkan adanya hidroksi (OH) pada posisi 3. Penambahan pereaksi geser NaOAc memperlihatkan pergeseran batokromik dengan intensitas naik pada pita II. Pola spektrum demikian mempertegas kembali adanya gugus hidroksi (OH) pada posisi 7. Penambahan pereaksi geser AlCl₃ tidak memperlihatkan pergeseran batokromik. Pola spektrum tersebut mengindikasikan tidak adanya gugus keton yang membentuk kompleks stabil dengan gugus hidroksi pada posisi 3-OH maupun 5-OH dan juga petunjuk tidak adanya gugus *o*-diOH pada cincin aromatis. Penambahan AlCl₃ + HCl juga tidak memperlihatkan pergeseran batokromik pada pita I dan II. Pola spektrum demikian mempertegas kembali tidak adanya kompleks keton-hidroksi dan *o*-diOH pada cincin aromatis (Mabry, *et al.* 1970).

Hasil penjumlahan puncak-puncak spektrum DEPT karbon menunjukkan 7 atom C kuertener, 7 gugus -CH (metin), 1 gugus CH₂ (metilen), dan dengan 5 gugus -OH maka diperkirakan rumus molekul senyawa tersebut adalah C₁₅H₁₄O₅ dengan perkiraan berat molekulnya 274. Dari hasil pengukuran LC-MS berat

molekul senyawa ini adalah 290, sehingga selisihnya adalah 16 yang merupakan bobot 1 atom oksigen. Sebagaimana adanya gugus C-O-C yang terlihat nyata pada spektrum infra merah memperkuat kesimpulan bahwa berat molekul yang tersisa adalah atom oksigen sehingga rumus sebenarnya $C_{15}H_{14}O_6$.

Dari rumus molekul di atas $C_{15}H_{14}O_6$ dapat dihitung jumlah ikatan rangkap dan jumlah cincin dengan rumus $F = X - 0,5Y + 0,5Z + 1$ diperoleh 9 (3 cincin dan 6 ikatan rangkap). Berdasarkan hasil analisis di atas maka dapat digambarkan struktur molekul sebagai berikut:



Analisis 2D menggunakan teknik HMQC, dan HMBC memperkuat dugaan seperti struktur di atas. Teknik ini dapat menjelaskan kepemilikan proton oleh suatu atom karbon tertentu (HMQC), juga dapat menjelaskan korelasi antara suatu proton dari suatu atom karbon terhadap karbon tetangganya pada satu atau lebih ikatan (HMBC). Selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel 4.9** berikut:

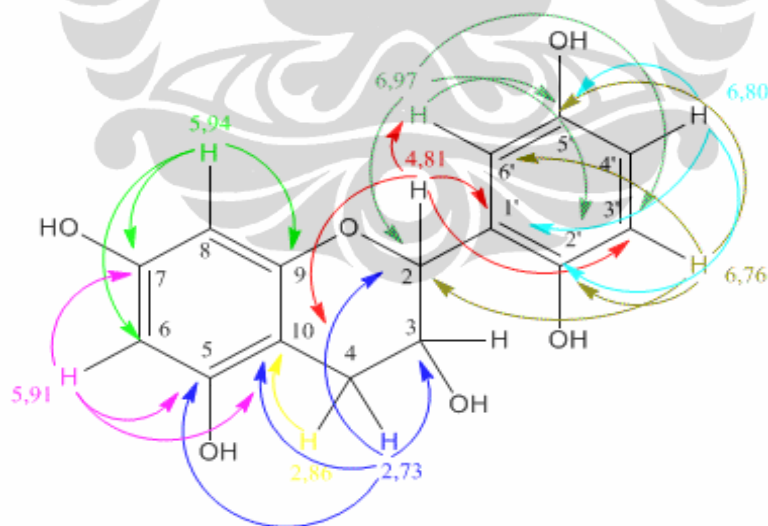
Tabel 4.9 Analisis 2D senyawa flavan-3-ol dengan teknik HMQC, HMBC & DEPT

Isolat 2 (BM 290)								
No.	H-NMR	HMQC δ ppm	HMBC (δ ppm)					DEPT
			1	2	3	4	5	
2	4,81, (s)	80	29,4	115,4	119,5	132,4		CH
3	4,18 (m)	67,6						CH
4a	2,73 (dd, 16,5 & 5)	29,4	67,6	80	100,2	157,5		CH ₂
4b	2,86 (dd, 16,5 & 5)				100,2			

Sambungan **Tabel 4.9**

Isolat 2 (BM 290)								
No.	H-NMR	HMQC δ ppm	HMBC (δ ppm)					DEPT
			1	2	3	4	5	
5	/	157,7						
6	5,91 (<i>d</i> , 1,8)	96,5	100,2	157,5	158,1			CH
7	/	158,1						
8	5,94 (<i>d</i> , 1,8)	96	96,5	157,7	158,1			CH
9	/	157,5						C-quer
10	/	100,2						C-quer
1'	/	132,4						C-quer
2'	/	145,9						C-quer
3'	6,76 (<i>d</i> , 8,5)	119,5	80	115,4	145,9	146		CH
4'	6,80 (<i>dd</i> , 8,5 & 1,5)	115,9	132,4	145,9	146			CH
5'	/	146						
6'	6,97 (<i>d</i> , 1,5)	115,4	80	119,5	145,9	146		CH

Hasil analisis 2D dengan menggunakan teknik HMQC, HMBC dan DEPT seperti pada **Tabel 4.9** diatas dapat digambarkan seperti pada **Gambar 4.6** seperti dibawah ini,

**Gambar 4.6** Struktur molekul flavan-3-ol hasil analisis 2D

Dari penelusuran pustaka ternyata senyawa tersebut merupakan suatu senyawa mirip dengan senyawa yang telah ditemukan sebelumnya yaitu 5, 7, 2', 5'-tetrahidroksi flavan-3-ol. Senyawa flavan-3-ol tersebut ditemukan antara lain

Universitas Indonesia

dalam tumbuhan *Prunus prostata* (Billia. 1996), dalam buah-buahan (crabapple fruits) termasuk genus Molus (Rosaceae) (Husain & Waterman. 1982) dan juga dilaporkan terdapat dalam kulit kayu tanaman *Garcinia maingayi* (Srihartati. 2007) seperti **Tabel 4.10** berikut,

Tabel 4.10 Data kemiripan antara isolat dengan senyawa pembanding 5, 7, 2', 5' tetrahidroksi flavan-3-ol

No. C	5, 7, 2', 5'-tetrahidroksi flavan-3-ol CD3OD, 50 MHz (¹³ C), 50 MHz (¹ H)		S2 CD ₃ OD, 300 MHz (¹³ C) 500 MHz (¹ H)	
	¹³ C (δ ppm)	δ ¹ H (ppm), J(Hz)	¹³ C (δ ppm)	δ ¹ H (ppm), J(Hz)
2	79,1	4,88	80	4,81, (s)
3	66,6	4,20 (m)	67,6	4,18 (m)
4a	28,6	2,74 (dd, 16,4 & 3,3)	29,4	2,73 (dd, 16,5 & 5)
4b		2,86 (dd, 16,4 & 3,3)		2,86 (dd, 16,5 & 5)
5	157,2	8,02 (s, -OH)	157,7	/
6	95,8	5,91(d, 2,4)	96,5	5,91 (d, 1,8)
7	157,2	8,18(s, -OH)	158,1	/
8	95,5	6,02(d, 2,4)	96	5,94 (d, 1,8)
9	156,8		157,5	/
10	99,4		100,2	/
1'	131,9		132,4	/
2'	144,9	7,83(s, -OH)	145,9	/
3'	114,4	6,79(d, 8,0)	119,5	6,76 (d, 8,5)
4'	115,1	6,84 (dd, 2,0 & 8,0)	115,9	6,80 (dd, 8,5 & 1,5)
5'	145,1	7,87(s, -OH)	146	/
6'	118,4	7,05(d, 2,0)	115,4	6,97 (d, 1,5)

4.3 Pembahasan Bioaktivitas

4.3.1 Uji Toksisitas (BSLT)

BSLT merupakan salah satu metode skrining untuk menentukan ketoksikan suatu ekstrak atau senyawa. Parameter pengamatan untuk menunjukkan adanya toksisitas suatu ekstrak atau senyawa adalah kematian *A.salina* Leach yang dinyatakan dalam nilai LC₅₀. LC₅₀ adalah konsentrasi senyawa yang dapat memberikan tingkat kematian sebesar 50% *A.salina* Leach. Nilai LC₅₀ merupakan nilai yang menunjukkan sifat toksik bahan uji yang diperoleh dengan menggunakan analisa regresi linier antara log konsentrasi dengan probit persen kematian. Semakin kecil nilai LC₅₀ sifat toksiknya semakin kuat. Suatu ekstrak tanaman memiliki efek sitotoksik jika daya toksik (LC₅₀)

terhadap larva udang *Artemia salina* Leach $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ dan $\leq 200 \mu\text{g/mL}$ untuk senyawa murni (Alam. 2002).

Metode BSLT merupakan uji biologis pendahuluan yang sederhana, cepat, tidak membutuhkan biaya yang besar dan dapat dipercaya. Metode ini juga sering digunakan dalam upaya penapisan senyawa antikanker dari tanaman (Meyer, *et al.* 1982).

Uji toksisitas pada tanaman *C.macrophyllum* Sheff dilakukan terhadap fraksi-fraksi dan senyawa murni yang didapat. Fraksi uji meliputi fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-butanol. Senyawa murni meliputi isolat 1 (S1) dan isolat 2 (S2). Secara umum semua fraksi uji menunjukkan efek toksik yang berarti, dimana semua fraksi uji memiliki nilai $\text{LC}_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$. Fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-butanol masing-masing memiliki nilai $\text{LC}_{50} = 85,11; 269,15; \text{ dan } 69,18 \mu\text{g/mL}$. Dari nilai ini dapat dilihat bahwa fraksi *n*-butanol memiliki efek toksisitas lebih besar terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dibandingkan fraksi lainnya, sedangkan fraksi etil asetat menunjukkan toksisitas paling rendah, namun masih cukup memiliki efek sitotoksik yang kuat karena memperlihatkan efek mematikan terhadap *A. salina* Leach pada konsentrasi kurang dari $1.000 \mu\text{g/mL}$.

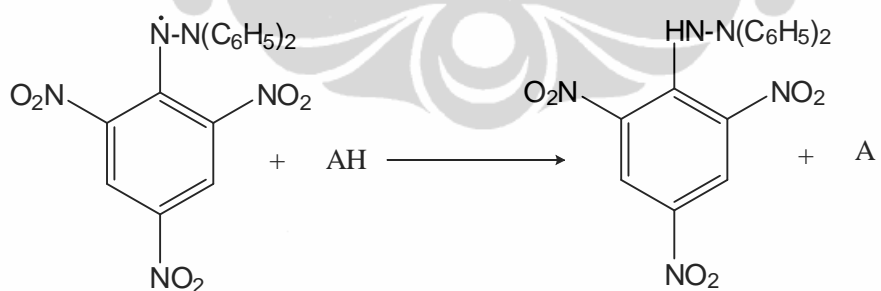
Dari 2 senyawa hasil isolasi fraksi etil asetat diperoleh LC_{50} 141,2 dan $154,9 \mu\text{g/mL}$ masing-masing terhadap isolat 1 (S1) dan isolat 2 (S2). Berdasarkan kriteria yang dikemukakan Alam (2002) menunjukkan senyawa hasil isolasi masih cukup toksis terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, karena memperlihatkan efek mematikan *A. salina* Leach pada konsentrasi kurang dari $200 \mu\text{g/mL}$.

4.3.2 Uji Antioksidan

Efek antioksidan dari fraksi-fraksi dan senyawa murni yang diperoleh dalam penelitian ini diuji dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode ini sederhana, mudah, cepat dan sampel yang dibutuhkan sedikit.

DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil yang jika direaksikan dengan ekstrak atau senyawa murni dari tumbuhan yang mengandung antioksidan maka akan terjadi reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH (ungu) yang kemudian berubah menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (kuning).

Prinsip penentuan aktivitas antioksidan metode ini berdasarkan pengukuran serapan senyawa hasil reaksi (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) antara DPPH dengan senyawa antioksidan. Aktivitas antioksidan dari sampel dinyatakan sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} ditentukan dengan program komputer sederhana untuk analisis probit pada taraf kepercayaan 95 % (Riswiyanto, *et al.* 2006; Gupta, *et al.* 2007; Lee, *et al.* 2006; Szabdo, *et al.* 2007). Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin aktif senyawa uji tersebut sebagai antioksidan. Kuersetin digunakan sebagai pembanding dalam uji aktivitas antioksidan ini, karena kuersetin diketahui merupakan flavonoid yang mempunyai aktivitas antioksidan sebagai penangkap radikal yang kuat dan merupakan flavonoid dalam bentuk aglikon. Dalam uji dengan DPPH ini, kuersetin akan mereduksi radikal ditunjukkan dengan berkurangnya nilai absorbansi pada larutan DPPH yang mengandung kuersetin, sehingga warna ungu dari DPPH akan berkurang intensitasnya (**Tabel 4.3** dan **Tabel 4.4**)



[Sumber : Velkov, *et al.* 2007]

Gambar 4.7 Reaksi penangkapan radikal bebas DPPH oleh antioksidan

Dari uji antioksidan yang dilakukan terhadap fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat, fraksi *n*-butanol menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat hanya pada fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 47,43 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan fraksi *n*-butanol

kurang aktif dengan IC_{50} 113,89 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi *n*-heksana sama sekali tidak aktif dengan IC_{50} 6265,5 $\mu\text{g/mL}$. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan, hal ini diduga karena di dalam fraksi etil asetat terdapat senyawa-senyawa semipolar yang mengandung gugus-gugus yang bisa menangkap radikal (*radikal scavenger*) sehingga meredam reaksi radikal bebas DPPH.

Penelusuran tahap awal terhadap senyawa aktif antioksidan menggunakan kolom cepat dengan fase diam silika G 60 (230-400 mesh) 400 g, diperoleh fraksi aktif antioksidan yaitu pada fraksi gabungan 1KCV (30 g), dan 2 KCV (15,7 g) dengan IC_{50} 34,3 dan 36,5 $\mu\text{g/mL}$. Penelusuran lebih lanjut dari fraksi 1KCV dilakukan dengan metode kromatografi kolom lambat dengan fase diam silika G 60 (70-230 mesh) sebanyak 289 g, dengan eluen yang ditingkatkan kepolarannya secara gradien. Eluat ditampung dan pelarut diuapkan dengan rotavapor, eluat kental dimasukkan kedalam vial. Dari fraksi ke 16-19 diperoleh kristal berwarna coklat. Kristal tersebut dipisahkan dari fraksinya, dicuci, kemudian direkristalisasi sehingga diperoleh senyawa murni.

Senyawa murni dikarakterisasi secara fisika dan spektroskopi, sehingga diidentifikasi sebagai senyawa flavan-3-ol. Kemudian dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Sebanyak 1 mg zat ditimbang dan diencerkan dalam berbagai konsentrasi 200, 100, 50, 10 dan 5, ppm dengan larutan kuersetin sebagai standar. Sesaat setelah penambahan larutan DPPH langsung terjadi reaksi perubahan warna dari ungu menjadi kuning dari semua konsentrasi zat tanpa pengocokan sebelumnya. Fenomena ini menunjukkan bahwa zat memiliki daya antioksidan yang sangat kuat. Nilai IC_{50} ditentukan dengan persamaan regresi linier menggunakan program komputer *Mic.Excel* (Riswiyanto, *et al.* 2006; Gupta, *et al.* 2007; Lee, *et al.* 2006).

Hasil perhitungan sampel menunjukkan aktivitas antioksidan dengan IC_{50} 5,31 $\mu\text{g/mL}$ lebih besar dari standar kuersetin dengan IC_{50} 5,63 $\mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi 5 ppm memperlihatkan senyawa flavan-3-ol memiliki aktivitas antioksidan sebesar 45,30%, sebaliknya standar kuersetin mampu meredam radikal bebas DPPH sebesar 40,23%. Pada konsentrasi 10 ppm juga menunjukkan kemampuan meredam radikal bebas DPPH senyawa flavan-3-ol sebesar 65,15%,

Universitas Indonesia

sedangkan standar kuersetin mampu meredam sebesar 60,89%. Sebagaimana diketahui bahwa daya aktivitas antioksidan ini bervariasi di antara tipe-tipe flavonoid yang berbeda, tergantung pada struktur samping yang melekat pada ketiga struktur cincin dasar, ataupun perbedaan geometri, jenis ikatan dst (Anonim. 2008, Hartati, S. 2007).

Senyawa hasil isolasi yang pertama tidak menunjukkan daya aktifitas antioksidan, kemungkinan karena senyawa ini tidak mengandung gugus yang berperan sebagai donor proton. Dari hasil analisis struktur kimia senyawa tersebut memang tidak memiliki gugus hidroksi (OH), namun berupa turunan asam lemak.

4.3.3 Uji Antidiabetes dengan Mekanisme Inhibisi α -Glukosidase

Uji inhibisi terhadap enzim α -glukosidase dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui aktivitas antihiperlikemik dari ekstrak etil asetat dan hasil isolasi (S1 dan S2) dengan menggunakan *p-nitrofenil- α -D-glukopironosa* sebagai substrat. Pada pengujian ini enzim α -glukosidase akan menghidrolisis substrat *p-nitrofenil- α -D-glukopironosa* menjadi *p-nitrofenol* yang berwarna kuning dan glukosa. Aktivitas enzim α -glukosidase diukur berdasarkan absorbansi *p-nitrofenol* yang berwarna kuning (Basuki, *et al.* 2002 & Dewi, *et al.* 2007).

Penggunaan inhibitor α -glukosidase sebagai antihiperlikemik berdasarkan penghambatan kompetitif secara *reversible* enzim terdapat pada usus halus terhadap substratnya yaitu karbohidrat (Koolman & Roehm, 2005). Sebagai pembanding digunakan ekstrak etil asetat koji yang merupakan hasil metabolit dari *Aspergillus terreus* (Dewi, *et al.* 2007).

Hasil uji *in vitro* yang telah dilakukan terhadap ekstrak etil asetat *C.macrophyllum* Scheff dan senyawa flavan-3-ol (S2) memperlihatkan kemampuan sebagai inhibitor α -glukosidase dengan IC₅₀ masing-masingnya 26,2 dan 9,10 ppm. Dalam hal ini senyawa flavan-3-ol (S2) memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase lebih kuat daripada ekstrak etil asetat, namun ekstrak etil asetat dari koji sebagai standar masih lebih kuat dengan IC₅₀ sebesar 3,65 ppm. Proses yang terjadi adalah ekstrak maupun isolat 2 (S2) mampu menurunkan aktivitas enzim α -glukosidase terhadap substratnya *p-nitrofenil- α -D-*

glukopironosa, sehingga *p-nitrofenol* yang dihasilkan akan berkurang yang ditandai dengan menurunnya intensitas warna kuning. Sebaliknya terhadap isolat 1 (S1) tidak memiliki kemampuan penghambatan sama sekali, hal ini ditandai dengan nilai adsorban yang sama dengan blanko.

Kemampuan menurunkan aktivitas enzim ini diduga akibat interaksi langsung ataupun tidak langsung terhadap sisi aktif substrat-enzim. Interaksi ini dimungkinkan terkait struktur senyawa aktif flavan-3-ol (S2) maupun ekstrak fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa yang memiliki gugus fenol. Seperti yang dilaporkan oleh Sutedja (2003), bahwa adanya senyawa golongan fenol pada beberapa jenis tanaman obat tradisional Indonesia yang secara empiris digunakan sebagai obat antidiabetes dan telah diteliti memiliki aktivitas sebagai inhibitor α -glukosidase.

Besarnya aktivitas penghambatan (% inhibisi) dihitung berdasarkan persentase data absorbansi sampel dibandingkan absorbansi kontrol seperti persamaan berikut,

$$(\% \text{ inhibisi}) = [(C-S)/C] \times 100\%, \text{ dimana } S = S_1 - S_0 \quad (4.1)$$

C = Absorban kontrol

S = Absorban sampel

S₁ = Absorban sampel dengan penambahan enzim

S₀ = Absorban sampel tanpa penambahan enzim

Dari penelitian ini persentase penghambatan (% inhibisi) senyawa flavan-3-ol lebih besar ketimbang fraksinya, pada konsentrasi 25 ppm persentase penghambatan flavan-3-ol mencapai 83,4% sedangkan fraksinya masih 48%. Diduga bahwa flavan-3-ol adalah senyawa utama yang berpartisipasi sebagai inhibitor enzim α -glukosidase, sebaliknya isolat 1 yaitu turunan asam lemak tidak memperlihatkan kemampuan ini.

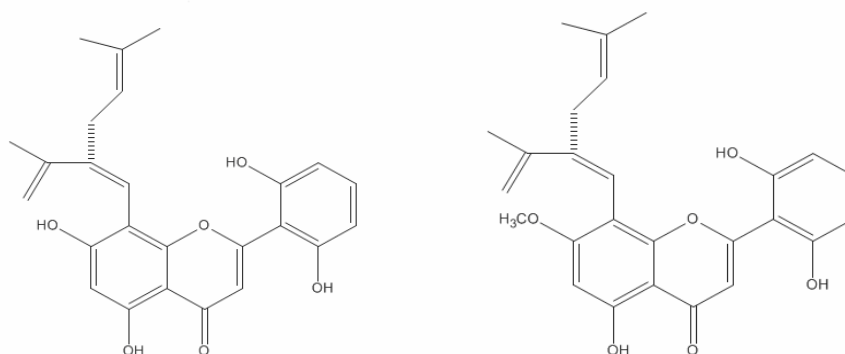
4.3.4 Uji aktivitas Antimalaria

Pengujian dilakukan secara *in vitro*, dengan menggunakan metode yang diperkenalkan oleh Trager dan Jensen (1976). Dengan uji ini dapat dilihat

aktivitas antimalaria suatu sampel dengan menganalisis penurunan pertumbuhan parasitemia. 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 dan Jensen, 1976)

Fraksi etil asetat dan senyawa flavan-3-ol yang berhasil diisolasi dari fraksi ini diuji aktivitas antimalaria secara *in vitro*. Sampel diuji dengan lima variasi konsentrasi yakni 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} M, dimana pengujian dilakukan dua kali pengulangan. Kontrol adalah parasit yang tidak diberikan sampel 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.

Hasil uji menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi senyawa flavan-3-ol tidak memperlihatkan sama sekali terjadinya aktivitas inhibisi terhadap parasit mulai dari konsentrasi uji terkecil 10^{-9} sampai konsentrasi uji terbesar 10^{-5} . Menurut Abdul Muis (2006) sejauh ini laporan tentang aktivitas antimalaria senyawa turunan flavonoid masih terbatas diantaranya senyawa 8-(1;1)-DMA-kaempferide hasil isolasi dari *K.galanga* (de Morbrison, *et al.* 2006), eksiguaflavon A dan B yang diisolasi dari *Artemisia indica* (Chanphen, *et al.* 1998). Eksiguaflavon A dan B ini sangat aktif terhadap strain *Plasmodium* yang resisten terhadap klorokuin dengan IC_{50} berturut-turut $1,08 \times 10^{-5}$ dan $1,60 \times 10^{-5}$ mg/ml.



[Sumber : Champen, *et al.* 1998]

Gambar 4.8 Eksiguaflavon A dan B

Universitas Indonesia

Demikian juga fraksi etil asetat hanya memperlihatkan aktivitas inhibisi terhadap parasit *P. falciparum* pada konsentrasi 10^{-5} sebesar 14, 29%, diduga aktivitas inhibisi ini akibat senyawa-senyawa minor yang terkandung dalam fraksi etil asetat.

Hambatan pertumbuhan parasit yang nyata diperlihatkan oleh senyawa kontrol positif yaitu klorokuin. Penurunan parasitemia sangat tajam karena klorokuin memiliki aktivitas yang sangat kuat sebagai antimalaria, dengan IC_{50} sebesar 3×10^{-9} M.

Sebagaimana laporan menyebutkan bahwa senyawa aktif antimalaria dari marga *Calophyllum* ini umumnya diperoleh dari senyawa santon (Hay, A.E, *et al.* 2004) Aktivitas antimalaria dari senyawa santon sangat dipengaruhi oleh gugus isopentenil pada posisi R1 dan R3 pada cincin aromatik (lihat **Tabel 2.3**). Dua (2004) juga melaporkan santon yang memiliki hidroksi pada C 2 memberikan aktivitas antimalaria yang potensial disebabkan oleh kemampuan santon membentuk kompleks dengan heme, sedangkan jika posisi hidroksi berada pada C 1, 4 atau 8 memiliki aktivitas antimalaria yang sangat lemah.

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).

Senyawa santon dari *C. caledonicum* memperlihatkan aktivitas antimalaria yang potensial, berdasarkan hasil uji *in vitro* yang dilakukan oleh Hay (2004). Senyawa santon tersebut adalah dimetilkalabasanton, kalothwaitesisanton dan 6-deoksi- γ -mangostin.

Marga *Garcinia* juga menunjukkan aktivitas antimalaria diantaranya santon dari tanaman *Garcinia griffithii*, didapat senyawa 1,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2,7-diprenilsanton dengan IC_{50} 7,25 μ M (Elfita. 2009).

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Dari hasil isolasi diperoleh senyawa turunan metil ester asam lemak, berupa cairan berwarna kuning dengan titik didih 173-175°C dan senyawa flavan-3-ol (5,7,2',5'-tetrahidroksi flavan-3-ol), berupa kristal berwarna coklat dengan titik leleh besar dari 300°C.
2. Pada uji BSLT terhadap kedua senyawa tersebut diperoleh LC_{50} 141,2 $\mu\text{g/mL}$ dan 154,9 $\mu\text{g/mL}$, masing-masing terhadap senyawa turunan metil ester asam lemak dan flavan-3-ol.
3. Senyawa flavan-3-ol memiliki aktivitas antioksidan dan antidiabetes, masing-masing dengan IC_{50} 5,31 $\mu\text{g/mL}$ dan 9,10 $\mu\text{g/mL}$, sebaliknya senyawa turunan metil ester asam lemak tidak aktif sama sekali.
4. Uji antimalaria menunjukkan tidak adanya efek antimalaria dari kedua senyawa tersebut.

5.2 SARAN

1. Senyawa flavan-3-ol memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, disarankan agar dilanjutkan terhadap uji aktivitas biologi lain yang searah seperti uji antihiperlipidemia.
2. Perlunya mengisolasi kandungan kimia fraksi *n*-heksana dan *n*-butanol untuk mendapatkan senyawa aktif lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. (1997). *Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: Andi. 27-35
- Alam, G., (2002). *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Sebagai Bioassay dalam Isolasi Senyawa Bioaktif dari Bahan Alam*. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 6 (2). 432-435
- Anonim. (1997). *Tumbuhan Hutan Tropik Sebagai Sumber Bahan Kimia*. Bogor : Puslitbang Biologi LIPI. 5-11
- Anonim. (2008). 2,2'-Diphenylpicrylhydrazyl. *ChemIndustry.com*. CAS Number: 56537-16-7. 1-2.
- Apak, R., *et al.* (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assay Applied to Phenolic Compounds with the CUPPRAC Assay. *Molecules*. 1496-1545.
- Asano, N., *et al.* (2000) In vitro inhibition and intracellular enhancement of lysosomal α -galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonijirimycin and its derivatives. *Eur. Journal Biochemistry*, 267, 4179-4186.
- Backer and Bakhuizen Van den Brink. (1963). *Flora of Java, Vol I*, N. V. P. Noordhoof of-Goningen-The Netherlands
- Basuki, T., *et al.* (2002). *Evaluasi aktivitas daya hambat enzim α -glukosidase dari ekstrak kulit batang, daun, bunga dan buah kemuning [Murraya paniculata (L.) Jack.]*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXI. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Surabaya.
- Billia A.R., Morelli I., Hamburger M., and Hostettman K. (1996). Flavan and A-Type proantocyanidins from *Prunus prostate*. *Phytochemistry*, 43 (4), 887-892
- Cao, S-G., *et al.* (1998). Coumarins from *Calophyllum teysmannii*. *Phytochemistry*. 47: Issue 5. 773-777.
- 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.

- Chanphen, R., *et al.* (1998). Antimalarial principles from *Artemisia indica*, *Journal of Natural Product*, **61**, 1146-1146
- Christine. (1985). *Penggunaan Tanaman Obat*. Jakarta : Penerbit Buletin Farmakon
- Ciulei, I. (1984). *Methodology for Analysis of Vegetable Drugs*, Bucharest-Rumania: Chemical Industries Branch Division-Industrial Operation UNIDO. 11-23.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*, Padang : Andalas University Press
- De Morbrison, F., *et al.* (2006). In vitro antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilybin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide. *Acta Tropical*. **97**, 102-107
- Dewi, R.T., *et al.* (2007). Inhibitory effect of Koji *Aspergillus terreus* on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Pakistan Journal of Biological Science*, **18**, 3131-3135
- Dharmaratne, H. R. W., Sotheeswaran, S., and Balasubramaniam, S. (1984). Triterpenes and neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochemistry*. **23**: Issue 11. 2601- 2603.
- Dharmaratne, *et al.* (1986), Xanthenes from roots of three *Calophyllum* species. *Phytochemistry*, Vol **25**. 1957-1959
- Dharmaratne, Wanigasekera. (1995). Xanthenes from root bark of *Calophyllum thwaitesii*. *Phytochemistry*. **47**. 240-250.
- Dharmaratne, Wijesinghe. (1997). A Trioxygenated diprenylated chromenxanthone from *Calophyllum moonii*. *Phytochemistry*. **46**. No 7. 1293-1295.
- Dharmaratne, Wijesinghe, Thevanasem. (1999). Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum spesies*, against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, **66**. 339-342.
- Dua, V.K., *et al.* (2004). Anti-malarial activity of some xanthenes senyawa murnied from the roots of *Andrographis paniculata*. *Journal of Ethonopharmacology*, **95**. 247-251.

- Elfita, E., *et al.* (2009). Antiplasmodial and other constituents from four Indonesian *Garcinia spp.* *Phytochemistry*. **70**. 907 – 912.
- Hay, A.E., *et al.* (2004). Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia viellardii*. *Journal Life Sciences*
- Ghisalberti, E.L. (1993). *Detection and Isolation of Bioactive Natural Product, Bioactive Natural Products; Detection, Isolation, and Structural Determination*, (Ed. Steven M. Collegate and Russell J. Molyneux, CRC). London : 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.
- Gupta, M., Mazumder, U.K. and Gomathi, P. (2007). Research Article In vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Galega purpurea* Root, *Phcog Mag.* 3(**12**). 219-225
- Harbone, J.B. (1987). “Metode Fitokimia”. (Ed II.). (Diterjemahkan Oleh Kosasih Patmawinata dan Iwang Sudiro,). Bandung: ITB.
- Hartati, S. (2007). Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia Serta Uji Aktivitas Biologi Kulit Batang Spesies *Garcinia spp.* Depok : FMIPA UI
- Hay, A.E., *et al.* (2004). Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*, *Life Sciences*, **75**. 3077-3085.
- Heyne. (1987). *Tumbuhan berguna Indonesia*, Jilid III. Jakarta : Cetakan ke 1, Badan Litbang Kehutanan Jakarta. Departemen Kehutanan. Gatot Subroto. 1374-1380.
- Houghton, P. J and Amala R. (1998). *Laboratory Handbook for The Fractination of Natural Extracts*. London : Chapman & Hall
- http://www.asianplant.net/Clusiaceae/Calophyllum_macrocarpum.htm
- Husain, R.A., and Peter, G.W. (1982). Lactone, Flavonoids and Benzophenone from *Garcinia conrouna* and *Garcinia moonii*. *Phytochemistry*. 21,**(6)**, 1393-1396
- Ignatushenko M.V., *et al.* (1997). Xanthenes as antimalarial agents; studies of possible mode of action. *FEBS Letter*, **409**. 67-73.

- Irwin, D.C.W.S. (1998). Malaria parasite biology pathogenesis and protection. *American Society for Microbiology*. Washington : ASM Press
- 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 Letter*, **40**. 3777-3780.
- Itoigawa, M., C, *et al.* (2001). Cancer chemopreventive agents, 4-prenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Cancer Letter*, **169**. 15-19
- Ito, T., *et al.* (2003). Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. *Journal of Natural Product*, **66**. 368-371.
- Jamilah. (2008). Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia & Uji Aktivitas Biologi Kulit Batang Marga *Calophyllum spp.* Depok : FMIPA UI
- Kijjoa, *et al.* (2000). Xanthone from *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*. *Phytochemistry*. **55**, 833-836.
- Kirk, *et al.* (1999). Calanone, a novel coumarin from *Calophyllum teysmannii*. *Tetrahedron Letter*. Vol **35**. No 32, 5821-5824
- Koolman, J., Roehm, K.J. (2005). *Color Atlas of Biochemistry* (2nd ed.). New York : Thieme.
- Lee, T.H., Liu, D.Z., Hsu, F.L., Wu, W.C., and Hou, W.C. (2006). Structure-activity Relationship of Five Myricetin Galloglycosides from Leaves of *Acacia confuse*. *Botanical Studies*. 47: 37-43.
- Leslie, *et al.* (1994). Terpenoid and biflavonoid constituents of mammea type coumarins from *Calophyllum calaba* and *Garcinia spicata*. *Phytochemistry*. Vol **23**. No 2, 323-328
- Inuma, M., *et al.* (1996). Six xanthenes from *Calophyllum austroindicum*. *Phytochemistry*. **43**. 681-685
- Inuma, M., *et al.* (1997). Prenylated xanthenoids from *Calophyllum apetalum*. *Phytochemistry*. **46**. 1423-1429.
- Inuma, *et al.* (1994). Two xanthenes from root bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. **35**. 527-532.

- Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas, M.B. (1970). *The Systematic identification of flavonoids*. New York : Springer Verlag
- Meyer, *et al.* (1982). "Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents", *Journal of Medical Plant Research Planta Medica* USA. 31-34
- Muis, A., (2006). Aktivitas antimalaria senyawa dari tumbuhan yang secara tradisional digunakan sebagai Antimalaria. Bandung : UNPAD
- Packer, L.M., Hiramatsu, T., Yoshikawa. (1999). *Antioxidant Food Supplement in Human Health*, Academic Press
- Perrin, D.D., W.L.F. Armarego, and D.R. Perrin. (1980). *Purification of Laboratory Chemicals*, (2nd Ed.). New York : Pergamon Press
- Ratnayake, *et al.* (1986). Two chemically distinct groups of *Calophyllum* species from Sri Langka. *Phytochemistry*. Vol **25**. 425-428
- Rayes-Chilpa, *et al.* (2004). Cytotoxic effect of mammea type coumarins from *Calophyllum brasillense*. *Life Science*. Vol **75**. 1635-1647
- Revelonjato, Kunecs and Poison. (1987). Neoflavonoids from the stem bark of *Calophyllum verticillatum*. *Phytochemistry*. **26**. 2973-2976
- Riswiyato, *et al.* (2006). Studi isolasi dan uji aktivitas antioksidan pada rimpang kunyit *Curcuma longa*. *Sains Indonesia* Vol.**11**, No.1: 24-31
- Rob, R., *et al.* (2001). Malaria drug development. Report from a symposium at the 2001. *ASS Annual Meeting*, Sanfransisco
- Sastrohamijojo, H. (1992). *Spektroskopi*. Yogyakarta: Penerbit Liberty
- Shiner, R., *et al.* (1980). *The Systematic Identification of Organic Compounds*. (6th edition). New York : John Wiley and Sons.
- Simanjuntak, P. (2003). *Strategi Pencarian Senyawa Bioaktif Baru dari Sumber Bahan Alami Tumbuhan*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Jakarta : Fak. Farmasi, Universitas Pancasila. Vol **1**. 19-23
- Simes, J.J.H., *et al.* (1995). *An Australian Phytochemical Survey*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia

- Soerjanegara and Lemmens, R.H.M.J. (1994). Plant Resources of Sout-East Asia 5. *Prosea*, Bogor: Pudoc. 114-138
- Steven, P.F. (1998). *Calophyllum* asli Indonesia
<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/37579/0>
- Sutedja, L. (2003). Bioprospektif Tumbuhan Obat Indonesia Sebagai Sedian Fitofarmaka Antidiabetes. Laporan Kemajuan Tahap II Riset Unggulan Terpadu. Pusat Penelitian Kimia-LIPI
- Szabo, R.M. *et al.* (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chem. Pap.* 61 (3)214-216
- Taher, *et al.* (2005). A polyisoprenylated ketine from *Calophyllum enervosum*. *Phytochemistry*. **66**, 723-726
- Trager, W., and Jensen, J.B. (1976). Human malaria parasites in continous culture. *Science*. **193**. 673 - 676.
- Welvaart, *et al.* (1999). *Onkology*. Edisi V. Panitia kanker RSUP DR.Sardjito Yogyakarta. 218-231
- White N.J., Plorde J.J. (1991). Malaria : Harrison's Principles Of Internal Medicine (12 th. Edition). Mc Grawhill Inc. 782 – 788
- Yimdjo, M. C., *et al.* (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. **65**. 2789-2795
- Zulkarnaen. (1996). Malaria : Ilmu Penyakit Dalam, jilid I. (Edisi III). Jakarta : Balai Penerbit FK UI

Lampiran 1. Hasil Determinasi *Calophyllum macrophyllum* Scheff



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

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

Cibinong, 2 Juni 2009

Nomor : 93 /IPH.1.02/If.8/VI/2009
 Lampiran : -
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Jamilah
 Komplek Batam Indah
 Blok E No. II
 Serpong 15314


Dengan hormat,

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

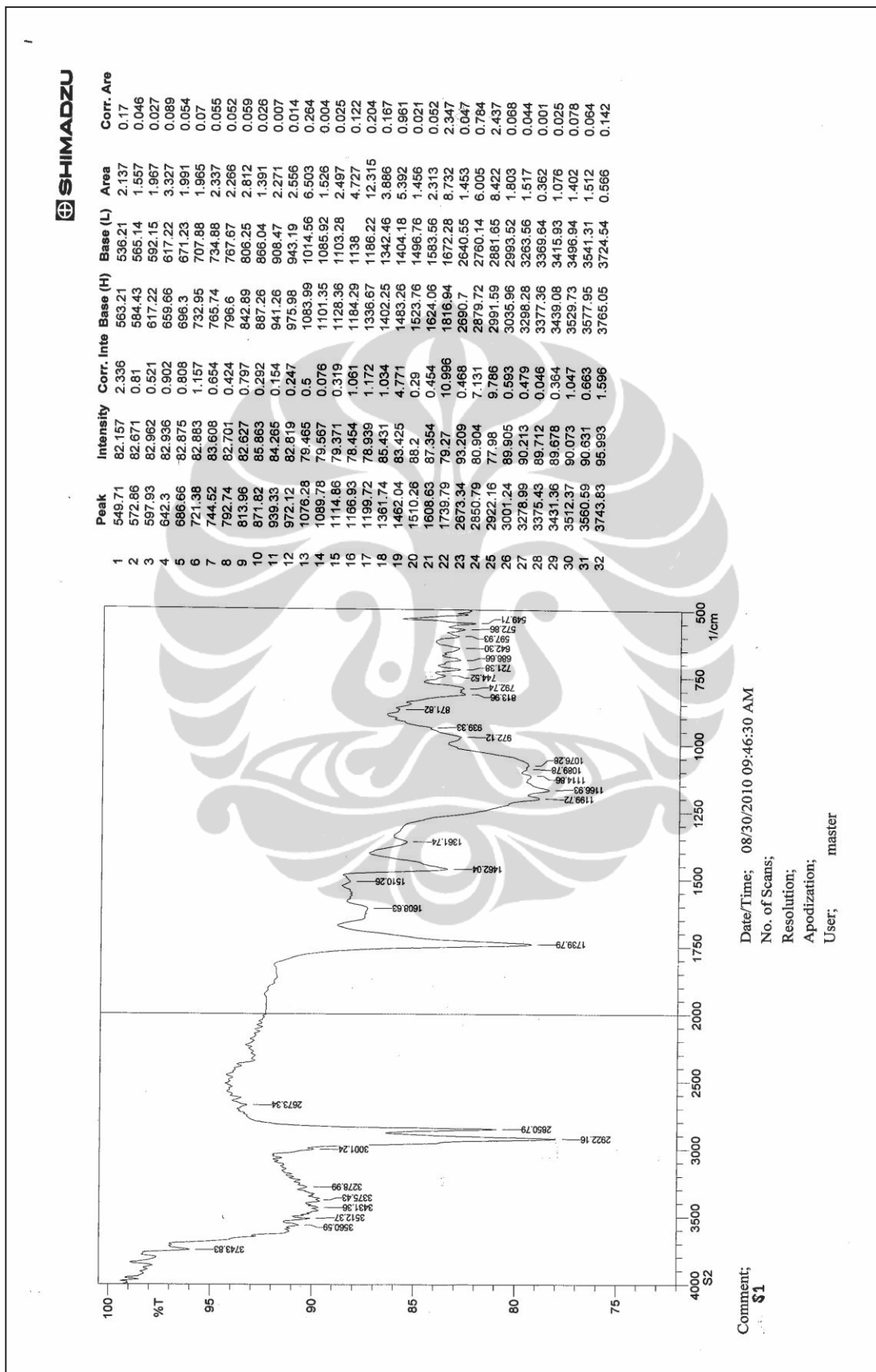
No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	-	<i>Calophyllum macrophyllum</i> Scheff.	Clusiaceae

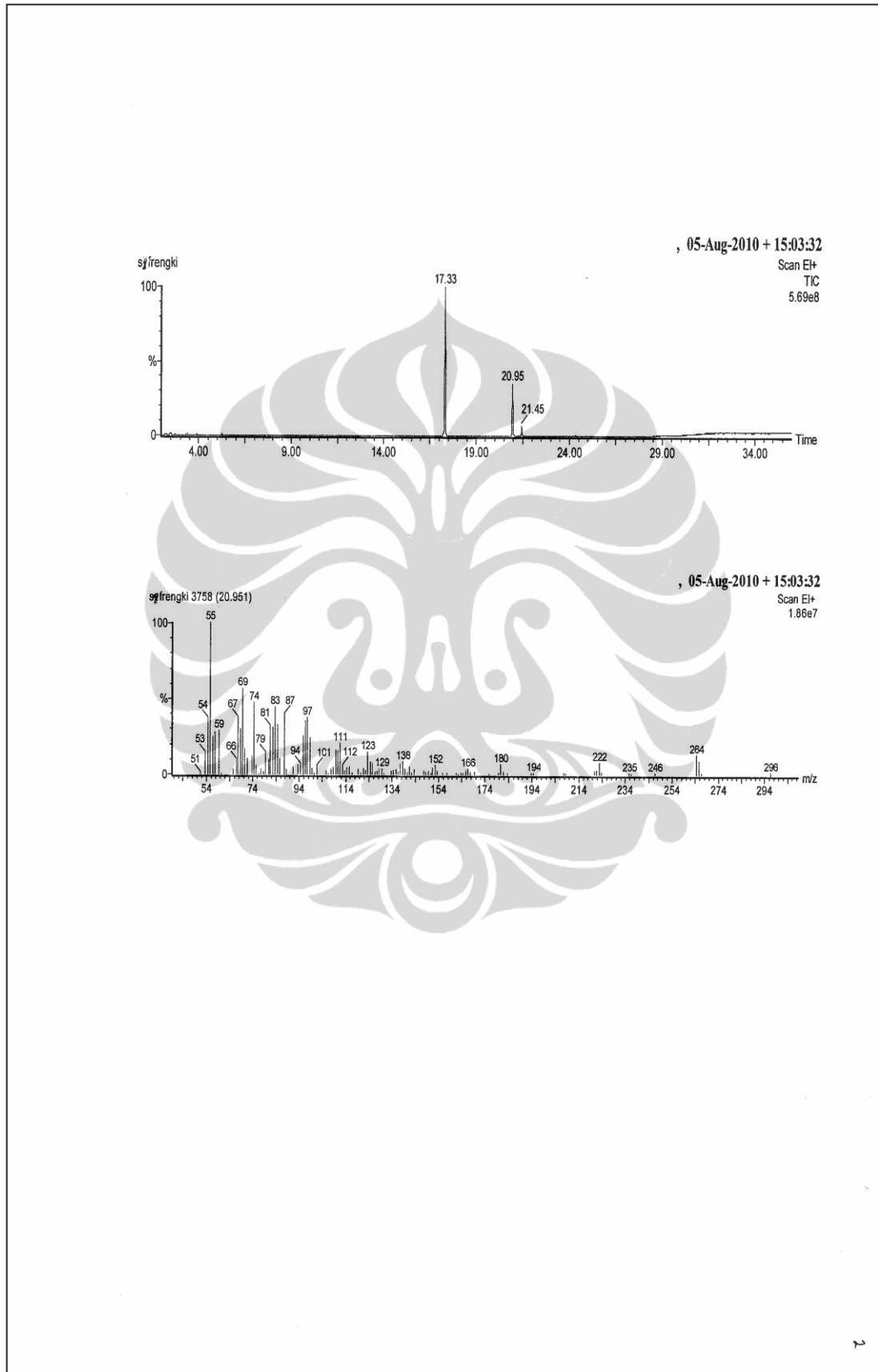
Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

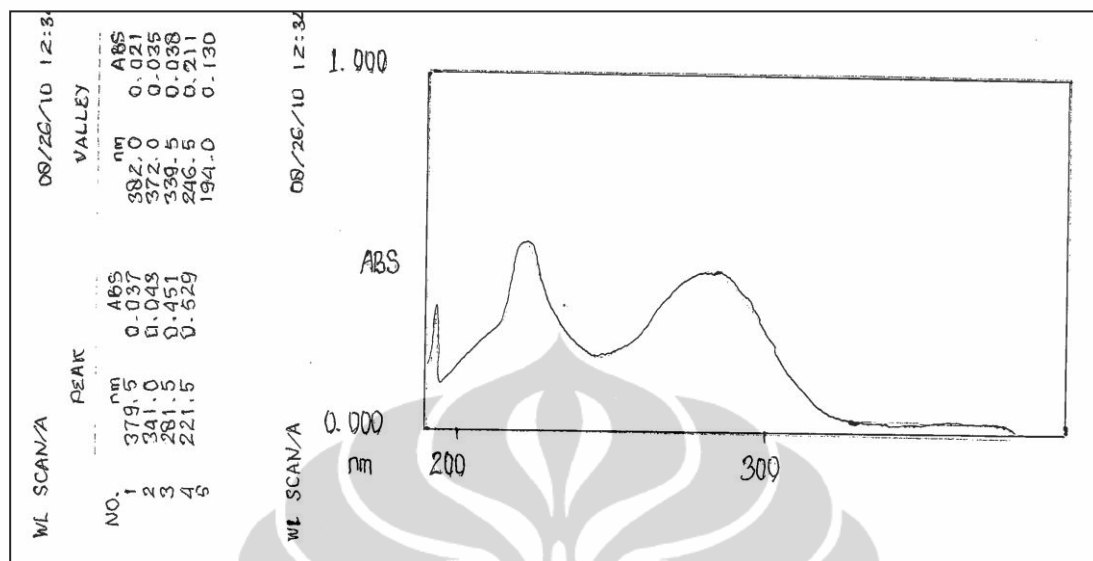
Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,


 Prof. Dr. Eko Baroto Walujo
 NIP. 195111041975011001

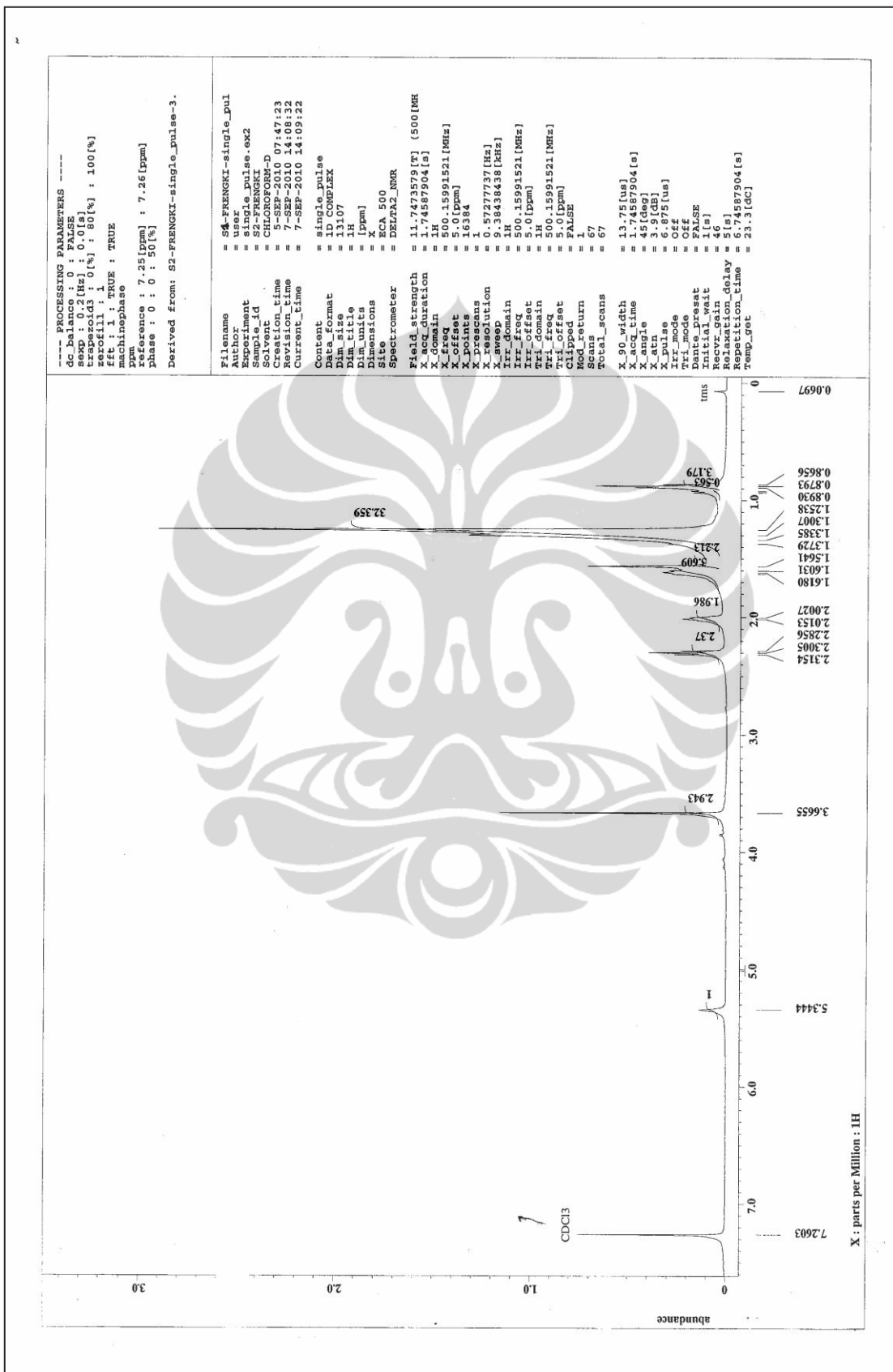
Lampiran 2. Spektrum Infra Merah senyawa turunan metil ester asam lemak (S1)



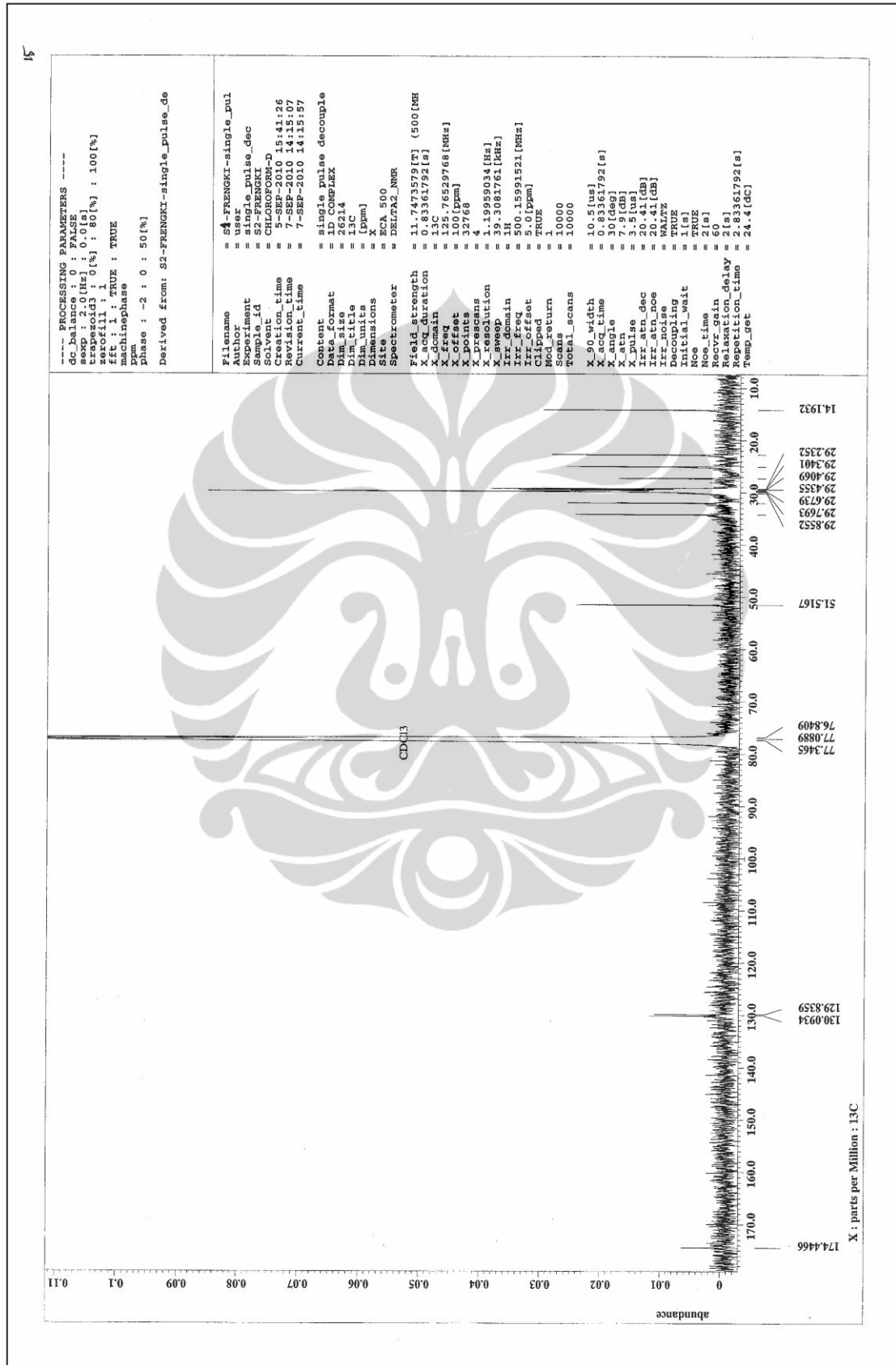
Lampiran 3. Spektrum GC-MS senyawa turunan metil ester asam lemak (S1)

Lampiran 4. Spektrum UV-Vis senyawa turunan metil ester asam lemak (S1)

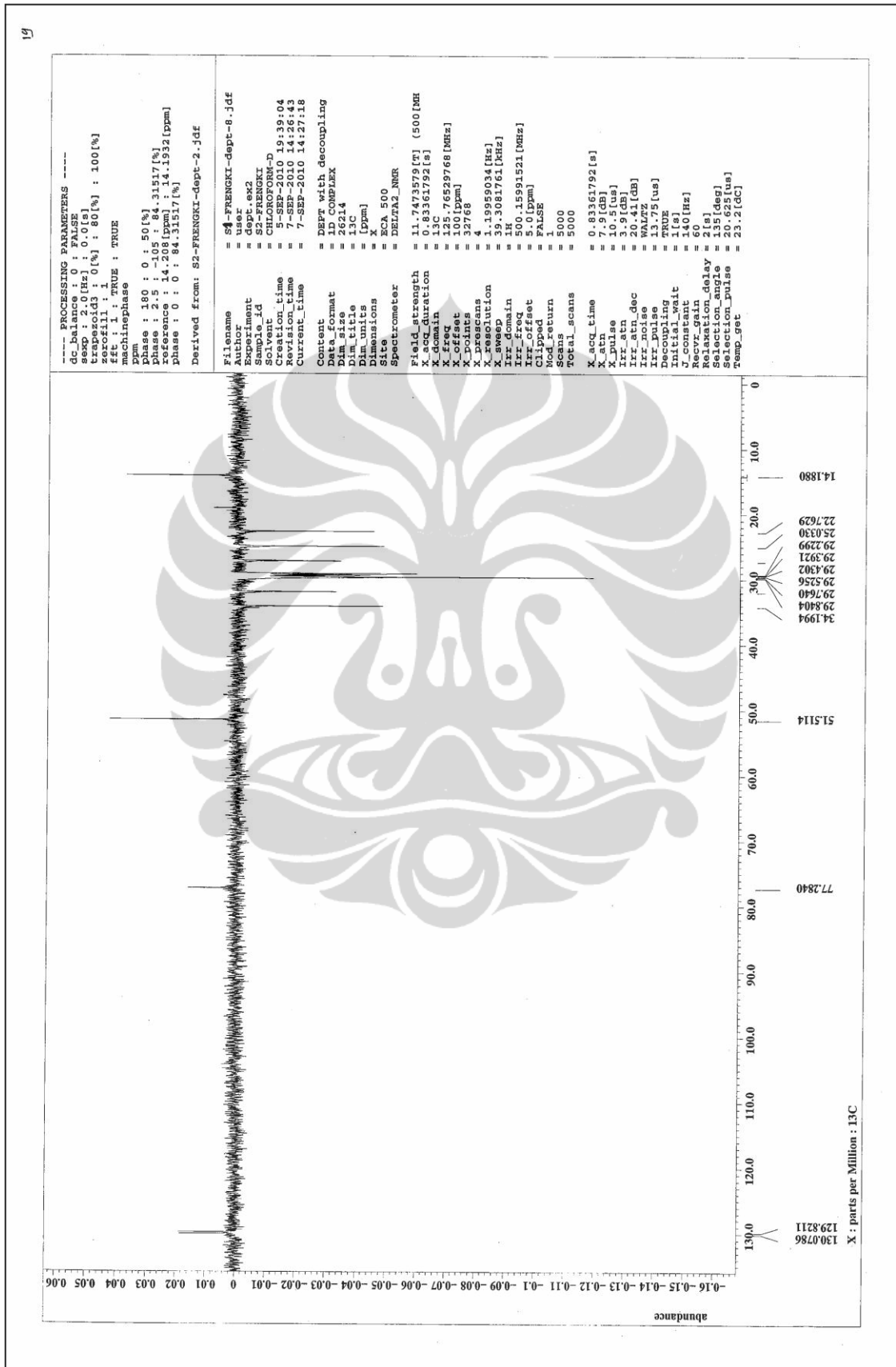
Lampiran 5. Spektrum ¹H-NMR turunan metil ester asam lemak (S1)



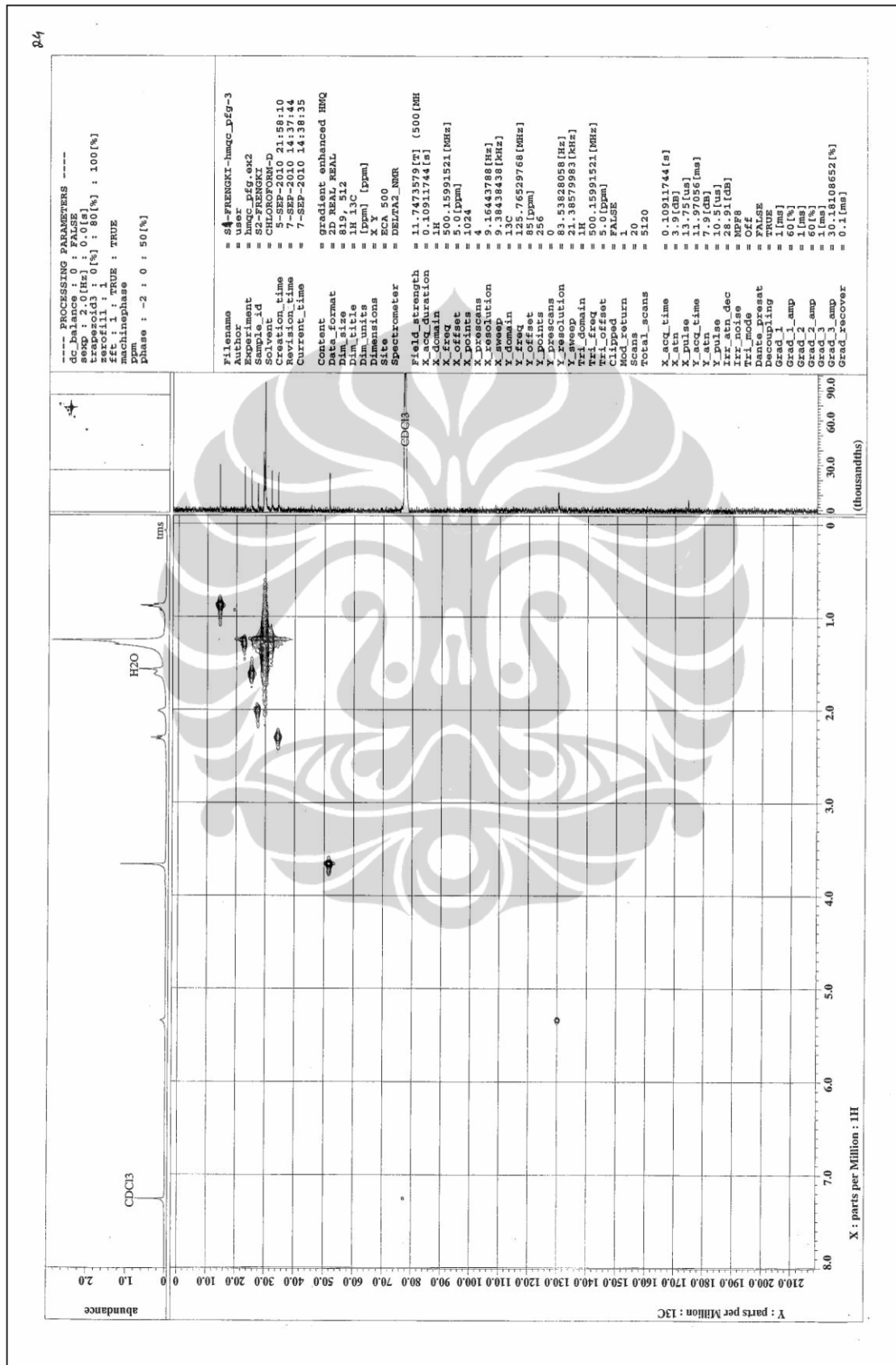
Lampiran 6. Spektrum ¹³C NMR turunan metil ester asam lemak (S1)



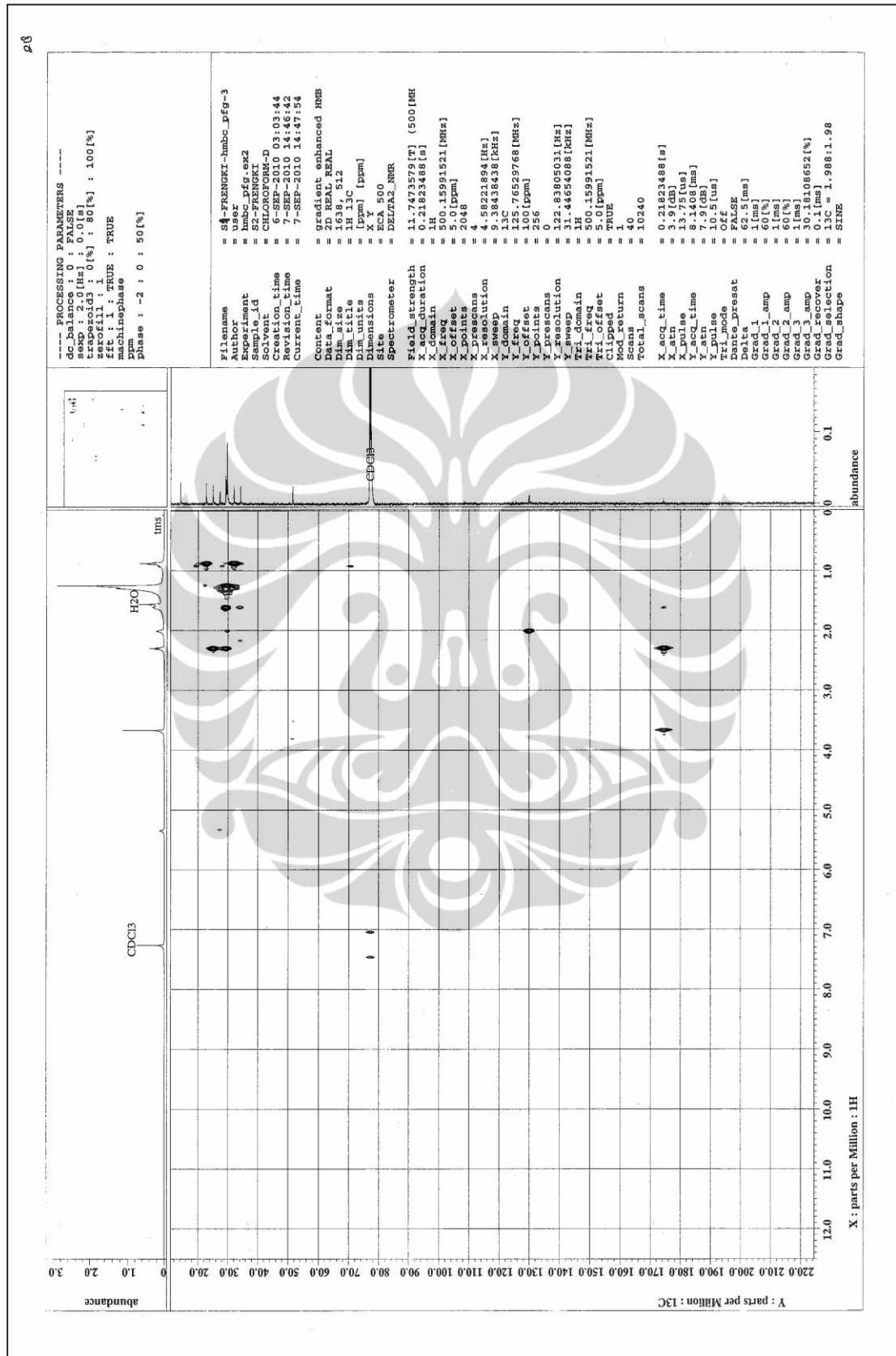
Lampiran 7. Spektrum DEPT turunan metil ester asam lemak



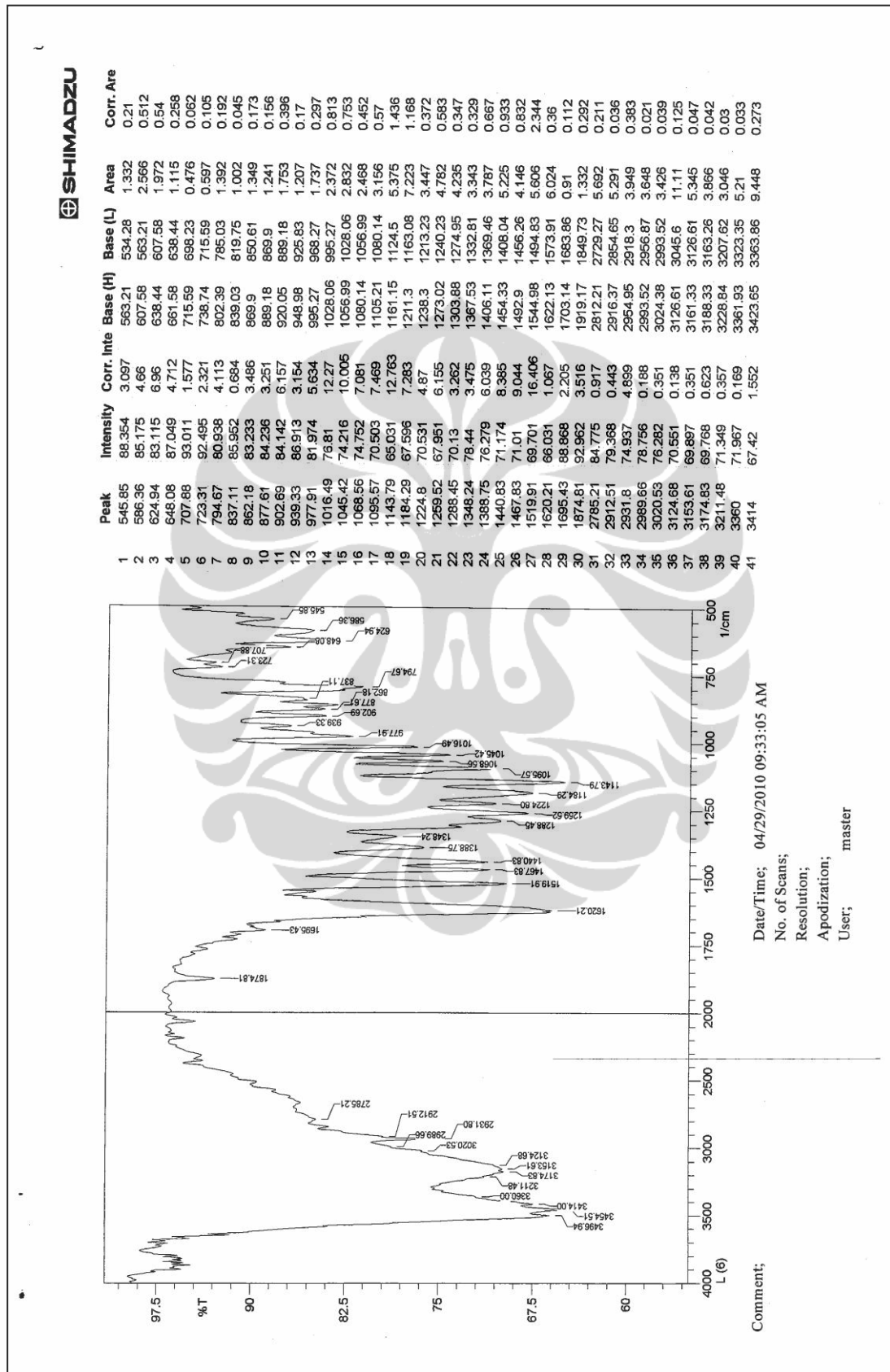
Lampiran 9. Spektrum HMQC turunan metil ester asam lemak (S1)



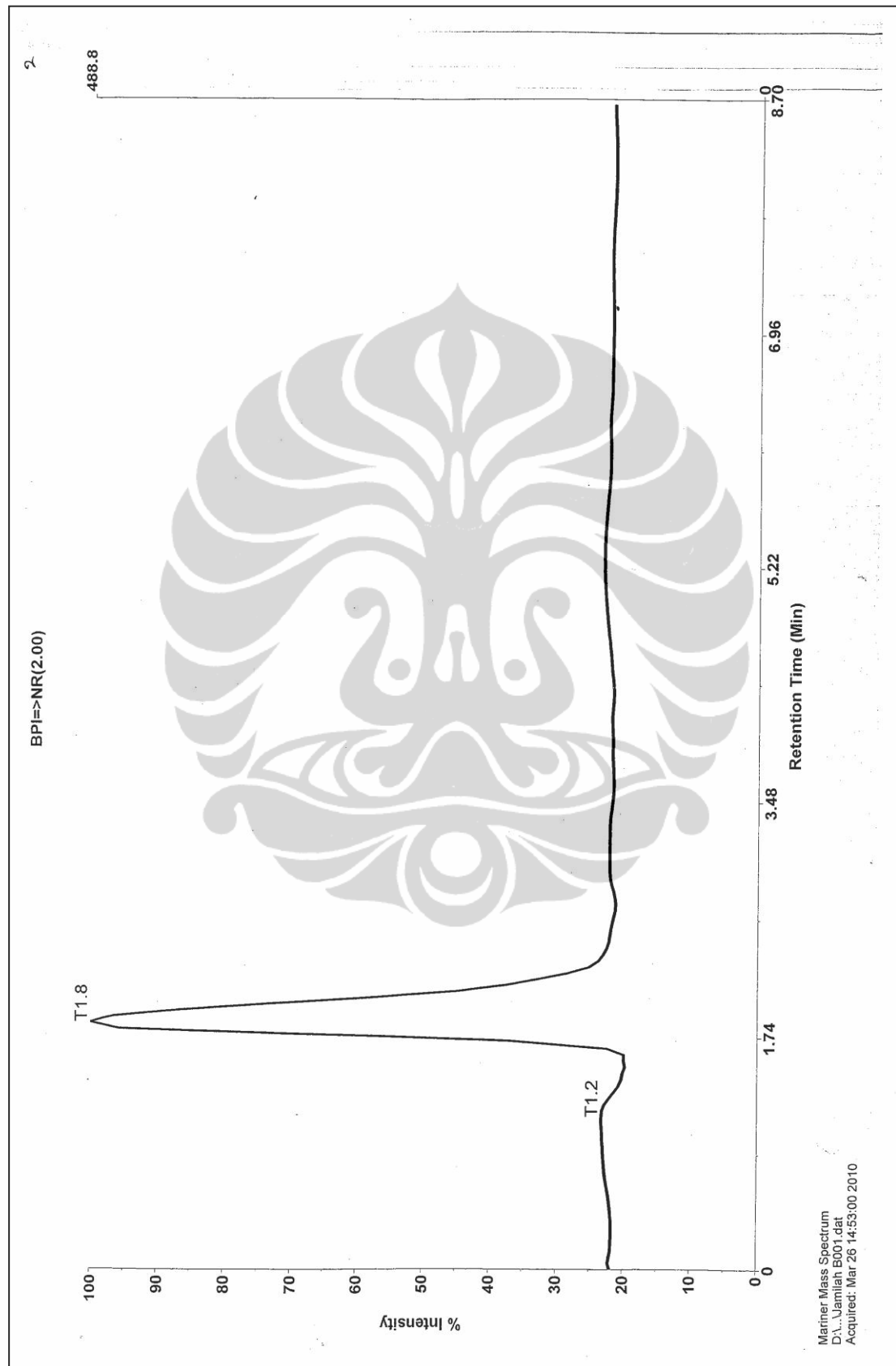
Lampiran 10. Spektrum HMBC turunan metil ester asam lemak (S1)



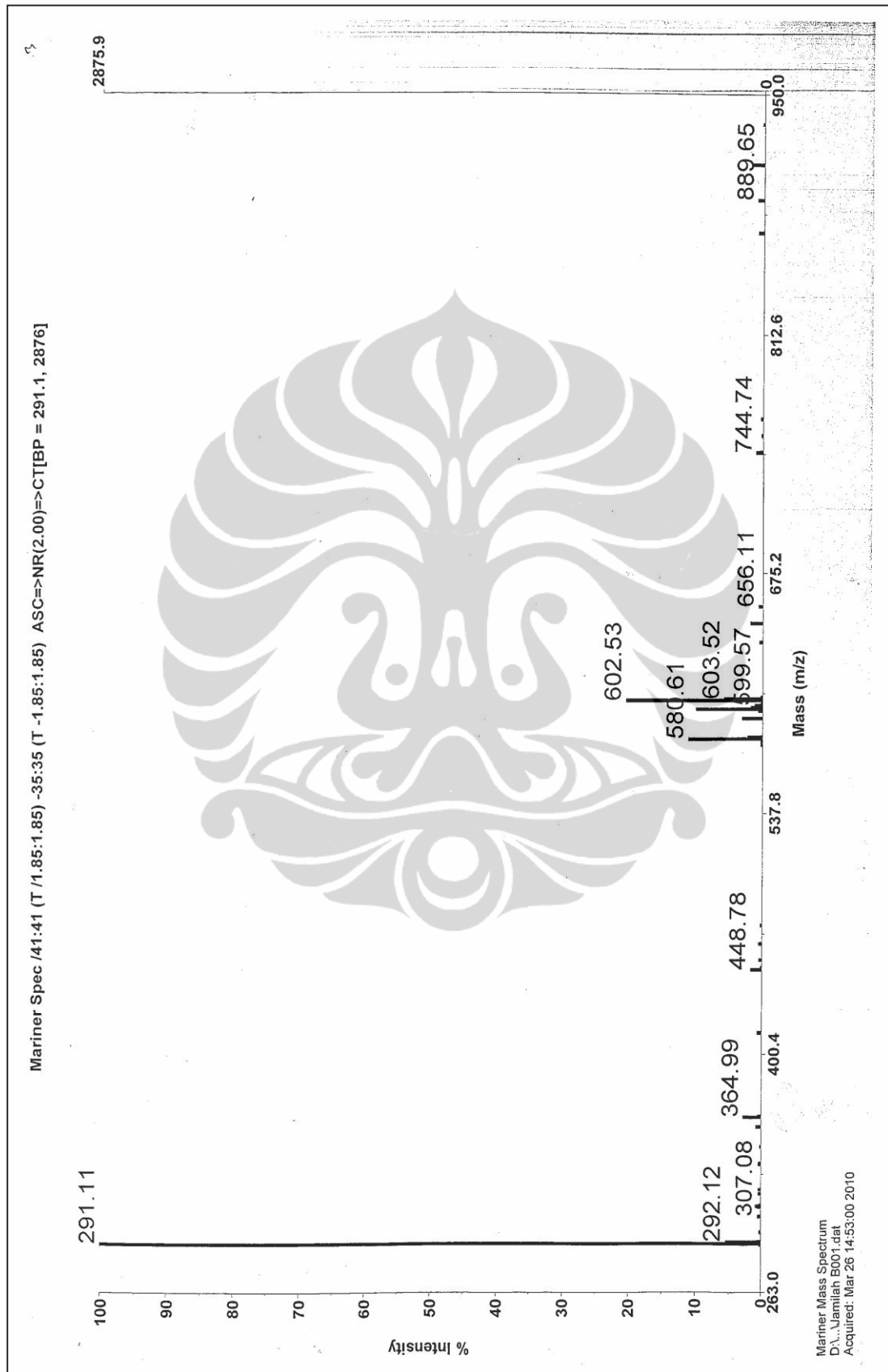
Lampiran 11. Spektrum Infra Merah senyawa flavan-3-ol (S2)

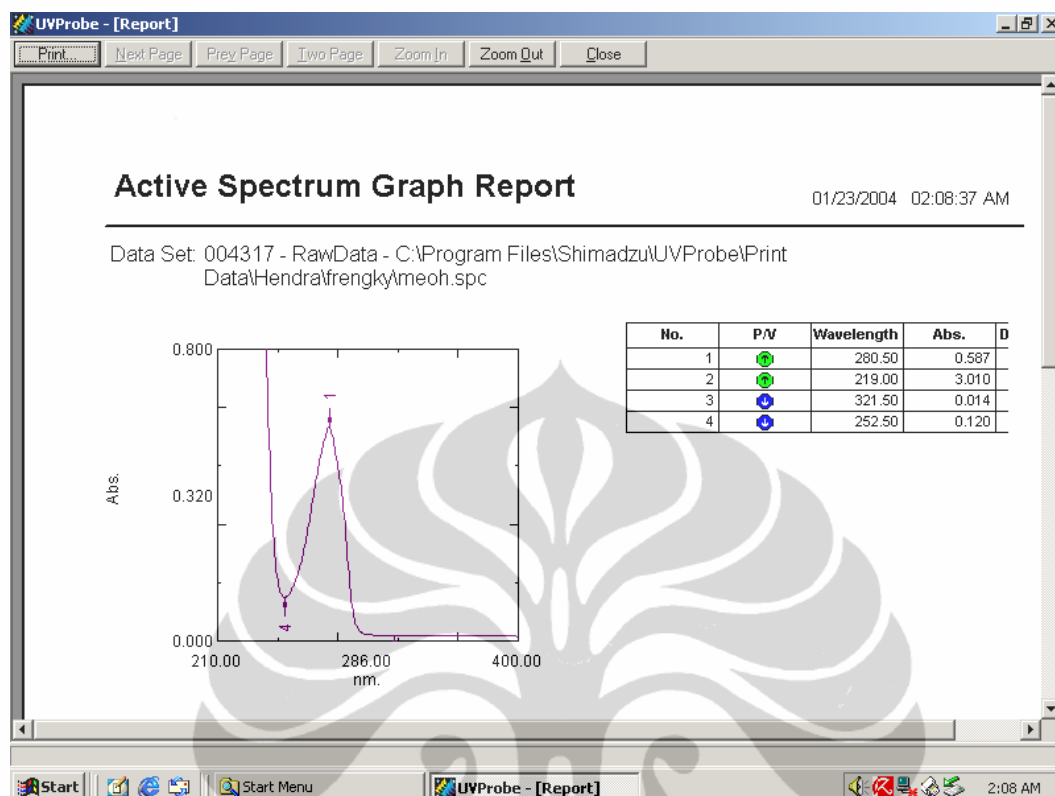


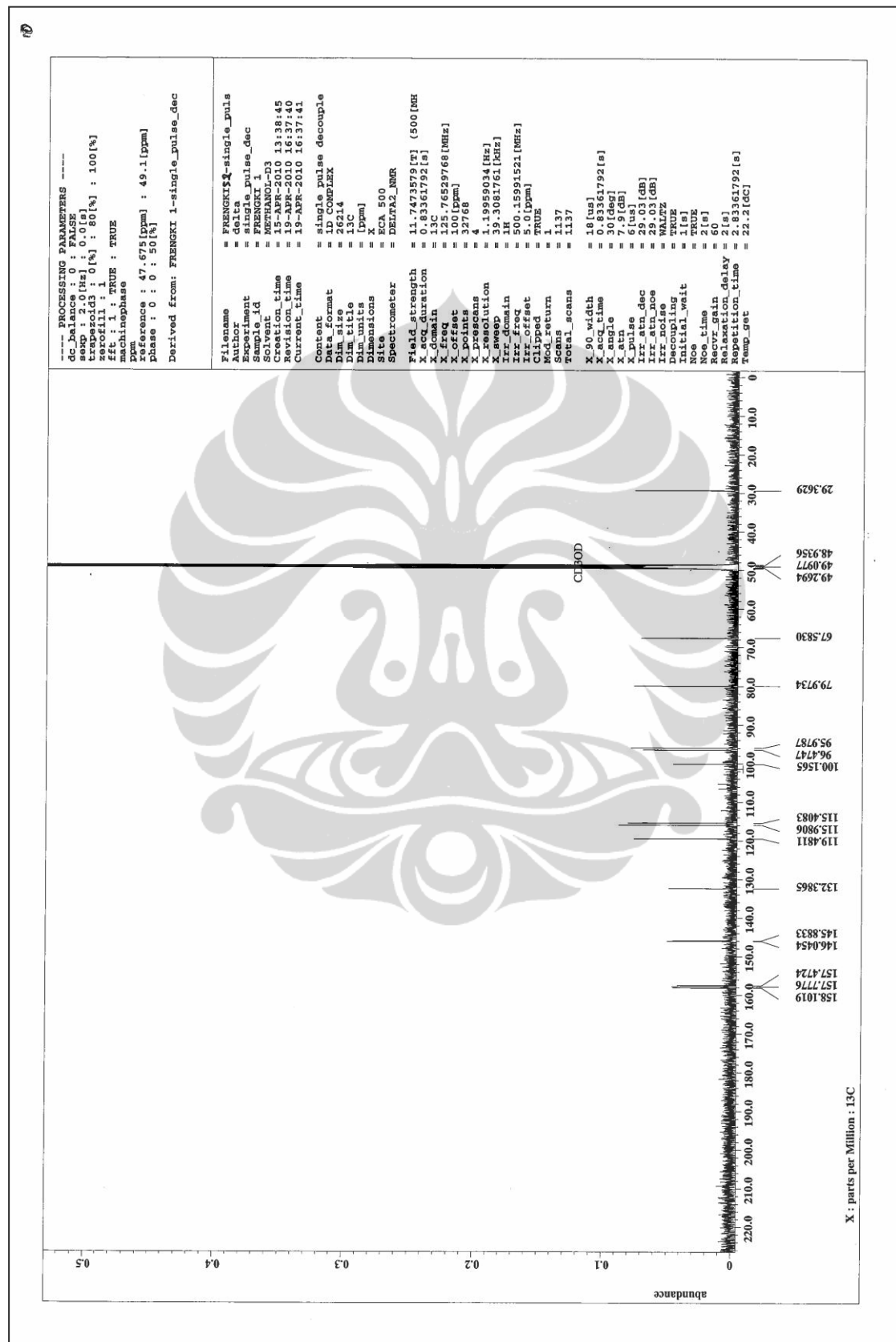
Lampiran 12. Spektrum LC-MS senyawa flavan-3-ol (S2)



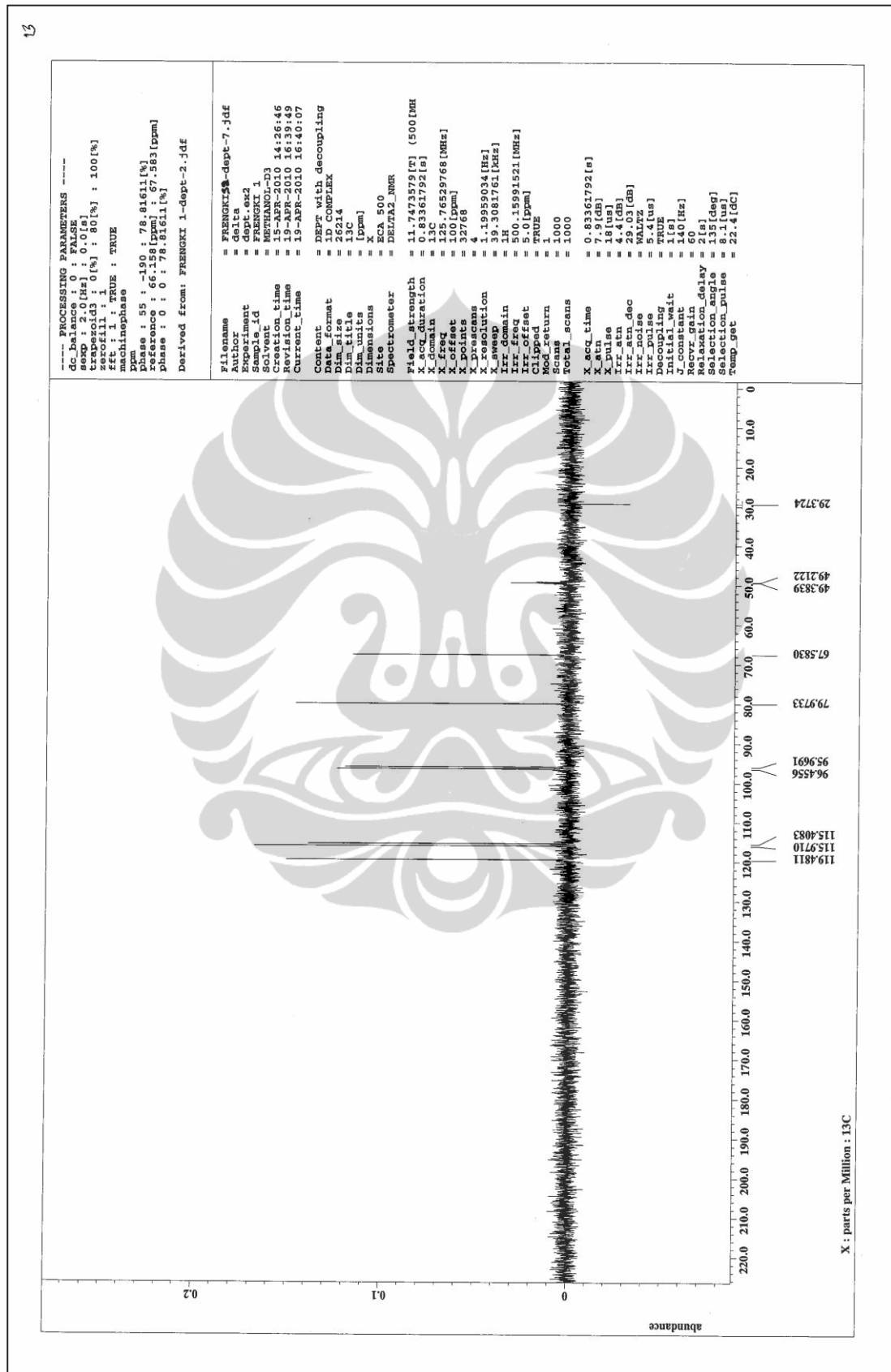
Lanjutan...

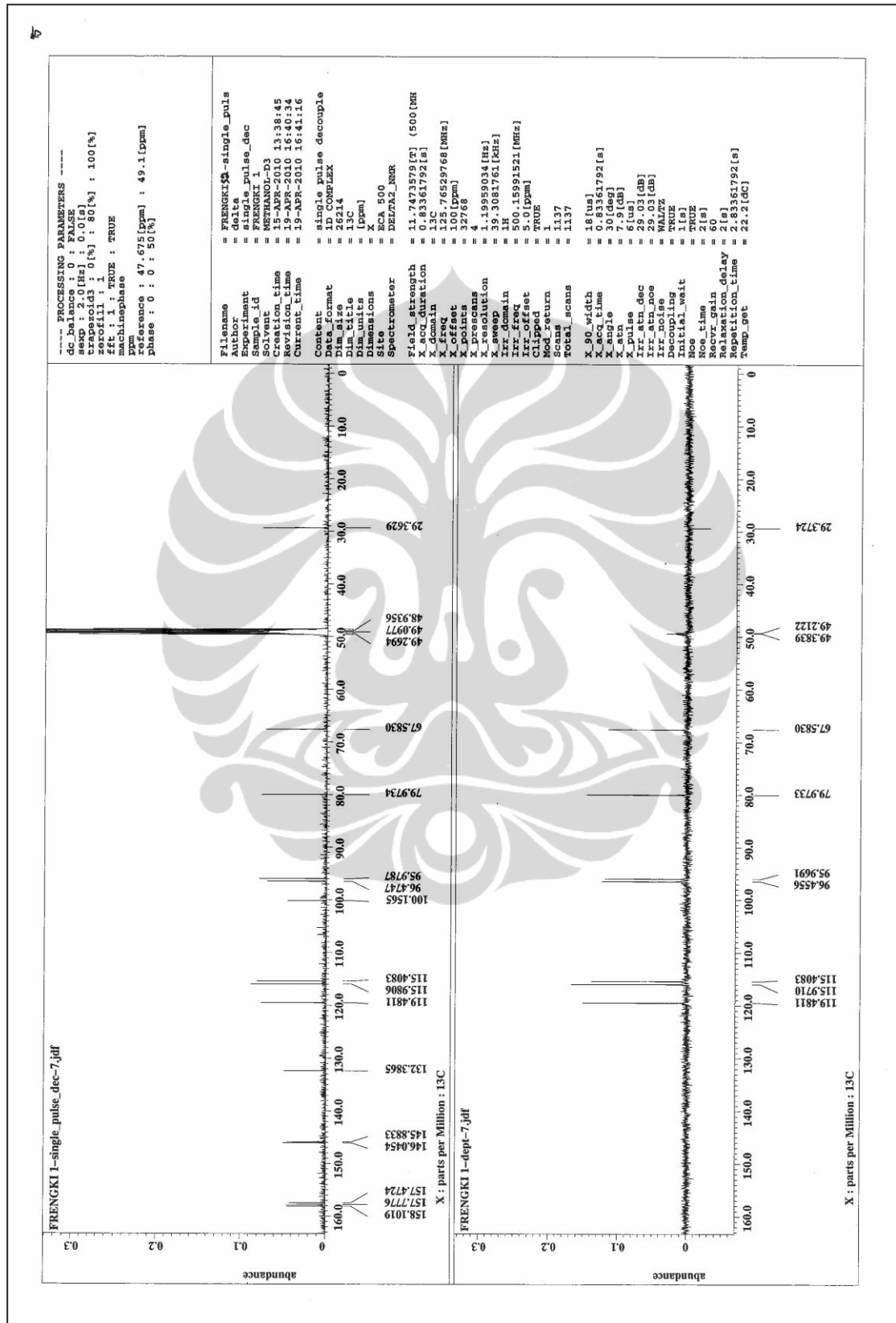


Lampiran 13. Spektrum UV-Vis senyawa flavan-3-ol (S2)

Lampiran 15. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa flavan-3-ol (S2)

Lampiran 16. DEPT senyawa flavan-3-ol (S2)



Lampiran 17. Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT senyawa flavan-3-ol (S2)

Lampiran 18. Spektrum HMQC senyawa flavan-3-ol (S2)

