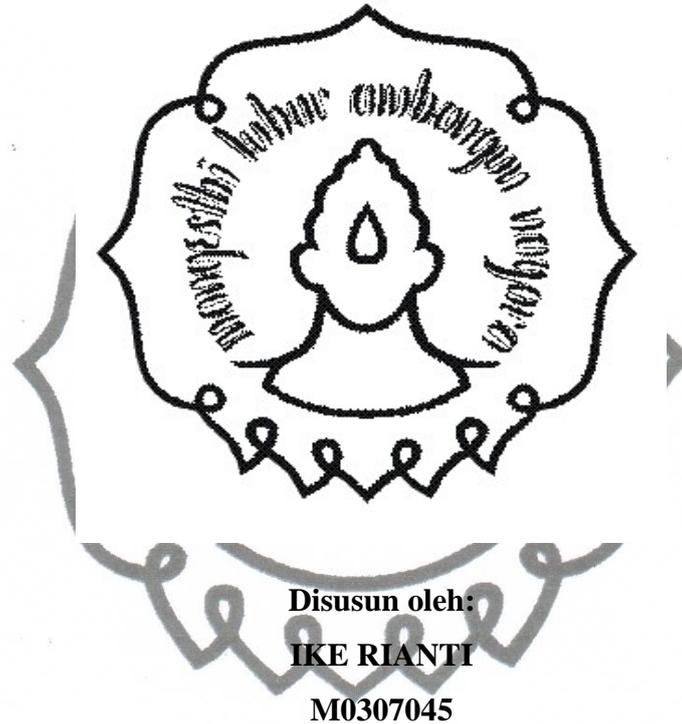


Proposal Skripsi

**ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA KIMIA DARI DAUN
SLATRI (*Calophyllum soulattri* Burm. f)**



SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi sebagian
persyaratan mendapatkan gelar Sarjana Sains Kimia**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA**

2011

commit to user

PERSETUJUAN

Proposal Skripsi Mahasiswa:

Ike Rianti

M0307045

Dengan Judul

**ISOLASI DAN ELUSIDASI STRUKTUR SENYAWA KIMIA BAHAN
ALAM DARI DAUN SLATRI
(*Calophyllum soulattri* Burm. f)**

Disetujui oleh Pembimbing untuk Dikerjakan

Surakarta, 6 September 2011

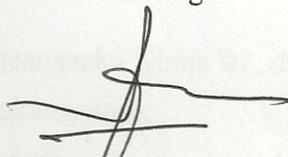
Pembimbing I



M. Widyo Wartonno, M.Si

NIP. 19760822 200501 1001

Pembimbing II

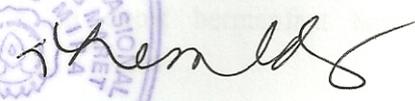
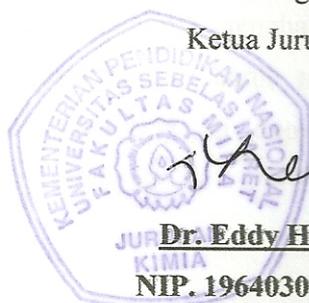


Dr. rer. nat. Fajar Rakhman Wibowo, M.Si

NIP. 19730605 200003 1001

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia



Dr. Eddy Herald, M.Si

NIP. 19640305 200003 1002

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala Puji hanya milik Allah SWT Dzat Pencipta alam semesta yang telah memberikan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini dengan baik untuk memenuhi sebagian persyaratan guna mencapai gelar Sarjana Sains dari Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari banyak pihak, penulisan dan penyusunan skripsi ini tidak akan dapat berjalan dengan lancar.

Dalam kesempatan ini perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah memberikan dukungan, bantuan, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis tujukan kepada:

1. Bapak Dr. Eddy Heraldy, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA UNS.
2. Bapak M. Widyono Wartono, M.Si, selaku Pembimbing I atas arahan dan bimbingannya dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Rer. Nat. Fajar RW, M.Si selaku Pembimbing II atas arahan dan bimbingannya dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Sahabat - sahabatku, Semua teman seperjuanganku Kimia '07, dan adik - adik kimia '08, '09 dan '10 terima kasih atas dukungannya.
5. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan serta penyusunan proposal skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa proposal skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis senantiasa mengharapkan saran dan kritik yang membangun sebagai bahan pertimbangan untuk membuat karya yang lebih baik. Penulis berharap semoga proposal ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan yang telah ada.

Surakarta, 6 September 2011

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	iv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Perumusan Masalah	2
1. Identifikasi Masalah	2
2. Batasan Masalah.....	3
3. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II LANDASAN TEORI	
A. Tinjauan Pustaka	5
1. Tumbuhan Genus Calophyllum.....	5
2. Tumbuhan Slati (Calophyllum soulattri)	7
a) Deskripsi tumbuhan	7
b) Manfaat tumbuhan	9
c) Kandungan kimia tumbuhan	9
3. Metode Isolasi Senyawa Bahan Alam	14
4. Metode Pemurnian Senyawa	15
B. Kerangka Pemikiran	19
C. Hipotesis	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	20
A. Metode Penelitian	20
B. Tempat dan Waktu Penelitian	20
C. Alat dan Bahan	20
1. Alat-alat yang digunakan	20
2. Bahan-bahan yang digunakan	21

D. Prosedur Penelitian 21

 1. Determinasi Calophyllum soulattri 21

 2. Persiapan Sampel Daun Calophyllum soulattri 21

 3. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Daun Calophyllum soulattri22

 a) Ekstraksi sampel daun Calophyllum soulattri 22

 b) Kromatografi 22

E. Bagan Alir Cara Kerja 22

F. Teknik Analisis Data 23

DAFTAR PUSTAKA 24



BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Keanekaragaman flora hayati merupakan kekayaan alam yang dimiliki Indonesia. Potensi alam tersebut dapat dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional. Penelitian kandungan kimia tumbuhan yang bermanfaat untuk pengobatan dapat berasal dari berbagai macam spesies tumbuhan. Salah satunya adalah tumbuhan dari famili Clusiaceae dari genus *Calophyllum*. Tumbuhan dari genus *Calophyllum* yang cukup banyak jenisnya dapat dimanfaatkan untuk keperluan pengobatan antara lain sebagai anti malaria (Hay et al., 2004), cancer chemopreventive (Ito et al., 2001), antimikroba (Yimdjo et al., 2004) dan menekan pertumbuhan virus HIV (Patil et al., 1993). Manfaat beberapa spesies tumbuhan dari genus *Calophyllum* lainnya adalah Getah *C. Inophyllum* digunakan sebagai obat pereda kejang dan rendaman daunnya digunakan untuk mencuci mata yang meradang. Biji *C. Inophyllum* dan *C. Soulattri* mampu digunakan untuk mengobati kudis, borok, dan penumbuh rambut. Seduhan dari daun dan akar *C. soulattri* berkhasiat sebagai obat oles terhadap nyeri encok sedangkan getah *C. Wallichianum* dapat digunakan untuk mengobati kudis dan penyakit kulit lainnya (Heyne, 1987).

Manfaat dari tumbuhan genus *Calophyllum* ini tidak terlepas dari senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Kelompok senyawa bahan alam yang telah diisolasi dari tumbuhan genus *Calophyllum* cukup beragam, diantaranya golongan senyawa turunan santon, kumarin, benzodipiron, kromanon, biflavonoid, triterpen dan steroid (Noldin et al, 2006; Su et al, 2008). Senyawa turunan santon dan kumarin merupakan senyawa yang paling banyak dilaporkan, dimana senyawa santon umumnya diisolasi dari bagian kulit dan kayu sedangkan kumarin umumnya terdapat pada bagian daun. Belakangan ini ditemukan pula senyawa (+)-inophyllums B yang termasuk golongan piranokumarin berkhasiat sebagai anti HIV dari ekstrak daun tumbuhan *C. inophyllum* (Laure et al., 2008). Daun *C.*

Sundaicum yang mengandung *sundaicumones A dan B* dapat memberikan efek antiinflamasi (Cao, 2006). Ekstrak metanol dari akar dan kulit batang *C. soulattri* yang dipartisi dengan petroleum eter, diklorometana, dan etil asetat menunjukkan aktivitas perlawanan terhadap bakteri dan protozoa (Khan et al., 2002). Ekstrak metanol kulit batang *C. soulattri* juga memiliki aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva *Crocidolomia pavonana*. Komponen fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* tersebut merupakan kelompok triterpenoid (Syahputra dkk, 2006).

Senyawa yang telah diisolasi dari daun *C. soulattri* yang tumbuh di hutan tropis Sumatra Barat Indonesia adalah terpenoid *friedelin* (Putra dkk, 2008) sedangkan batang *C. soulattri* dari India dilaporkan mengandung senyawa *soulattrone A* yang juga termasuk dalam golongan terpenoid (Nigam, 1988), selain itu telah berhasil diisolasi senyawa turunan kromanon dari daun *C. soulattri* yang tumbuh di daerah Magelang Jawa Tengah (Sumarsih, 2011). Serta telah dilaporkan skrining fitokimia dari *C. inophyllum* dan *C. soulattri* yang berasal dari Kupang terdeteksi mengandung minyak atsiri, lemak dan asam lemak, steroid/triterpen, tanin, karotenoid dan gula pereduksi (Sulianti dkk, 2008). Dari beberapa penelitian tersebut masih sedikit informasi mengenai senyawa - senyawa kimia yang terkandung dalam daun *C. soulattri*, hanya beberapa senyawa yang telah diisolasi termasuk dalam golongan terpenoid. Oleh karena itu berdasarkan pendekatan kemotaksonomi dilakukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan *C. soulattri*. Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya, yaitu dengan mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan *C. soulattri* dari fraksi-fraksi yang telah ada dan diperkirakan fraksi tersebut mengandung senyawa murni yang diinginkan sehingga penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi tentang senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan *C. soulattri* yang tumbuh di Indonesia.

B. Perumusan Masalah

1. Identifikasi masalah

Tumbuhan genus *Calophyllum*, mempunyai spesies yang cukup beragam dan sebarannya cukup luas di Indonesia. Salah satu spesiesnya adalah *Calophyllum soulattri*. Belum banyak informasi mengenai senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Penelitian senyawa kimia yang telah dilaporkan sebagian besar menggunakan tumbuhan yang berasal dari luar Indonesia. Suatu tanaman yang memiliki tempat tumbuh berbeda maka dimungkinkan memiliki komposisi senyawa yang berbeda pula.

Penelitian uji aktivitas dari ekstrak metanol *C. soulattri* menunjukkan bahwa bagian-bagian tumbuhan memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan insektisida. Hal ini tidak terlepas dari senyawa yang terkandung dalam tanaman *C. soulattri* tersebut. Bagian tumbuhan yang berbeda dari *C. soulattri* juga mempengaruhi hasil senyawa yang diperoleh contohnya senyawa friedelin telah diisolasi dari daun *C. soulattri* sedangkan soulattrone A diisolasi dari bagian batang.

Isolasi komponen kimia dari suatu bahan alam dapat dilakukan dengan beberapa metode. Metode isolasi yang banyak digunakan diantaranya metode ekstraksi, destilasi dan kromatografi. Ada beberapa cara ekstraksi yang dapat dilakukan diantaranya adalah ekstraksi secara maserasi, soxhletasi, dan perkolasi. Maserasi adalah metode penyarian yang terpilih untuk digunakan dikarenakan cara pengerjaannya relatif sederhana dan peralatannya mudah diusahakan.

Identifikasi senyawa kimia dari ekstrak suatu bahan alam dapat dilakukan dengan berbagai metode seperti kromatografi lapis tipis (KLT), spektrofotometri UV-Vis, infra merah (IR), spektroskopi resonansi magnet inti (NMR), atau spektroskopi massa (MS).

2. Batasan masalah

Berdasarkan identifikasi masalah diatas, maka masalah dalam penelitian ini dibatasi oleh:

- a. Isolasi senyawa kimia dilakukan pada daun tumbuhan *Calophyllum soulattri* yang berasal dari daerah Magelang, Jawa Tengah.
- b. Isolasi dilakukan dengan cara ekstraksi yaitu maserasi menggunakan pelarut metanol dan teknik kromatografi.
- c. Elusidasi senyawa kimia dilakukan menggunakan data spektrofotometri UV-Vis, infra merah (IR), ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC.

3. Rumusan masalah

Berdasarkan batasan masalah di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Golongan senyawa apakah yang dapat diisolasi dari daun *Calophyllum soulattri*?
- b. Bagaimana struktur kimia dari senyawa yang berhasil diisolasi dari daun *Calophyllum soulattri*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- a. Mengisolasi senyawa kimia yang terkandung dalam daun *Calophyllum soulattri*.
- b. Mengelusidasi struktur senyawa kimia yang berhasil diisolasi dari daun *Calophyllum soulattri*.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah :
Memberikan informasi mengenai kandungan senyawa kimia dalam daun tumbuhan *Calophyllum soulattri*.



BAB II

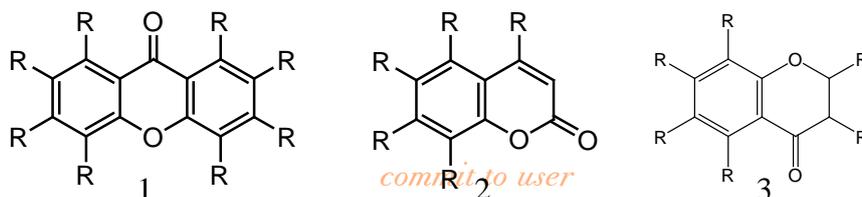
LANDASAN TEORI

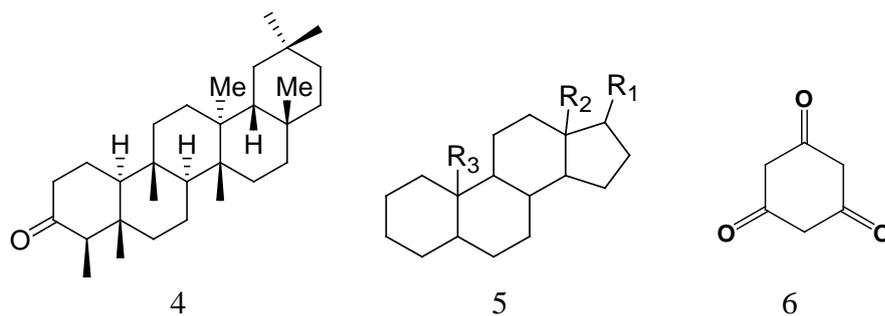
A. Tinjauan Pustaka

1. Tumbuhan Genus Calophyllum

Calophyllum (dari bahasa Yunani: kalos yang artinya cantik, dan phyllon yang artinya daun) merupakan genus dari sekitar 180-200 spesies berbeda dari famili Clusiaceae (Su et al., 2008). Telah banyak manfaat yang dapat diambil dari tumbuhan genus Calophyllum. Beberapa spesies dari genus ini dimanfaatkan kayunya untuk bahan bangunan. Bagian tertentu dari genus Calophyllum dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional, antara lain getah dari *C. inophyllum* digunakan sebagai obat reumatik, sementara air rendaman daun *C. inophyllum* dapat untuk mengobati peradangan pada mata (Heyne, 1987). Beberapa senyawa yang telah berhasil diisolasi mempunyai aktivitas biologi seperti anti HIV (Patil et al., 1993), anti kanker (Yimdjo et al., 2004), anti malaria (Hay et al., 2004), anti bakteri (Cottiglia et al., 2004) dan anti tumor (Itoigawa et al., 2001).

Kelompok senyawa bahan alam yang telah diisolasi dari tumbuhan genus Calophyllum diantaranya senyawa golongan santon (1), kumarin (2), kromanon (3), triterpenoid (4), steroid (5) dan asilploroglusinol (6) (Su et al., 2008). Berdasarkan kerangka dasarnya, senyawa yang telah diisolasi merupakan senyawa aromatik kecuali triterpenoid dan steroid. Senyawa turunan santon dan kumarin merupakan senyawa yang paling banyak dilaporkan. Senyawa turunan santon dan kumarin dari genus Calophyllum mempunyai ciri khas adanya gugus prenil pada cincin aromatiknya (Su, 2008). Gambar kerangka dasar senyawa yang terkandung dalam genus Calophyllum ditunjukkan pada gambar 1.



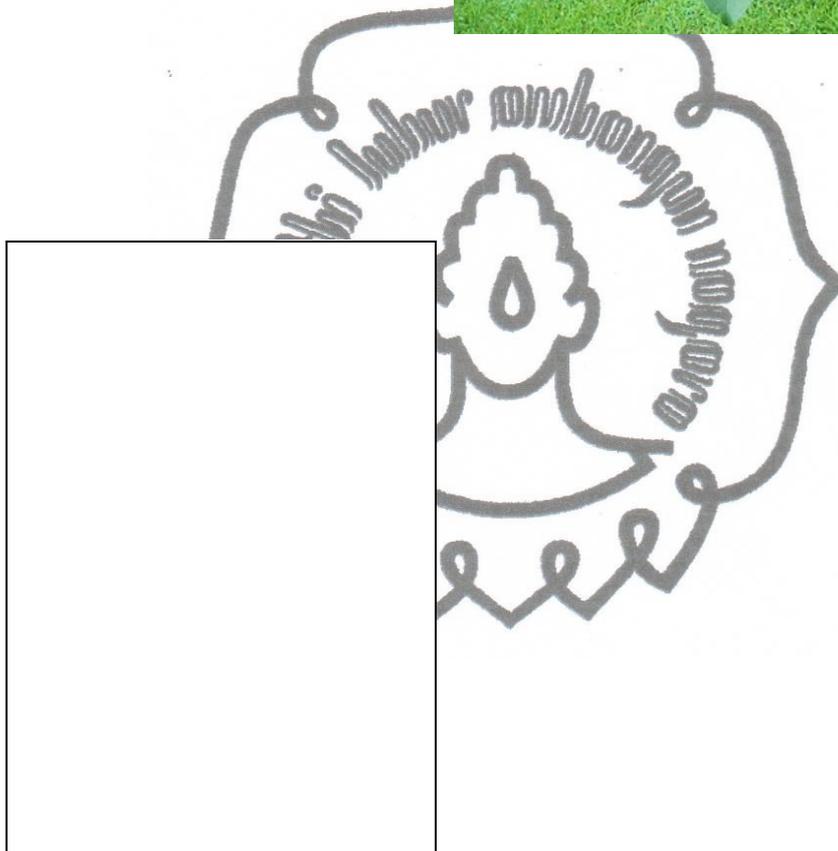


Gambar 1. Kerangka dasar senyawa yang terkandung dalam genus *Calophyllum*

2. Tumbuhan Slatri (*Calophyllum soulattri*)

a. Deskripsi tumbuhan

Calophyllum soulattri di daerah Jawa dikenal sebagai bintangur atau slatri. Pohon slatri memiliki tinggi hingga 28 m dengan besar batang 50 cm, batang bundar, lurus, jarang berbanir, kayu ringan, berwarna merah muda, mengkilat dengan urat yang tidak teratur, mempunyai kekerasan yang sedang, kayu mengeluarkan cairan warna kuning yang lambat laun berubah menjadi kemerahan. Daunnya hijau mengkilat, tulang daun membelah tegas, pertulangan daun menyirip dan tampak tidak jelas, bentuk daun oval lancip, ujung daun tumpul atau tajam, permukaan daun licin, tangkai daun panjangnya 1,5 - 2 cm. Buahnya oval ataupun lonjong, bagian atas meruncing, berwarna ungu muda, kulit biji tipis, panjang 1 - 1,25 cm. Bunga muncul dari tangkai, berkelopak 4, berwarna putih atau kekuningan dengan diameter 1,25 - 2 cm, benang sarinya putih atau kekuningan dan berbau harum (Sulianti dkk, 2006).



Gambar 2. Daun *C. soulattri*

Klasifikasi tumbuhan *Calophyllum soulattri* :

Kingdom : Plantae (tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionta (berpembuluh)

Superdivisio : Spermatophyta (menghasilkan biji)

Divisio : Magnoliophyta (berbunga)

Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/ dikotil)

Sub-kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Theales
Familia	: Clusiaceae
Genus	: Calophyllum
Spesies	: Calophyllum soulattri BURM. F

(Heyne, 1987)

b. Manfaat tumbuhan

C. soulattri merupakan tanaman obat yang sering digunakan secara tradisional. Gelam kayunya ditemukan dalam perdagangan obat dengan sebutan babakan slatri, babakan slatri ini digunakan sebagai jamu untuk kuda agar selalu berada dalam keadaan terbaik. Getah yang mengalir keluar dari torehan pada batang sangat berbisa yang dapat dipakai untuk meracuni anjing. Daunnya pun dianggap berkhasiat sebagai obat, seduhan daun (dan akar-akarnya) dipergunakan sebagai obat oles terhadap nyeri encok. Minyak dari bijinya dapat dimanfaatkan untuk plitur, minyak rambut, minyak urut, berkhasiat juga untuk obat urus-urus dan rematik (Heyne, 1987). Bagian bunga dari tumbuhan ini berbau harum sehingga sering dipergunakan sebagai pengharum pewangi pakaian. Di daerah Jawa Tengah bagian benang sari yang berwarna kuning dipergunakan sebagai jamu bagi wanita habis melahirkan (Syahputra, dkk., 2004).

Ekstrak metanol kulit batang *C. soulattri* memiliki aktivitas insektisida yang kuat terhadap larva *Crocidolomia pavonana*. Komponen fraksi aktif kulit batang *C. soulattri* merupakan kelompok triterpenoid (Syahputra, dkk., 2006). Ekstrak metanol dari daun, akar dan kulit batang *C. soulattri* yang dipartisi dengan petroleum eter, diklorometana, dan etil asetat juga menunjukkan aktivitas perlawanan terhadap bakteri dan protozoa (Khan et al., 2002).

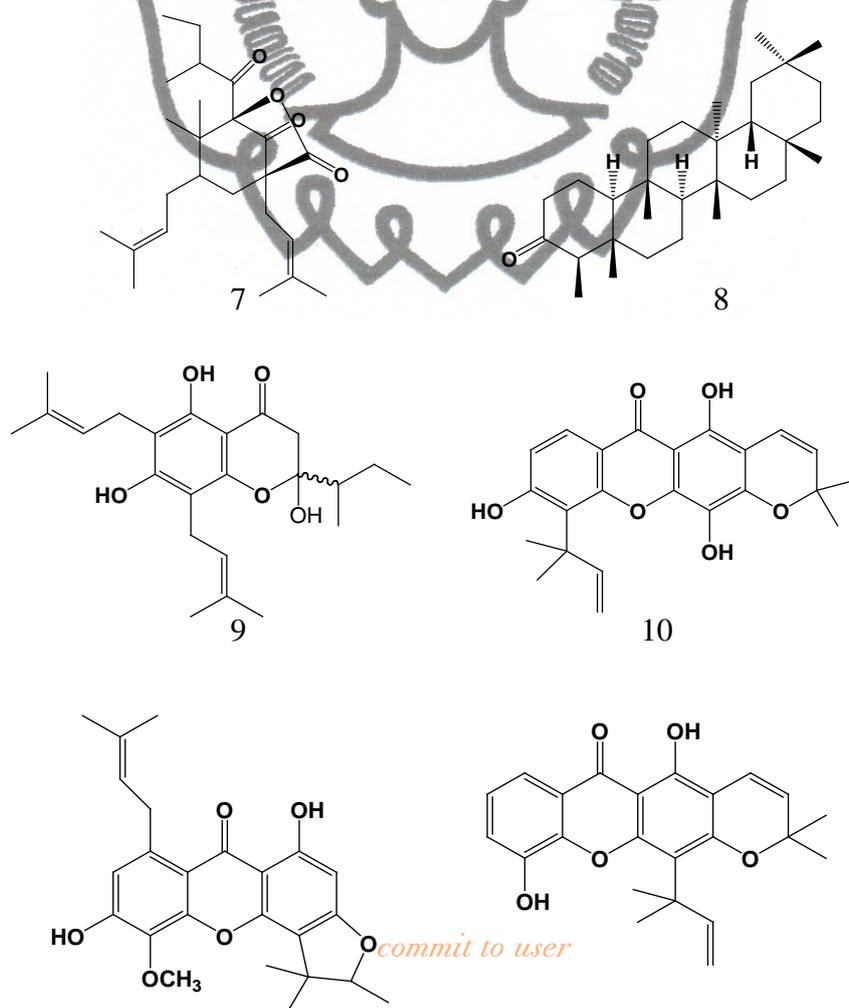
c. Kandungan kimia tumbuhan

Dari penelitian yang pernah dilaporkan, belum banyak penelitian yang melaporkan tentang kandungan senyawa kimia dalam tumbuhan *C. soulattri*. Dari hasil penelitian yang pernah dilaporkan, telah berhasil diisolasi turunan terpenoid

dari kulit tumbuhan *C. soulattri* adalah Soulattrone A (7) (Nigam, et al., 1988; Putra dkk., 2008).

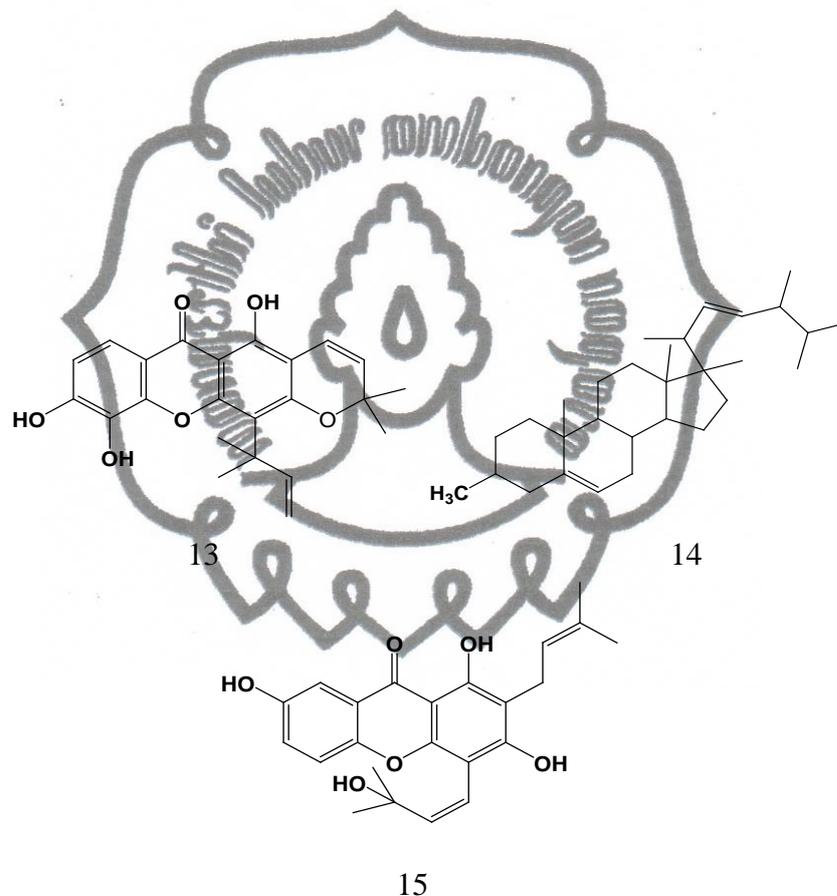
Dan senyawa yang telah berhasil diisolasi dari daun *C. soulattri* adalah friedelin (8) yang merupakan golongan triterpenoid (Putra dkk., 2008) dan senyawa turunan kromanon (9) (Sumarsih, 2011). Friedelin juga pernah diisolasi dari bagian daun *C. cordato-oblongum*, *C. mooni*, *C. brasillense*, *C. inophyllum*, *C. walkeri*, *C. thwaitesii*, *C. calaba*, *C. lankaensis*, *C. gracilipes*; dari bagian kulit batang *C. walkeri*, *C. verticillatum*, *C. tomentosum*; dari bagian kulit akar *C. inophyllum*, *C. mooni*, *C. thwaitesii* (Su et al., 2008).

Selain itu juga telah berhasil diisolasi senyawa pyranoxanton baru dari kulit batang *C. soulattri* yaitu soulattrin (10), bersama dengan tiga xanton yang lain, caloxanton B (11), caloxanton C (12), macluraxanton (13), triterpen friedelin dan steroid stigmasterol (14) (Siau et al., 2011).



11

12



Gambar 3: Struktur senyawa yang berhasil diisolasi dari *C. soulattri*

3. Metode Isolasi Senyawa Bahan Alam

Ekstraksi merupakan salah satu metode pemisahan yang bertujuan untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke

dalam pelarut. Ekstraksi pada padatan digunakan untuk memisahkan senyawa bahan alam dari jaringan kering tumbuhan, mikroorganisme, dan hewan. Jika substansi yang akan diekstrak terdapat di dalam campurannya yang berbentuk padat, maka dilakukan proses ekstraksi padat-cair (Rusdi, 1998). Pelarut n-heksan, eter, petroleum eter, atau kloroform digunakan untuk mengambil senyawa yang kepolarannya rendah. Pelarut yang lebih polar seperti alkohol dan etil asetat digunakan untuk mengambil senyawa - senyawa yang lebih polar. Pemilihan pelarut berdasarkan kaidah "like dissolve like", yang berarti suatu senyawa polar akan larut dalam pelarut polar dan juga sebaliknya, senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar (Padmawinata dan sudiro, 1987).

Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik diluar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel.

Maserasi merupakan contoh metode ekstraksi padat-cair bertahap yang dilakukan dengan jalan membiarkan padatan terendam dalam suatu pelarut. Proses perendaman dalam usaha mengekstraksi suatu substansi dari bahan alam ini bisa dilakukan tanpa pemanasan (temperatur kamar), dengan pemanasan atau bahkan pada suhu pendidihan. Salah satu keuntungan metode maserasi adalah cepat, terutama jika maserasi dilakukan pada suhu didih pelarut. Waktu rendam bahan dalam pelarut bervariasi antara 15-30 menit tetapi terkadang bisa sampai 24 jam. Jumlah pelarut yang diperlukan juga cukup besar, berkisar antara 10-20 kali jumlah sampel (Kristanti dkk., 2008).

Pada proses maserasi, jika dilakukan dengan pelarut air, maka diperlukan proses ekstraksi lebih lanjut, yaitu ekstraksi fasa air yang diperoleh dengan pelarut organik (Padmawinata dan Sudiro, 1987). Jika maserasi dilakukan dengan pelarut organik, maka filtrat hasil ekstraksi dikumpulkan menjadi satu kemudian dievaporasi atau didestilasi. Selanjutnya dapat dilakukan proses pemisahan dengan kromatografi atau rekristalisasi langsung (Kristanti dkk., 2008).

4. Metode Pemurnian Senyawa

Kromatografi merupakan salah satu metode pemisahan komponen dalam suatu sampel dimana komponen tersebut didistribusikan diantara dua fasa yang tidak saling bercampur yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak adalah fase yang membawa cuplikan, sedangkan fase diam adalah fase yang menahan cuplikan secara efektif (Sastrohamidjojo, 2002).

a) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Tujuan KLT adalah untuk (1) mencari eluen yang sesuai untuk kromatografi kolom, (2) analisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom, (3) memonitor jalannya suatu reaksi kimia, (4) identifikasi senyawa (Kristanti, dkk., 2008). Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan pada distribusi fase cair-padat. Sebagai fase diam padat atau adsorbennya berupa lapisan tipis alumina atau silica gel yang menempel pada permukaan lempengan kaca atau plastik, sedang sebagai fase gerak cair adalah eluen yang digunakan untuk membawa zat yang dianalisa bergerak melalui fase diam padat. Fase diam harus mempunyai sifat tidak larut dalam fase gerak maupun dalam komponen sampel (Sastrohamidjojo, 1991)

Fase diam dalam KLT berupa padatan penyerap yang dihasilkan pada sebuah plat datar dari gelas, plastik atau alumina sehingga membentuk lapisan tipis dengan ketebalan tertentu. Fase diam atau penyerap yang bisa digunakan sebagai pelapis plat adalah silica gel (SiO_2), selulosa, alumina (Al_2O_3) dan kieselgur (tanah diatom). Kebanyakan penyerap yang digunakan adalah silica gel, dimana telah tersedia plat yang siap pakai (Gritter, 1991).

Sampel yang ditotolkan pada tepi bawah plat KLT akan dibawa oleh eluen menuju bagian atas plat. Pada proses ini komponen-komponen kimia dalam sampel akan terpisah berdasarkan kecepatannya berinteraksi dengan eluen (Khopkar, 1990). Proses pemisahan KLT yang mudah dan cepat, sering digunakan untuk melihat kemurnian suatu senyawa organik. Jika analisis dilakukan dengan

mengubah pelarut beberapa kali dan hasil elusi tetap menampilkan satu noda maka dapat dikatakan bahwa sampel yang ditotolkan adalah murni. Selain itu, KLT juga dapat menampakkan jumlah senyawa-senyawa dalam campuran sampel menurut noda yang muncul (Kristanti dkk., 2008).

Kekuatan elusi dari deret - deret pelarut untuk senyawa - senyawa dalam KLT dengan menggunakan silika gel akan turun dengan urutan sebagai berikut: air murni > metanol > etanol > propanol > aseton > etil asetat > kloroform > metil klorida > benzena > toluen > trikloroetilena > tetraklorida > sikloheksana > heksana. Fasa gerak yang bersifat lebih polar digunakan untuk mengelusi senyawa - senyawa yang adsorbsinya kuat, sedangkan fasa gerak yang kurang polar digunakan untuk mengelusi senyawa yang adsorbsinya lemah (Sastrohamidjojo, 1995).

Analisis suatu senyawa dalam KLT biasanya dilakukan dengan dibandingkan terhadap senyawa standarnya. Pada sistem KLT dikenal istilah kecepatan rambat suatu senyawa yang diberi simbol Rf (Retardation factor). Harga Rf ditentukan oleh jarak rambat senyawa dari titik awal dan jarak rambat fase gerak dari titik awal. Penentuan harga Rf adalah sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak komponen yang bergerak}}{\text{Jarak pelarut yang bergerak}}$$

Untuk mendeteksi kromatogram yang dihasilkan KLT dapat dilakukan dengan melihat warna noda di bawah sinar UV. Senyawa aromatik akan tampak berupa noda gelap (tidak berfluoresence) dengan background yang berpendar saat disinari dengan lampu UV $\lambda 254$ (Padmawinata dan Sudiro, 1987). Identifikasi senyawa juga dapat dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi warna yang bersifat universal seperti $Ce(SO_4)_2$.

b. Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Langkah pemisahan menggunakan kromatografi vakum cair biasanya dilakukan pada tahap awal pemisahan misalnya pemisahan terhadap ekstrak kasar

yang diperoleh langsung dari proses ekstraksi.

Kromatografi vakum cair merupakan salah satu kromatografi kolom khusus yang biasanya juga menggunakan silica gel sebagai adsorben (biasanya silica gel G60, 63-200 μm). Alat yang digunakan adalah corong buchner berkaca maser atau kolom pendek dengan diameter yang cukup besar. Pada kromatografi jenis ini kolom yang akan digunakan dikemas kering dalam keadaan vakum agar diperoleh kepadatan adsorben yang maksimum. Pelarut paling non polar yang akan digunakan dituangkan ke permukaan adsorben dan divakumkan lagi. Setelah kering kolom siap dipakai jika kolom tidak retak atau turunnya eluen sudah rata. Sampel dapat dilarutkan atau dapat berupa serbuk bersama adsorben (impregnasi) dan dimasukkan pada permukaan kolom kemudian dihisap perlahan-lahan. Kolom dielusi dengan pelarut yang sesuai dimulai dari yang non polar. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Kristanti dkk., 2008).

Teknik KVC sering digunakan untuk memisahkan fraksi berdasarkan kepolarannya, contoh penggunaan KVC pemisahan fraksi etil asetat C. soulattri menggunakan fase diam silica gel 40 - 63 μm dengan fase gerak berturut-turut pelarut heksana, diklorometana, etil asetat, dan metanol. Selanjutnya tiap-tiap fraksi diujikan terhadap larva C. pavonana (Syahputra, 2005). Dalam isolasi senyawa piranokumarin dari C. lanigerum var. austrocoriaceum juga menggunakan KVC (SiO_2 , 3x5 cm) dengan campuran heksana - EtOAc (100% heksana hingga 100% EtOAc, dan terakhir metanol untuk mencuci (McKee, 1996).

c) Kromatografi Flash

Fraksi yang diperoleh dari hasil fraksinasi menggunakan metode KVC dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom. Kromatografi flash merupakan kromatografi kolom yang dimodifikasi dengan bantuan tekanan gas nitrogen. Kelebihan kromatografi flash dibandingkan dengan kromatografi kolom gravitasi adalah prosesnya memerlukan waktu yang relatif lebih singkat. Pemilihan sistem eluen untuk kromatografi flash dipandu dengan KLT. Rf senyawa dianjurkan berada pada range 0,15 - 0,2. Sistem pelarut biner dengan

salah satu pelarut mempunyai kepolaran yang lebih tinggi sering digunakan dalam kromatografi ini (Still et al., 1978).

Besarnya cuplikan berbanding lurus dengan luas penampang kolom. Adsorben yang paling sering digunakan adalah silica gel G60 ukuran 63 - 200 μm dan silica gel G60 ukuran 40 - 43 μm (Kristanti dkk., 2008). Banyaknya silica gel yang digunakan bervariasi antara 30 sampai 100 kali lebih berat dari sampel. Pemisahan yang mudah dapat menggunakan perbandingan 30:1 yaitu berat silica gel yang digunakan sebanyak 30 kali dari berat sampelnya dan untuk pemisahan yang cukup rumit perbandingan silica gel dengan sampel ditingkatkan (Still et al., 1978).

d) Kromatografi Sephadex

Prinsip pemisahan kromatografi sephadex LH-20 adalah molekul yang memiliki berat molekul kecil akan melewati dan terjebak dalam gel sephadex terlebih dahulu sebelum keluar kolom, sedangkan molekul yang memiliki berat molekul besar akan langsung terelusi keluar kolom karena tidak menembus gel. Oleh karena itu molekul yang akan keluar dari kolom terlebih dahulu adalah molekul yang ukurannya lebih besar setelah itu disusul oleh molekul yang ukurannya lebih kecil (Day dan Underwood, 2002).

Gel sephadex (G) merupakan salah satu adsorben yang digunakan sebagai fasa diam dalam kromatografi kolom. Salah satu kelemahan dari metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama. Gel sephadex LH-20 dirancang untuk digunakan memakai eluen organik. Biasanya yang digunakan adalah metanol. Sebelum digunakan sebaiknya gel sephadex digembungkan terlebih dahulu dalam eluen selama 12 jam (Kristanti dkk, 2008).

Penelitian yang menggunakan sephadex LH-20 dalam pemisahannya antara lain: isolasi piranokumarin dari daun *C. laningerum* var. *austrocoriaceum* serta *C. teysmannii* var. *inophylloide* menggunakan sephadex LH-20 dengan ukuran 2,5x50 cm dan pelarut MeOH : CH₂Cl₂ dengan perbandingan sama 1:1 (McKee, 1996).

5. Spektroskopi

Spektroskopi adalah studi mengenai interaksi antara energi cahaya dan materi. Penggunaan detektor - detektor radiasi untuk adsorpsi energi cahaya memungkinkan spektroskopi memiliki ketelitian yang lebih cermat dalam pengukuran secara kuantitatif. Suatu senyawa organik maupun anorganik dapat mengadsorpsi energi cahaya pada panjang gelombang tertentu oleh karena itu teknik - teknik spektroskopi dapat digunakan untuk menentukan struktur senyawa yang tidak diketahui dan untuk mempelajari karakteristik ikatan dari senyawa yang diketahui. Proses identifikasi senyawa pada elucidasi struktur senyawa dapat digunakan data spektrum dari UV - Vis, IR dan NMR.

a. Spektroskopi Ultraviolet - Visibel (UV-Vis)

Daerah UV-Vis berada pada panjang gelombang 180-350 nm. Prinsip dasar dari spektroskopi UV-Vis adalah penyerapan sinar tampak atau ultraviolet oleh suatu molekul yang dapat menyebabkan terjadinya eksitasi molekul tersebut dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Absorpsi radiasi oleh suatu sampel diukur detektor pada berbagai panjang gelombang dan diinformasikan ke perekam untuk menghasilkan spektrum. Spektrum ini akan memberikan informasi penting untuk identifikasi adanya gugus kromofor (Hendayana, 1994).

Panjang gelombang maksimum beberapa gugus kromofor sederhana ditunjukkan pada Tabel 1. data ini hanya dapat memberikan petunjuk kasar untuk identifikasi gugus fungsional, karena posisi maksimal juga dipengaruhi oleh struktur molekul kromofor (Kemp, 1987).

Tabel 1. Serapan beberapa Gugus Kromofor Sederhana

Gugus Kromofor	λ_{\max} (nm)
C=C	165
C=O	150, 188 dan 279
C=C-C=C	217
C=C-C=O	215
Benzena	180, 200 dan 255

(Silverstein, 1991).

Senyawa aromatik mengabsorpsi pada daerah cahaya ultraviolet. Jika pada cincin benzen terdapat pasangan elektron sunyi seperti pada fenol, maka panjang gelombang maksimumnya mengalami pergeseran bathokromik. Senyawa terpenoid dan steroid jarang dianalisis menggunakan spektroskopi UV-Vis karena strukturnya yang tidak menyerap sinar UV-Vis (Kismane dan Ibrahim, 1985).

Senyawa piranoamentoflavon dalam metanol memiliki panjang gelombang maksimal 270 (4.59), 286 (4.55), 312 (4.60), 342 (4.65) nm, saat penambahan NaOMe terjadi pergeseran bathokromik dimana panjang gelombang maksimal menjadi 274 dan 396 nm. Senyawa asam apetalik dalam CH₃CN yang merupakan golongan kromanon yang terkandung dalam *C. blancoi* memiliki serapan UV pada panjang gelombang maksimal : 268, 281, dan 340 nm.

b. Spektroskopi Infra Merah (IR)

Spektrofotometri inframerah sangat penting dalam kimia modern terutama dalam daerah organik. Spektrofotometer ini merupakan alat untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa, dan menganalisis campuran (Day dan Underwood, 2002). Spektru IR mempunyai jarak pengukuran dari 4000 cm⁻¹ - 667 cm⁻¹ atau dari 2,5 μm sampai 15 μm. Spektrum IR yang berada pada daerah di atas 1200 cm⁻¹ menunjukkan pita spektrum yang disebabkan oleh getaran ikatan kimia atau gugus fungsi molekul yang ditentukan. Sedangkan spektrum IR yang berada pada daerah dibawah 1200 cm⁻¹ menunjukkan pita spektrum yang disebabkan oleh getaran seluruh molekul dan dikenal dengan nama sidik jari (Harborne, 1987).

Tabel 2. Serapan khas beberapa gugus fungsi pada spektroskopi inframerah

□

(Silverstein, 1991).

c. Spektroskopi Resonansi Magnet Inti (NMR)

1) Hidrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR)

Informasi yang didapatkan dari ^1H NMR antara lain nilai geseran kimia (δ ppm), tanpa satuan dan dinyatakan sebagai ppm (per sejuta) yang dapat mengindikasikan gugus fungsi. Integrasi (luas area) tiap 'kelompok' puncak yang mengindikasikan jumlah H dimana daerah di bawah puncak berbanding lurus dengan jumlah proton yang bertanggung jawab terhadap puncak tersebut. Multiplisitas puncak (s, d, t, q, qi, sext, hept.) merupakan hubungan antar H

(untuk C tetangga, biasanya

berselang satu ikatan). Konstanta kopling (J, Hz) biasa digunakan untuk mengetahui jenis hubungan antar H yang merujuk pada stereokimia atau posisi H.

Proton dari suatu molekul tidak akan membalikkan spinnya pada frekuensi resonansi yang sama yang menyebabkan semua spektrum NMR yang diperoleh dari bermacam - macam senyawa akan menunjukkan gambar yang sama, namun frekuensi radiasi yang diserap oleh suatu proton bergantung pada lingkungan dekat dalam molekul ini. Hal ini disebabkan karena elektron yang terdapat disekeliling inti proton merupakan perisai terhadap medan magnet terpasang.

Besarnya pemerisaiian bergantung pada kerapatan elektron yaitu elektron bukan ikatan (non bonding), elektron π dan elektron σ . Semakin terperisai keadaan proton, semakin tinggi medan magnet terpasang yang diperlukan agar resonansi tercapai. Oleh karena itu tiap proton yang memiliki lingkungan berbeda akan muncul pada pergeseran kimia yang berbeda pula.

Proton dari suatu molekul tidak hanya merasakan medan magnet terpasang yang sangat kuat namun juga medan - medan kecil dari proton tetangganya, jumlah puncak yang merupakan sinyal dari proton tertentu yang terpisah disebut multiplisitas, sinyal proton mungkin terpisah menjadi dua puncak (doublet), tiga puncak (triplet), empat puncak (kuartet) atau lebih.

$$\text{Multiplisitas } H_a = n + 1$$

Dimana n adalah jumlah proton ekuivalen yang bertetangga dengan H_a . Dua proton dikatakan bertetangga jika mereka terikat pada atom yang bersebelahan, proton tetangga untuk H_a yaitu proton yang terpisah dari H_a oleh tiga ikatan. Proton ini disebut proton vicinal (Carey, 2000).

2) Spektroskopi NMR Karbon ^{13}C

Spektroskopi NMR ^{13}C memberi informasi tentang kerangka karbon. Isotop karbon biasa, yaitu karbon-12, tidak memiliki spin inti, tidak seperti karbon-13. Spektrum karbon-13 berbeda dari spektrum ^1H dalam beberapa hal. Pergeseran kimia karbon-13 terjadi pada kisaran yang lebih lebar dibandingkan kisaran pergeseran kimia inti ^1H . Keduanya diukur terhadap senyawa standar yang sama yaitu TMS, yang semua karbon metilnya ekuivalen dan memberikan sinyal yang tajam. Pergeseran kimia untuk ^{13}C dinyatakan dalam satuan δ , tetapi yang lazim sekitar 0 sampai 200 ppm di bawah medan TMS (kisaran untuk ^1H dari 0 sampai 10 ppm). Kisaran pergeseran kimia yang lebar ini cenderung menyederhanakan spektrum ^{13}C relatif terhadap ^1H (Achmadi, 2003).

Pergeseran kimia relatif dalam spektroskopi ^{13}C secara kasar paralel dengan spektroskopi ^1H . TMS menyerap di atas medan, sedangkan karbon aldehida dan karboksil menyerap jauh di bawah medan. Spektroskopi NMR, baik ^1H maupun ^{13}C NMR sangat berperan penting dalam penentuan struktur suatu

senyawa yang berhasil diisolasi dari suatu bahan alam. Sebagai contoh penentuan struktur senyawa calasanton D yang telah diisolasi dari akar tumbuhan spesies *C. inophyllum* (Iinuma, 1994).

3) DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

DEPT merupakan teknik NMR yang dapat memberikan informasi tentang multiplisitas dari atom ^{13}C . DEPT terdiri dari DEPT 135 dan DEPT 90. sama halnya dengan APT yang menunjukkan multiplisitas dari atom karbon dalam dua kelompok yaitu metin dan metil biasanya pada fase positif sedangkan untuk karbon kuartener dan metilen pada fase negatif, begitu juga dengan DEPT 135 yang menunjukkan sinyal karbon dalam dua kelompok hanya saja untuk sinyal karbon kuartener tidak muncul dalam spektranya. Sedangkan pada DEPT 90 hanya menunjukkan sinyal metin saja.

4) HMQC (Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation)

HMQC menyatakan kebalikan hubungan CH melalui satu ikatan kopling CH yang biasa disebut sebagai heteronuclear shift correlation yaitu hubungan pergeseran inti yang berbeda antara karbon-13 dengan pergeseran proton hasil HMQC adalah hubungan CH dua dimensi yang ditunjukkan sebagai sinyal siang dalam diagram δC Vs δH . Pergeseran dari hubungan karbon - proton berguna dalam elusidasi struktur karena memberikan jawaban ^1H mana yang terikat pada inti ^{13}C (Breitmarier, 2002).

5) HMBC (Heteronuclear Multiple - Bond Correlation)

HMBC berupa spektra dua dimensi antara δC dengan δH yang menyatakan hubungan CH melalui jarak yang jauh dari kopling karbon - proton. HMBC mendeteksi hubungan inti karbon terhadap dua atau tiga ikatan dari proton yang tidak terikat olehnya. Hasil dari HMBC berfungsi untuk memberikan informasi tentang hubungan inti karbon yang satu dengan yang lain melalui proton yang terikat oleh suatu karbon, selain itu juga berguna untuk mengetahui penempatan karbon kuartener yang tidak diketahui informasinya dari HMQC.

B. Kerangka Pemikiran

Tumbuhan *Calophyllum soulattri* merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Namun belum banyak pengetahuan tentang komponen senyawa yang terkandung dalam tumbuhan tersebut khususnya tanaman yang berasal dari Indonesia. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi, identifikasi dan elucidasi struktur senyawa kimia yang terkandung di dalam daun tumbuhan *Calophyllum soulattri* sehingga dapat dimanfaatkan secara optimal.

Pendekatan kemotaksonomi menjelaskan bahwa tumbuhan yang memiliki kekerabatan yang dekat memiliki kesamaan dalam kandungan senyawa kimianya. Begitu pula dengan *soulattri* yang termasuk dalam genus *Calophyllum* maka dimungkinkan senyawa yang dapat diisolasi mempunyai kemiripan bahkan sama dengan senyawa-senyawa yang telah diisolasi dari genus *Calophyllum* yang sebelumnya. Penelitian sebelumnya tentang isolasi senyawa dari daun *Calophyllum* sp dilaporkan bahwa sebagian besar merupakan golongan senyawa kromanon, santon, dan kumarin.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol untuk mengambil semua komponen yang terdapat dalam daun *Calophyllum soulattri*. Pemisahan dan pemurnian senyawa menggunakan metode kromatografi, yaitu kromatografi lapis tipis (KLT). Sebagai panduan saat pemisahan senyawa, sedangkan kromatografi vakum cair (KVC), kromatografi kolom sephadex dan kolom tekan (flash) digunakan untuk tahap fraksinasi maupun pemurnian. Senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi struktur senyawanya menggunakan spektrofotometri UV-Vis, infra merah (IR), ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT 135, dan NMR dua dimensi.

C. Hipotesis

Senyawa yang dapat diisolasi dari daun *C. soulattri* termasuk salah satu

dari golongan senyawa turunan kumarin, dan atau kromanon.



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimen laboratorium. Sampel daun tumbuhan slatri dikumpulkan dari daerah Magelang, Jawa Tengah. Isolasi dan pemurnian senyawa menggunakan metode ekstraksi dan kromatografi. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut metanol untuk mengambil senyawa dari daun slatri. Metode kromatografi digunakan dalam proses pemisahan dan pemurnian senyawa antara lain; Kromatografi Vakum Cair (KVC), kromatografi flash, kromatografi kolom sephadex, dan

dipandu dengan teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Elusidasi struktur senyawa isolat dilakukan dengan metode spektroskopi UV, infra merah (IR), spektroskopi ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) dan NMR dua dimensi meliputi HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), dan HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence).

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar F MIPA UNS. Analisis spektroskopi UV-Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar F MIPA UNS, analisis Inframerah dilakukan di Laboratorium F MIPA UNS sedangkan untuk data ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC dianalisis di LIPI Serpong. Penelitian ini dilakukan pada bulan September - Desember 2011.

C. Alat dan Bahan

1. Alat-alat yang digunakan

Isolasi dan pemurnian senyawa dari daun *Calophyllum soulattri* digunakan KVC dengan diameter kolom 9 cm, kromatografi flash dengan diameter kolom 2 cm dan 1 cm. Maserat disaring menggunakan penyaring buchner kemudian dipisahkan dengan rotary evaporator vacum (IKA-WERKE HB4 basic). Analisis KLT digunakan lampu UV dengan $\lambda 254$ nm serta penyemprot penampak noda $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$. Elusidasi struktur senyawa isolat dengan metode spektroskopi UV (spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV mini 1240), spektroskopi inframerah (spektrofotometer Shimadzu RESTIGE 21) dengan metode pelet KBr. Data ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC dianalisis dengan spektrometer Joel AS 500 MHz.

2. Bahan yang digunakan

Daun slatri dikumpulkan dari daerah Magelang pada bulan Juni 2010.

Pelarut yang digunakan untuk maserasi dan kromatografi adalah pelarut teknis yang didestilasi antara lain n-Heksan, EtOAc dan MeOH. Pelarut CHCl_3 dan aseton yang digunakan adalah grade pro analisis. Fasa diam pada KVC digunakan silika gel Merck Si-gel 60 GF254, untuk kromatografi flash digunakan silika gel Merck Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm) 230-400 mesh ASTM. Plat yang digunakan untuk analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah plat alumunium berlapis silika (Merck Kieselgel 60 GF254 0,25 mm). Impregnasi sampel saat Kromatografi Vacum Cair (KVC) dan kromatografi flash digunakan silika adsorb. Silika gel Merck Kiesel Gel 60 (0,2-0,5 mm). Pereaksi penampak noda saat KLT digunakan $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ 2% dalam H_2SO_4 1M sedangkan pereaksi geser untuk analisis UV digunakan larutan NaOH 0,01M.

D. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Sampel

Determinasi sampel dilakukan di laboratorium Bagian Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Determinasi dilakukan berdasarkan pengamatan ciri fisiologis tumbuhan. Sampel tumbuhan yang diteliti merupakan *Calophyllum soulattri* Burm. f.

2. Persiapan Sampel

Daun slatri diangin-anginkan hingga kering. Selanjutnya daun slatri yang telah kering dihaluskan hingga berbentuk serbuk.

3. Isolasi dan Pemurnian Senyawa dari Daun Slatri

a. Ekstraksi

Serbuk kering daun slatri sebanyak 3 kg dimaserasi dalam 12 liter metanol pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Kemudian maserat disaring menggunakan penyaring buchner untuk memisahkan filtrat dari residunya. Filtrat yang diperoleh dievaporasi sampai pekat dan dimasukkan dalam desikator untuk menguapkan sisa pelarut hingga dihasilkan ekstrak pekat metanol.

b. Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Ekstrak metanol daun slatri sebanyak 40 gr difraksinasi menggunakan teknik kromatografi vakum cair (KVC) dengan diameter kolom 9 cm. KVC dilakukan dua kali, KVC I dan KVC II masing - masing menggunakan sampel sebanyak 20 gr. 20 gram sampel yang akan digunakan diimpregnasi terlebih dahulu dengan 20 gram silika adsorb Merck Kieselgel 60 (0,2-0,5 mm). Fasa diam yang digunakan adalah silika gel Merck Si-gel 60 GF254 sebanyak 100 gr. Silika gel dimasukkan ke dalam kolom kemudian dimampatkan dengan pompa vakum, setelah mampat sampel yang telah diimpregnasi diletakkan diatas fasa diam dan dielusi dengan eluen yang kepolarannya meningkat menggunakan perbandingan dari n-Heksan : EtOAc. Eluen yang diperlukan untuk sekali elusi sebanyak 150 ml.

Hasil fraksinasi dari KVC I dan KVC II diuapkan dengan rotary evaporator kemudian ditimbang masing - masing berat fraksi. Fraksi - fraksi yang diperoleh dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fasa diam silika gel Merck Kieselgel 60 GF254 0,25 mm. Analisis KLT dari hasil KVC I dan KVC II menggunakan eluen n-Heksan : EtOAc dengan perbandingan tertentu. Hasil KLT dilihat dengan lampu UV pada $\lambda 254$ nm kemudian disemprot pereaksi

penampak noda larutan $Ce(SO_4)_2$. Fraksi yang memiliki pola pemisahan spot sama digabung, kemudian fraksi yang memiliki berat mencukupi dan pemisahan spot yang baik difraksinasi dan dimurnikan lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan.

c. Kromatografi Flash

Kromatografi flash dilakukan dengan mengambil sampel kemudian diimpregnasi dengan silika gel Merck Kiesel Gel 60 (0,2-0,5 mm) dengan perbandingan 1:2. Sampel yang sudah bebas pelarut diletakkan diatas kolom kromatografi flash menggunakan fasa diam Kiesel Gel 60 (0,04-0,063 mm). Banyaknya silika gel yang digunakan bervariasi antara 30 sampai 50 kali berat sampel. Sampel yang telah diimpregnasi diletakkan diatas kolom selanjutnya

dielusi dengan eluen hasil analisis KLT dari sampel yang memiliki pemisahan spot yang cukup jelas.

Pengisian kolom dengan adsorben menggunakan cara basah. Silika gel dimasukkan ke dalam gelas beker yang telah berisi eluen hingga semua silika gel bercampur dengan eluen. Silika gel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan corong saring, selanjutnya ditekan dengan air pump hingga silika memadat.

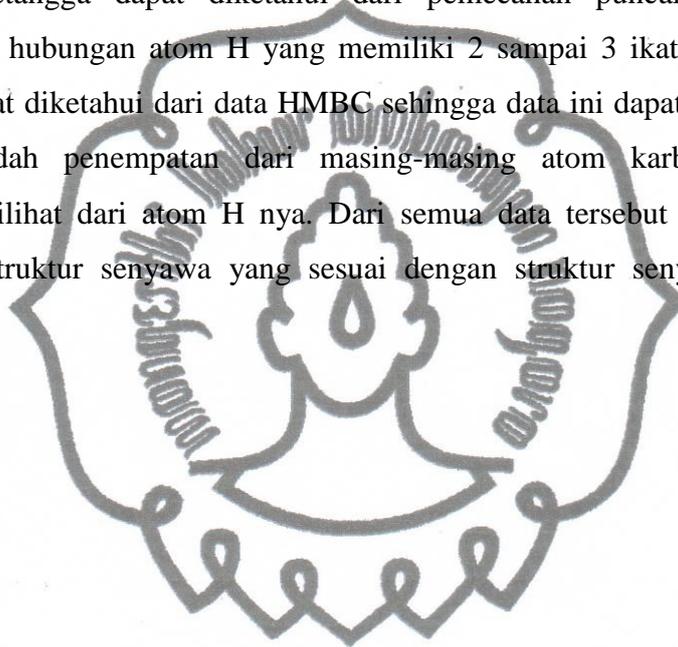
4. Identifikasi senyawa dari daun slatri

Fraksi yang memiliki satu spot saat analisis KLT selanjutnya dilakukan uji kemurnian. Uji kemurnian dilakukan dengan analisis KLT menggunakan empat eluen berbeda, jika semua hasil analisis KLT menunjukkan satu spot maka fraksi tersebut dapat dikatakan murni. Senyawa murni yang diperoleh diidentifikasi strukturnya dengan menggunakan data spektroskopi UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC.

E. Teknik Analisa Data

Isolasi senyawa kimia dari daun *Calophyllum soulattri* dilakukan secara kromatografi dan dilanjutkan elusidasi struktur dari senyawa isolat, sehingga akan diperoleh beberapa macam data. Untuk memandu proses pemisahan secara kromatografi digunakan KLT, dimana dari analisis KLT ini akan diperoleh harga R_f dan pola spot yang dapat digunakan untuk mengetahui hasil pemisahan dan kemurnian dari senyawa. Elusidasi struktur dengan menggunakan data dari spektroskopi UV-Vis, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC. Spektra UV dapat digunakan untuk menganalisis adanya gugus kromofor sedangkan dari spektra IR dapat diketahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa isolat. Kerangka dasar dapat diketahui dari data ^{13}C NMR melalui jumlah atom karbon serta nilai pergeseran kimia atom karbon tersebut sedangkan tipe atom karbon metil (CH_3), metilen (CH_2) dan metin (CH) dapat dianalisis menggunakan data DEPT 135 dimana metin dan metil biasanya pada fase positif

sedangkan metilen pada fase negatif. Data DEPT 135 ini didukung oleh data HMQC yang menunjukkan hubungan proton dengan karbon yang berjarak satu ikatan sehingga dapat diketahui tipe atom karbon dan proton yang terikat olehnya. Data ^1H NMR menginformasikan banyaknya proton dari setiap jenis proton yang dapat diketahui dari luas puncak masing-masing sinyal proton, posisi proton - proton yang berdekatan dapat diketahui dari kopling (J), sedangkan banyaknya atom H tetangga dapat diketahui dari pemecahan puncak proton. Untuk mengetahui hubungan atom H yang memiliki 2 sampai 3 ikatan terhadap atom karbon dapat diketahui dari data HMBC sehingga data ini dapat digunakan untuk mempermudah penempatan dari masing-masing atom karbon yang saling berkaitan dilihat dari atom H nya. Dari semua data tersebut diharapkan dapat diketahui struktur senyawa yang sesuai dengan struktur senyawa isolat yang didapat.



DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1995, Peranan Tumbuhan Hutan Tropis dalam Pengembangan Obat-obatan. Simposium Nasional I Tumbuhan Obat dan Aromatik. Simpul Nasional APINMAP dan NESCO, Bogor, 10-12 Oktober 1995.
- Cao, S., K.N. Low, R.P. Glover, S.C. Crasta, S. Ng, A.D. Buss, M.S. Butler. 2006. Sundaicumones A and B, Polyprenylated Acylphloroglucinol Derivatives from *Calophyllum sundaicum* with Weak Activity against the Glucocorticoid Receptor, *Journal Natural Product*, 69, 707-709
- Chairul dan Sulianti, S.B. 2002. Pendayagunaan Sumber Daya Nabati (tumbuhan) dalam Pelayanan Kesehatan Masyarakat Menuju Indonesia Sehat 2010, *Berita IPTEK* 43 (1): 71-82.
- Chilpa, R.R., E.E. Muniz, T.R. Apan, B. Amekraz, A. Aumelas, C.K. Jankowski, M.V. Torres, et. al. 2004. Cytotoxic Effects of *Mammea* Type Coumarins

from *Calophyllum brasiliense*. *Journal Live Sci.* Vol 75. 1635-1647

Cottiglia, F., B. Dhanopal, O. Sticher, and J. Helmann. 2004. New Chromanone Acids with Anti Bacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*, *Journal Natural Product.* 537-541

Day, R.A., A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif (Terjemahan)*, Erlangga, Jakarta.

Dharmaratne, H.R. W., S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam. 1984. Triterpenes and Neoflavonoids of *Calophyllum lankaensis* and *Calophyllum thwaitestii*, *Phytochemistry*, Vol 23, No 11

Ee, G.C.L., V.Y.M. Jong, M.A. Sukari, M. Rahmani and A.S.M. Kua. 2009. Xanthones from *Calophyllum inophyllum*, *Pertanika Journal Science and Technology.* 17 (2), 307-312

Gritter, R.J., J. M. Bobbit, and A.E. Schawarting. 1985. *Pengantar Kromatografi (terjemahan)*, Edisi Ke-2, ITB, Bandung.

Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerjemah: Padmawinata, K. Bandung: ITB Press.

Hay, A.E., J.J. He Lesbeux, O. Duval, M. Laba, P. Grellier, P. Richomme. 2004. Antimalarial xanthones from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*, *Life Sciences* Vol 75, 3077-3085.

Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid 3, Badan Litbang Kehutanan, Jakarta.

Ito, C., M. Itoigawa, Y. Mishina, V. C. Filho and F. Enjo, et. al. 2003. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins, *Journal Natural Product*, Vol.66, 368-371.

Itoigawa, M.C., C. Ito, H.T.W. Tan, M. Kuchide, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, et. al. 2001. Cancer Chemopreventive Agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*. *Jurnal Natural Product.* Vol. 169. 15 - 19

Khan, N. U., N. Parveen, M. P. Singh, R.Singh, B. Achari, et al., 1996. Two isomeric benzodipyranone derivatives from *Calophyllum Inophyllum*, *Phytochemistry*, Vol. 42, 1181-1183.

Khan, M.R., M. Kihara, A.D. Omoloso. 2002. Antimicrobial activity of *Calophyllum soulattri*, *Fitoterapia* :73 (7-8): 741-3

- Kishore, Shyam N., et al. 1988. Soulatrone A, A C24 Terpenoid from Calophyllum Soulattri. *Phytochemistry*, Vol. 27, No. 2, pp. 527-530.
- Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Laure, F., P. Raharivelomananaa, J. Franc, O. Butauda, J.P. Bianchini, E. M. Gaydou. 2008. Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC–DAD of Calophyllum inophyllum leaf extracts from French Polynesia Islands, *Analytica Chimica Acta* Vol 624, 147–153
- Lemmens, R.H.M.J. and I. Soerianegara. 1994. *Plants Resources of South-East Asia*. Bogor: Prosea.
- Mckee, T. C., R.W. Fuller, C.D. Covington, J.H. Cardellina, II, R.J. Gulakowski, B.L. Krepps, J.B. McMahon, and M.R. Boyd. 1999. New Pyranocoumarins Isolated from Calophyllum lanigerum and Calophyllum teysmannii. *J. Nat. Prod.* Vol 59, 754-758
- Nigam, S.K., R. Banerji, S. Rebuffat, M. Cesario, C. Pawards, B. Bodo. 1988. Soulatrone A, A C24 Terpenoid from Calophyllum soulattri, *Phytochemistry*, Vol. 27, No. 2, 527-530
- Noldin, V. F, D.B Isaias and V.C Filho, 2006. Calophyllum genus: chemical and pharmacological importance, *Quim. Nova*, Vol.29, 549-554.
- Patil, .D., A.J. Freyer, D.S. Eggleston, R.C, Haltiwanger, M.F. Bean, et. al. 1993. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, Calophyllum inophyllum Linn, *Journal Medical Chemistry*, Vol.36, No.26, 4130-4138.
- Putra, Deddi P., Noveliandi, and Elidahanum H. 2008. Friedelin, a Triterpenoid Pentacyclic from the Leaves of Calophyllum soulattri Burm.f. (Guttiferae). *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol. 13, No. 2, 49-52.
- Rusdi. 1998. *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Padang: Pusat Penelitian Universitas Andalas.
- Santi, Sri Rahayu. 2009. Penelusuran Senyawa Sitotoksik Pada Kulit Biji Nyamplung (Calophyllum Inophyllum L.) Dan Kemungkinan Korelasinya Sebagai Antikanker. *Jurnal Kimia* 3 (2), 101-108
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.

- Stevens P. F. (1980), A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *J. Arnold. Arbor.* 61, 117-699.
- Still, W.C., M.Khan, and A. Mitra, 1978. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution, *Journal Organic Chemistry.* Vol.43. No.14.2923-2925
- Syahputra, Edy, D. Priyono, Dadang, S. Manuwoto, L.K. Darusman. 2006. Respons Fisiologi *Crocidolomia pavonana* terhadap Fraksi Aktif *Calophyllum soulattri*. *Hayati*, 7-12
- Su, Xiao-Hui, Man-Li Zhang, Li-Geng-Li, Chang-Hong Huo, Yu-Cheng Gu, et al., 2008. Chemical Constituents of the plants of the Genus *Calophyllum*, *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 5, 2579-2608.
- Subramanian, S. S., S.G.R. Nair. 1971. Myricetin-7-Glucoside from the Andraecium of the Flowers of *Calophyllum inophyllum*. *Journal Phytochemistry.* Vol. 10. 1679-1680
- Sulianti, Sri Budi, Emma Sri Kuncari, Sofnie M. Chairul. 2008. Pemeriksaan Farmakognosi Dan Penapisan Fitokimia Dari Daun Dan Kulit Batang *Calophyllum Inophyllum* Dan *Calophyllum Soulatri*. *Biodiversitas* Vol 7, 25-29.
- Yimdjo, M.C., A.G. Azebaze, A.E. Nkengfack, A.M. Meyer, B. Bodo, et. al. 2004. Antimicrobial and Cytotoxic Agents from *Calophyllum inophyllum*, *Phytochemistry*, Vol.65, 2789-2795.