



SKRIPSI – TK141581

**ISOLASI DAN PURIFIKASI *XANTHONE* DAN
COUMARIN DARI MINYAK NYAMPLUNG**

Oleh:

**Irma Ratnasari
NRP. 2311 100 108**

**Fitra Diani Trisnawati
NRP. 2311 100 121**

**Dosen Pembimbing :
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
NIP. 1976 03 23 2002 12 1001**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2016**



FINAL PROJECT –TK141581

**ISOLATION AND PURIFICATION OF XANTHONE
AND COUMARIN FROM NYAMPLUNG OIL**

By :

**Irma Ratnasari
NRP. 2311 100 108**

**Fitra Diani Trisnawati
NRP. 2311 100 121**

**Advisor Lecturer :
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
NIP. 1976 03 23 2002 12 1001**

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2016**

LEMBAR PENGESAHAN

ISOLASI DAN PURIFIKASI XANTHONE DAN COUMARIN DARI MINYAK NYAMPLUNG

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

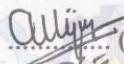
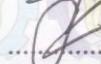
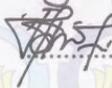
Irma Ratnasari

2311 100 108

Fitra Diani Trisnawati

2311 100 121

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D  (Pembimbing I)
2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng  (Penguji I)
3. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng  (Penguji II)
4. Siti Nurkhamidah, S.T., M.Sc.  (Penguji III)



Surabaya,
Januari 2016

ISOLASI DAN PURIFIKASI *XANTHONE* DAN *COUMARIN* DARI MINYAK NYAMPLUNG

Nama Mahasiswa : 1. Irma Ratnasari (2311 100 108)
2. Fitra Diani T. (2311 100 121)
Dosen Pembimbing : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D.
Jurusan : Teknik Kimia FTI-ITS

ABSTRAK

Tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut Nyamplung di Indonesia. Nyamplung merupakan salah satu jenis tanaman serba guna dan memiliki banyak khasiat, karena hampir seluruh bagian tanamannya (batang, daun, bunga, biji, dan getah) dapat menghasilkan bermacam produk yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai kebutuhan hidup manusia, salah satunya dalam bidang farmasi. Pada berbagai bagian dari *Calophyllum inophyllum* mengandung komponen bioaktif, termasuk diantaranya adalah kumarin dan xanthone. Dari penelitian yang pernah dilakukan, senyawa kumarin menunjukkan aktivitas anti HIV yang termasuk ke dalam NNRTI (*Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa xanthone dan kumarin yang dapat diisolasi dari fraksi polar minyak nyamplung. Minyak nyamplung diekstraksi sebanyak 8 *stage*, rasio pelarut terhadap minyak 5:1 (g/g), dan rasio pelarut PE-methanol 98% 75:25 (g/g). Fase methanol dikumpulkan dan diuapkan untuk mendapatkan fraksi lemak polar (*Polar Lipid Fraction*, PLF). Selanjutnya menerapkan metode *stirred batched-wise* dengan rasio *silica gel* terhadap PLF adalah 6:1 dan 8:1 (g/g) dan rasio perbandingan n-hexane terhadap PLF 10:1, 15:1, 20:1 dan 25:1 (g/g) pada suhu 20°C. Campuran tersebut diaduk pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit sampai beberapa *batch* dan terpisahnya xanthone dan kumarin. Hasil analisa TLC dari n-hexane pada proses *stirred batch-wise* dikelompokkan ke dalam 3 fraksi. Fraksi 1 adalah

hasil analisa TLC n-hexane yang tidak menunjukkan spot xanthone dan kumarin. Fraksi 2 adalah hasil analisa TLC yang menunjukkan spot xanthone. Fraksi 3 adalah hasil analisa TLC n-hexane yang menunjukkan spot kumarin. Fraksi xanthone dan kumarin diuji secara kualitatif dengan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) dan diuji secara kuantitatif dengan *Spectrophotometry* UV-VIS. Kadar xanthone pada fraksi 1 terbesar pada variabel rasio *silica gel* : n-hexane terhadap PLF 6:25:1 sebesar 3,0524%. Pada fraksi 2 kadar xanthone terbesar terdapat pada variabel 6:20:1 sebesar 4,5009%. Pada fraksi 3 kadar xanthone terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 sebesar 16,5230%. Kadar kumarin pada fraksi 1 terbesar pada variabel 8:25:1 sebesar 1,3342%. Pada fraksi 2, kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 sebesar 5,5287%. Pada fraksi 3, kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:20:1 sebesar 15,2557%.

Kata Kunci: *Nyamplung, Xanthone, Kumarin, Polar lipid fraction, Stirred batched-wise, TLC, GC-MS, Spectrophotometry UV-vis*

ISOLATION AND PURIFICATION OF XANTHONE AND COUMARIN FROM NYAMPLUNG OIL

Name : 1. Irma Ratnasari (2311 100 108)
2. Fitra Diani T. (2311 100 121)
Academic Advisor : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D.
Department : Chemical Engineering FTI-ITS

ABSTRACT

Calophyllum inophyllum plant or usually called Nyamplung in Indonesia. Nyamplung is one of multifunction plant and has so many savour because almost every part of the plant (stems, leaves, flowers, seeds, and gums) can produce a variety products that can be used for various human life needs, such as in farmation. In various parts of nyamplung contains several bioactive compounds, which are coumarin and xanthone. From research conducted coumarin showed anti-HIV activity that belongs to the NNRTI (Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor). This research aims to investigate the content of xanthone and coumarin compounds which are able to be isolated from polar lipid fraction of nyamplung oil. Nyamplung oil extracted 8 times, the solvent to oil ratio is 5:1 (g/g), and PE-methanol 98% solvent ratio is 75:25 (g/g). Methanol phase was collected and evaporated to obtain polar lipid fraction (PLF). Furthermore, the stirred batched-wise method was applied with the ratio of *silica gel*/PLF is 6:1 and 8:1 (g/g) and the ratio of hexane/PLF = 10:1, 15:1, 20:1, 25:1 (g/g) at the temperature 20°C. The mixture is then stirred at 1000 rpm for 10 minutes until a few batches and coumarin and xanthone obtained. The result of TLC analysis from n-hexane in stirred batch-wise's process is classified into 3 fraction. First fraction is the result of TLC analysis from n-hexane that there is no spot of xanthone and coumarin. Second fraction is the result of TLC analysis from n-hexane that there is spot of xanthone. Third fraction is the result

of TLC analysis that there is spot of coumarin. Coumarin and xanthone fraction then being analysed using TLC (*Thin Layer Chromatography*) and GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) for qualitative analysis and analysed using Spectrophotometry UV-VIS for quantitative analysis. The biggest purity of xanthone of first fraction from variable ratio *silica gel/n-hexane/PLF* 6:25:1 with purity 3,0524%. The biggest purity of xanthone for the second fraction is variable 6:20:1 with purity 4,5009%. The biggest purity of xanthone for the third fraction is variable 6:25:1 with purity 16,5230%. The biggest purity of coumarin of first fraction from variable 8:25:1 with purity 1,3342%. The biggest purity of coumarin for the second fraction is variable 6:25:1 with purity 5,5287%. The biggest purity of coumarin for the third fraction is variable 6:20:1 with purity 15,2557%.

Keywords: *Nyamplung, Xanthone, Coumarin, Polar lipid fraction, Stirred batched-reactor, TLC, GC-MS, Spectrophotometry UV-vis*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya berupa kesehatan akal, jasmani dan rohani kami dapat menyelesaikan Laporan Skripsi kami dengan judul **“ISOLASI DAN PURIFIKASI XANTHONE DAN COUMARIN DARI MINYAK NYAMPLUNG”**. Laporan Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program studi Strata-1 di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.

Selama penyusunan Laporan Skripsi ini, kami banyak sekali mendapat bimbingan, dorongan, serta bantuan dari banyak pihak. Untuk itu, kami ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

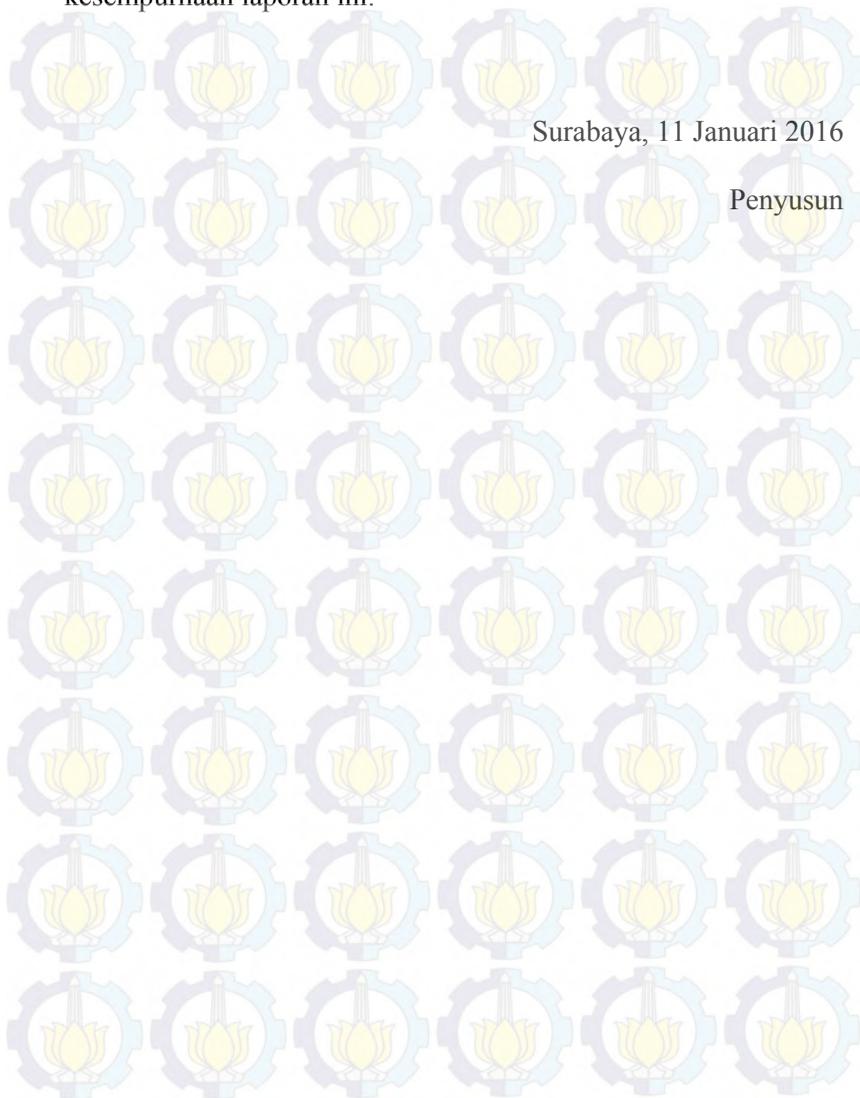
1. Bapak Juwari, ST., M.Eng selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
2. Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan saran, bimbingan dan dukungan kepada kami.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia
4. Bapak Prof. Ir. Tri Widjaja, M.Eng selaku penguji skripsi kami
5. Ibu Siti Nurkhamidah S.T., M.S., Ph.D selaku penguji skripsi kami
6. Bapak dan Ibu Dosen Pengajar yang telah memberikan ilmunya serta seluruh karyawan Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
7. Orang tua serta saudara-saudara kami atas doa, dukungan, bimbingan, perhatian dan kasih sayang yang selalu tercurah selama ini.
8. Teman-teman seperjuangan Biokim Crew serta serdadu K51 atas dukungan yang telah diberikan.

Kami menyadari bahwa penulisan laporan ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna, oleh karena itu kami sangat

mengharapkan saran dan masukan yang membangun demi kesempurnaan laporan ini.

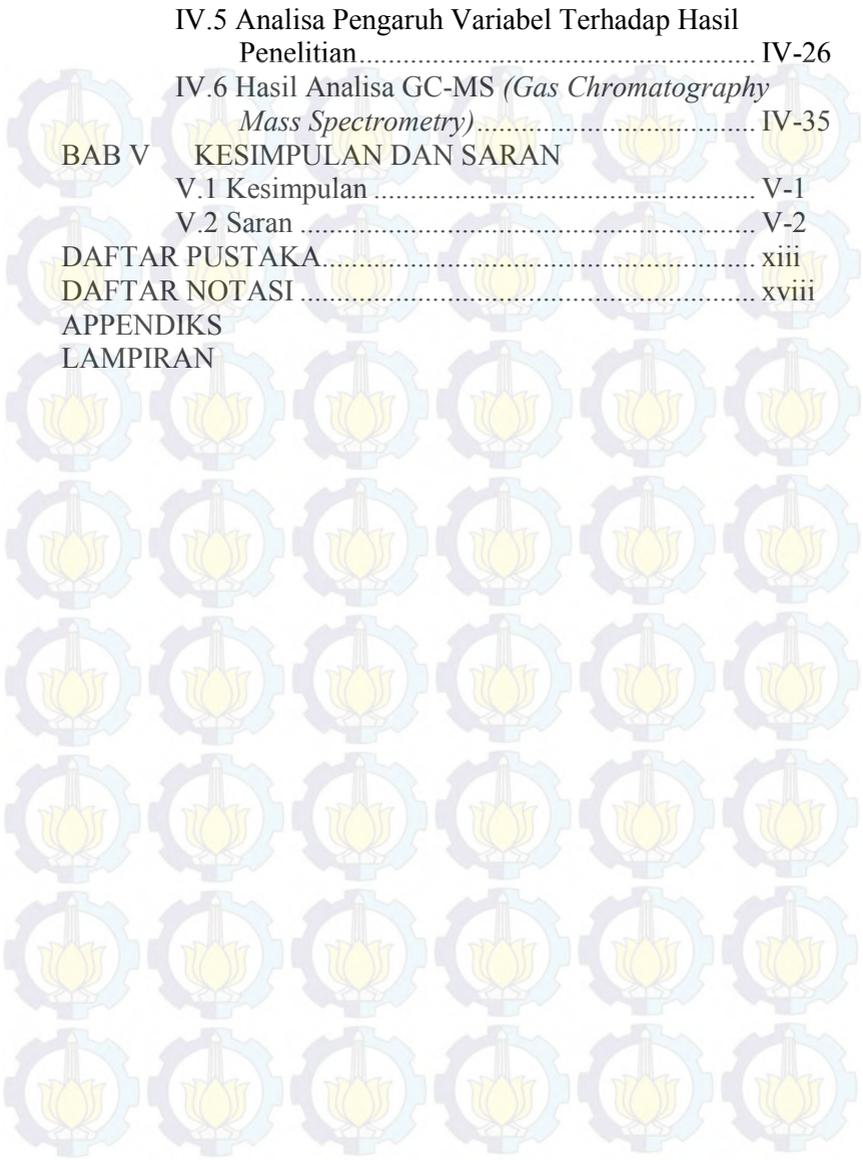
Surabaya, 11 Januari 2016

Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	I-1
I.2 Rumusan Masalah	I-4
I.3 Batasan Penelitian.....	I-4
I.4 Tujuan Penelitian	I-4
I.5 Manfaat Penelitian	I-5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Teori Penunjang	II-1
II.2 Metode Mendapatkan Ekstrak Minyak Nyamplung	II-12
II.3 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya	II-27
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Proses Isolasi Kumarin dan Xanthone dan Variabel	III-1
III.2 Bahan dan Peralatan	III-1
III.3 Metode Penelitian	III-2
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Ekstraksi Fraksi Lemak Polar (PLF) dari MinyakNyamplung	IV-2
IV.2 Pemisahan dan Pemurnian Xanthone dan Kumarin Menggunakan Metode <i>Stirred Batch-</i> <i>Reactor</i>	IV-5
IV.3 Hasil Analisa TLC pada Setiap Variabel.....	IV-8
IV.4 Hasil Analisa Spectrophotometry UV- Visible	IV-19



IV.5	Analisa Pengaruh Variabel Terhadap Hasil Penelitian.....	IV-26
IV.6	Hasil Analisa GC-MS (<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>).....	IV-35
BAK V	KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1	Kesimpulan	V-1
V.2	Saran	V-2
	DAFTAR PUSTAKA.....	xiii
	DAFTAR NOTASI.....	xviii
	APPENDIKS	
	LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

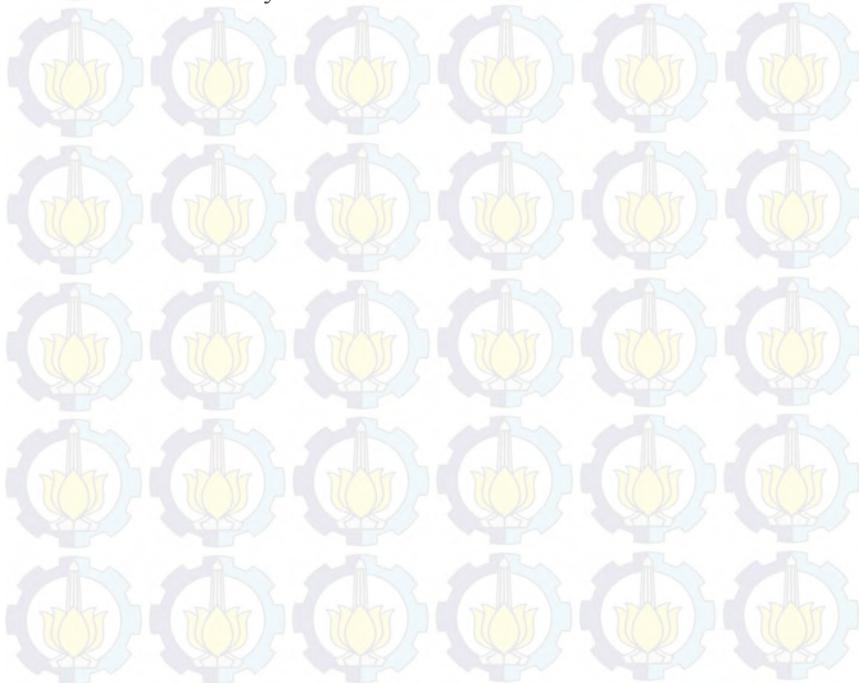
Gambar II.1	Persebaran <i>Calophyllum Inophyllum</i> di Dunia.....	II-1
Gambar II.2	Persebaran <i>Calophyllum Inophyllum</i> di Indonesia.....	II-2
Gambar II.3	Bagian-bagian Tanaman Nyamplung (<i>Calophyllum Inophyllum</i>).....	II-3
Gambar II.4	Komponen yang terkandung dalam <i>Calophyllum Inophyllum</i>	II-7
Gambar II.5	Kemungkinan posisi oksigenasi senyawa xanthone.....	II-10
Gambar II.6	Rumus bangun Sitosterol dan Kolesterol.....	II-12
Gambar II.7	Proses adsorpsi.....	II-16
Gambar II.8	Penggambaran Skema TLC dengan Campuran Dua Komponen.....	II-22
Gambar II.9	Gambar $R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1).....	II-23
Gambar II.10	Skema Susunan Spektrofotometer UV-Vis.....	II-25
Gambar III.1	Skema Tahapan Ekstraksi PLF.....	III-5
Gambar III.2	Sistem <i>Cross-Current</i> Pada Ekstraksi <i>Multistage</i>	III-6
Gambar III.3	Skema Metodologi Pemisahan Xanthone Dan Kumarin.....	III-7
Gambar III.4	Sistem <i>Batch</i> (B) Pada Metode <i>Stirred Batch-reactor</i>	III-8
Gambar IV.1	<i>Layer</i> di Corong Pemisah <i>Stage I</i>	IV-3
Gambar IV.2	Hasil analisa TLC menggunakan lampu UV.....	IV-4
Gambar IV.3	Hasil analisa larutan standar pada pelat TLC.....	IV-8
Gambar IV.4	Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:10:1.....	IV-9
Gambar IV.5	Hasil TLC n-hexane setiap batch	

variabel 6:15:1.....	IV 11
Gambar IV.6 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:20:1.....	IV-12
Gambar IV.7 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:25:1.....	IV-13
Gambar IV.8 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:10:1.....	IV-14
Gambar IV.9 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:15:1.....	IV-15
Gambar IV.10 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:20:1.....	IV-16
Gambar IV.11 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:25:1.....	IV-17
Gambar IV.12 Kurva kalibrasi xanthone.....	IV-20
Gambar IV.13 Kurva kalibrasi kumarin	IV-20
Gambar IV.14 Grafik pengaruh kadar xanthone dan kumarin terhadap variabel.....	IV-22
Gambar IV.15 Grafik pengaruh % recovery xanthone dan kumarin terhadap variabel.....	IV-24
Gambar IV.16 Grafik yield xanthone dan kumarin terhadap plf	IV-25
Gambar IV.17 Grafik uji normalitas dari desain expert.....	IV-29
Gambar IV.18 Grafik optimasi variabel dari desain expert.....	IV-34
Gambar IV.19 Hasil analisa GC-MS dari larutan standar xanthone.....	IV-35
Gambar IV.20 Fragmentasi standar xanthone	IV-35
Gambar IV.21 Hasil GC-MS pada fraksi 2	IV-36
Gambar IV.22 Hasil GC-MS pada Fraksi 3	IV-37
Gambar IV.23 Hasil GC-MS untuk larutan standar coumarin.....	IV-38
Gambar IV.24 Fragmentasi standar xanthone	IV-38
Gambar IV.25 Hasil GC-MS pada F2	IV-39

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Karakteristik Tanaman <i>Calophyllum inophyllum</i>	II-4
Tabel II.2	Properti Minyak Nyamplung	II-5
Tabel II.3	Kandungan Lemak dalam Tanaman Nyamplung	II-6
Tabel II.4	Manfaat Tiap Bagian Tanaman Nyamplung ...	II-7
Tabel II.5	Polaritas <i>Solvent</i>	II-13
Tabel II.6	Kondisi Operasi untuk Berbagai Proses Ekstraksi	II-15
Tabel II.7	Jenis dan karakteristik adsorben	II-18
Tabel II.8	Perbandingan proses separasi komponen.....	II-19
Tabel II.9	Kekuatan adsorben.....	II-21
Tabel IV.1	Hasil TLC setiap batch untuk pengelompokan Fraksi	IV-18
Tabel IV.2	Hasil perhitungan kadar dan % recovery xanthone dan kumarin.....	IV-21
Tabel IV.3	% Yield xanthone dan kumarin terhadap Plf.....	IV-25
Tabel IV.4	Hasil urutan percobaan untuk xanthone dengan menggunakan Desain Expert.....	IV-27
Tabel IV.5	Hasil urutan percobaan untuk coumarin dengan menggunakan Desain Expert.....	IV-28

Tabel IV.6	ANOVA pengaruh variabel terhadap kadar xanthone.....	IV-30
Tabel IV.7	ANOVA pengaruh variabel terhadap kadar coumarin	IV-31
Tabel IV.8	ANOVA pengaruh variabel terhadap recovery xanthone.....	IV-32
Tabel IV.9	ANOVA pengaruh variabel terhadap recovery coumarin	IV-32
Tabel IV.10	ANOVA pengaruh variabel terhadap yield xanthone.....	IV-33
Tabel IV.11	ANOVA pengaruh variabel terhadap yield coumarin	IV-33
Tabel IV.12	Senyawa dalam F2	IV-40
Tabel IV.13	Senyawa dalam F3	IV-41



DAFTAR NOTASI

Notasi	Keterangan
C	<i>Coumarin</i> , kumarin
DG	<i>Diglyceride</i> , digliserida
FFA	<i>Free fatty acid</i> , asam lemak bebas
FTIR	<i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i>
g	Gram
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
MG	<i>Monoglyceride</i> , monogliserida
mg	miligram
ml	mililiter
NNRTI	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NPLF	<i>Non polar lipid fraction</i>
PE	<i>Petroleum eter</i>
PLF	<i>Polar lipid fraction</i>
TG	<i>Triglyceride</i> , trigliserida
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
U	<i>Unknown component</i> , komponen tak terdefinisi
UV	<i>Ultraviolet</i>
UV-VIS	<i>Ultraviolet-Visual</i>
X	Xanthone

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Tanaman mangrove atau yang lebih dikenal dengan sebutan tanaman bakau di Indonesia adalah tanaman yang memiliki banyak kegunaan dan sering dimanfaatkan oleh masyarakat, baik itu mulai dari akar sampai daun dari tumbuhan mangrove sendiri. Tanaman mangrove dapat ditemukan di daerah pesisir Indonesia, dimana 60% total mangrove yang tumbuh di Asia Tenggara tumbuh di wilayah Indonesia dengan sisanya tersebar di Malaysia (11,7%), Myanmar (8,8%), Papua Nugini (8,7%), dan Thailand (5,0%) (Giesen et al, 2006).

Salah satu jenis tanaman mangrove yang memiliki nilai ekonomis tinggi adalah tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*), tanaman ini dikatakan memiliki nilai ekonomis tinggi karena hampir semua bagian tanamannya (batang, daun, bunga, biji, dan getah) dapat menghasilkan berbagai macam produk yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Hanya saja, sampai saat ini sangat sedikit masyarakat Indonesia yang mengetahuinya. Umumnya, oleh masyarakat Indonesia tanaman nyamplung hanya dikenal sebagai tanaman yang bijinya dapat menghasilkan minyak, dimana minyak dari biji tanaman nyamplung dapat digunakan untuk biodiesel. Padahal, selain bijinya yang dapat digunakan sebagai minyak, seluruh bagian dari tanaman nyamplung dapat dimanfaatkan menjadi barang-barang berguna. Diantaranya, kayu pohon ini dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan papan tempat tinggal bagi manusia maupun kapal dan perabotan lainnya, akarnya berfungsi untuk menjaga daerah pantai dari abrasi. Selain itu, daun tanaman ini juga berfungsi untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti iritasi pada mata, migrain, dan vertigo (Ling, 2009).

Selain semua bagian dari tanaman nyamplung dapat dimanfaatkan untuk kebutuhan manusia, tanaman ini juga mempunyai keunggulan, antara lain adalah:

1. Dapat dikembangkan di seluruh pantai Indonesia
2. Budidayanya relatif mudah, yaitu dapat ditanam secara monokultur atau tumpangsari dengan tanaman pertanian dan berbuah sepanjang tahun
3. Mempunyai peran ekologis yang penting, yaitu sebagai tanaman pemecah gelombang, pematah angin, dan konservasi gempa yang terjadi di pantai

Tanaman nyamplung tumbuh secara alami di bagian Afrika Timur, pesisir selatan India ke Malaysia, Australia utara dan Pulau Pasifik. Spesies ini tersebar luas di sepanjang pantai Afrika timur (dari Kenya ke utara Mozambik), Madagaskar dan di beberapa daerah di India. Selain itu juga tersebar di bagian Asia tropis, Australia utara dan pulau-pulau di Samudera Pasifik. Spesies ini banyak ditanam di bagian selatan Cina (Lim, 2012). Penyebaran tanaman nyamplung di Indonesia sendiri meliputi wilayah Sumatera Barat (Taman Nasional (TN) Perbak), Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa (TN Alas Purwo, TN Kepulauan Seribu, TN Baluran, TN Ujung Kulon, Cagar Alam (CA) Pananjung Pangandaran, Taman Wisata Alam (TWA) Pangandaran, Kawasan Wisata (KW) Batu Karas dan Pantai Carita Banten), Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi, Maluku Utara (Halmahera dan Ternate), Nusa Tenggara Timur, dan Papua (Pulau Yapen, Biak, Nabire, Manokwari, S norong, dan Fakfak). Umumnya tanaman ini terdapat pada daerah pesisir pantai (Supriadi, 2013).

Tanaman nyamplung tumbuh subur di daerah pantai atau di sepanjang daerah dengan ketinggian rendah, sekitar 0-200 meter (660 ft), mencapai 800 meter (2000 ft) di daerah yang dilewati garis ekuator, dengan rata-rata suhu tahunan 18-33°C (64-91°F); serta curah hujan per tahun 1000-5000 mm (40-200 in). tanaman nyamplung dapat tumbuh hingga 9-20 meter (25-65 ft) saat umurnya dewasa, menghasilkan kayu dan minyak dari intinya sebagai produk utama. Produksi biji yang menghasilkan minyak bisa mencapai 100 kg (220 lb) biji/pohon/tahun, dengan *yield* 5 kg (11 lb) minyak (Friday and Okano, 2006).

Tanaman nyamplung mengandung banyak komponen kimia yang mengandung bahan bioaktif yang berkhasiat obat yaitu menghasilkan metabolit sekunder dari golongan *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NNRTI). NNRTI sendiri merupakan kelompok senyawa yang menghambat aktifitas enzim *reverse transcriptase* dari HIV-1 (Pawar et al, 2007).

Cechinel Filho et al. (2009) menyebutkan bahwa pohon nyamplung mengandung beberapa komponen bioaktif, di antaranya adalah: *Xanthone*, *Coumarin*, *Chromanone* (*Flavonoid*, *Biflavonoid*), *Tripenes*, *Tripenoid*, dan *Steroid*. Sedangkan menurut Ling (2009), *C. inophyllum* mengandung senyawa fitokimia yang ditaksir dapat digunakan sebagai obat-obatan untuk berbagai penyakit. Senyawa tersebut di antaranya adalah: *Inophynone*, *Canophyllol*, *Canophyllic acid*, *Calophyllolide*, *Inophyllolide*, *Inophyllum B*, *C*, *P*, dan *E*, *Jacaerubin*, (+)-*Calanolide A*, *Inocalophyllins A* dan *B*, *Calophynone*, *Calophyllumin C*, dan *Inophyllin A*.

Sampai saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui kelebihan-kelebihan lain yang dimiliki oleh tanaman ini, terutama pembuatan biodiesel yang menggunakan bahan baku minyak tanaman nyamplung yang diekstrak dari biji tanaman ini. Sayangnya, dari sekian banyak percobaan yang telah dilakukan, baru sedikit percobaan yang ditujukan untuk meneliti senyawa kumarin yang terdapat di dalam minyak tanaman nyamplung serta senyawa bioaktif di dalamnya. Hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya secara umum berbeda satu sama lain, hal ini disebabkan oleh perbedaan wilayah tempat bahan baku digunakan.

Mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, di dalam minyak nyamplung terdapat senyawa xanthone dan kumarin. Namun, jumlah dari senyawa tersebut tidak dapat diketahui hasilnya ketika pemilihan suhu dilakukan pada 0°C dan 20°C. Oleh karena itu, untuk melengkapi penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, penelitian ini dilakukan lagi dengan tujuan untuk mengetahui jumlah kandungan xanthone dan

kumarin yang ada dalam minyak tanaman nyamplung yang tumbuh di Cilacap, Jawa Tengah.

I.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijabarkan sebelumnya, maka dapat dirumuskan beberapa masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini, yaitu:

1. Berapa jumlah kandungan senyawa kumarin dan xanthone yang dapat diisolasi dari fraksi polar minyak nyamplung?

I.3. Batasan Penelitian

Agar penelitian ini tidak menyimpang dari ketentuan yang digariskan, maka diambil batasan dan asumsi sebagai berikut:

1. Bagian yang akan diteliti adalah minyak nyamplung yang berasal dari inti di dalam biji tanaman nyamplung. Minyak nyamplung yang digunakan berasal dari Cilacap, Jawa Tengah.
2. Ekstrak minyak dipisahkan dari senyawa polar dan non-polarnya menggunakan *Multi Stage Extraction*.
3. Metode isolasi xanthone dan kumarin yang digunakan adalah *stirred batch-reactor* dan analisa kandungan xanthone dan kumarin di dalam fraksi polar minyak nyamplung akan diidentifikasi secara kualitatif menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-VIS, serta analisis menggunakan GCMS

I.4. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mengetahui jumlah kandungan senyawa xanthone dan kumarin yang dapat diisolasi dari fraksi polar minyak nyamplung.

I.5. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Dapat mengetahui senyawa yang terkandung di dalam fraksi polar minyak nyamplung.
2. Dapat mengetahui cara untuk mengisolasi senyawa kumarin dan xanthone yang terkandung di dalam fraksi polar minyak nyamplung.
3. Dapat mengetahui jumlah kandungan senyawa kumarin dan xanthone yang berhasil diisolasi dari fraksi polar minyak nyamplung
4. Dapat mengedukasi masyarakat mengenai manfaat-manfaat tanaman nyamplung selain minyaknya yang biasanya digunakan sebagai bahan baku biodiesel.
5. Dapat mengetahui potensi lain yang dapat dikembangkan dari minyak nyamplung, terutama fungsi komponen bioaktifnya.
6. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai potensi minyak nyamplung dalam bidang kesehatan.

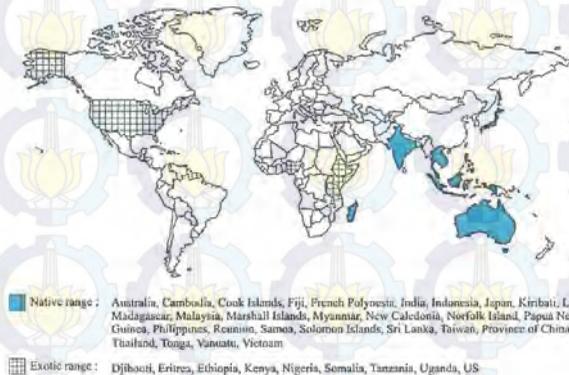
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Teori Penunjang

II.1.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* (Nyamplung) di Indonesia.

Nama ilmiah dari *Calophyllum inophyllum* diambil dari bahasa Yunani *Kalos*, yang berarti cantik dan *Phyllon* yang berarti daun. Di Inggris, pohonnya dikenal sebagai *beautiful leaf* (terjemahan dari bahasa Yunani), *Indian Laurel* (karena berasal dari India), *Alexandrian Laurel*, dan *Beach Calophyllum* (karena pohonnya biasanya tumbuh di tepi pantai). Di Tahiti, pohon ini dinamakan *ati* dan buahnya disebut *tamanu*. Di Samoa, pohon ini dikenal dengan nama *fetau*, *damanu* di Pulau Fiji, dan *te itai* di Pulau Kiribati. Sedangkan di Indonesia, tanaman ini disebut dengan *Nyamplung*, *Penaga Laut* di Malaysia, dan *Puna* di Pulau Lakshadweep. Sedangkan di Hawaii tanaman ini dinamakan *Kamani Tree* dan dikenal dengan sebutan *Foraha Tree* di Madagascar (Ling, 2009).



Gambar II.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di dunia

Menurut Ong et al, 2014 Peta persebaran nyamplung atau *Calophyllum inophyllum* di dunia cukup luas. Spesies ini umumnya ditemukan di daerah yang memiliki iklim tropis. Di

dunia, spesies ini terdapat di negara-negara seperti Australia, Cambodia, Pulau Cook, Fiji, French Polynesia, India, Indonesia, Jepang, Kiribati, Laos, Madagaskar, Malaysia, Marshall Islands, Myanmar, New Caledonia, Pulau Norfolk, Papua Nugini, Filipina, Reunion, Samoa, Pulau Solomon, Sri Lanka, Taiwan, Provinsi China, Thailand, Tonga, Vanuatu, dan Vietnam. Sedangkan untuk spesies yang exotic (endemik pada suatu wilayah) dapat ditemukan di Negara Djibouti, Eritrea, Ethiopia, Kenya, Nigeria, Somalia, Tanzania, Uganda, dan US.

Di Indonesia sendiri, tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut tanaman nyamplung tersebar hampir merata di seluruh wilayah Indonesia. Dari Peta dibawah ini, dapat diketahui bahwa wilayah persebaran tanaman ini mencakup Pulau Sumatera (Sumatera Barat, Riau, Kepulauan Riau, Lampung, dan Kepulauan Bangka Belitung), Pulau Jawa (Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah Jogjakarta, Jawa Timur), Pulau Bali, Pulau Nusa Tenggara Timur dan Nusa Tenggara Barat, Pulau Kalimantan (Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, dan Kalimantan Selatan), Pulau Sulawesi (Sulawesi Utara, Gorontalo, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara), Maluku dan Kepulauan Maluku Utara, dan Papua (Sudrajat, 2009).



Gambar II.2 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di Indonesia

II.1.2 Karakteristik Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Tanaman *Calophyllum inophyllum* memiliki berbagai macam nama sebutan yang berbeda-beda di setiap wilayah. Di Indonesia kebanyakan menyebut tanaman ini dengan nama Nyamplung. Di Inggris, warga setempat menyebutnya dengan Tamanu. Di Hawaii orang sekita menyebutnya dengan Kamani, dan masih banyak lagi sebutan yang lain (Dweck and Meadows, 2002). Tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut Nyamplung memiliki taksonomi sebagai berikut :

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

(Heyne, 1987)



Gambar II.3 Bagian-bagian tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Nyamplung adalah tanaman yang mudah tumbuh di daerah yang bertanah pasir dan daerah pesisir pantai berudara panas (Wahyuni, et al, 2010). Nyamplung juga dapat tumbuh baik pada ketinggian 0-800 mdpl seperti di hutan, pegunungan, dan rawa-rawa (Baity, et al, 2011). Tanaman ini memiliki karakteristik sebagai berikut :

Tabel II.1 Karakteristik tanaman *Calophyllum inophyllum*

Nama Tanaman	Bagian	Ciri-ciri
	Batang	Berkayu, bulat, dan berwarna coklat atau putih kotor.
	Daun	Berwarna hijau, tunggal, bersilang berhadapan, bulat memanjang atau bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi rata, pertulangan bersirip, panjang 10-21 cm, tangkai 1,5-2,5 cm, daging daun seperti kulit/belulang.
	Bunga	Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun yang teratas, berkelamin dua, diameter 2-3 cm, daun berkelopak empat, tidak beraturan, benang sari banyak, tangkai putih membengkok, kepala putik bentuk perisai, daun mahkota empat, bentuk perisai.
	Buah	Batu, bulat seperti peluru dengan mancung kecil di depannya, diameter 2,3-3,5 cm, berwarna coklat.
	Akar	Tunggang, bulat, berwarna coklat.

*Yunitasari et al, 2008

II.1.3 Properti dan Kandungan Minyak Nyamplung

Tanaman nyamplung dapat tumbuh hingga 20-30 meter. Ketika dewasa, satu buah pohon dapat menghasilkan hingga 100 kg buah, dan memproduksi sekitar 18 kg minyak. Inti buah nyamplung mengandung minyak dengan jumlah yang cukup tinggi, yaitu sekitar 75% berat (Venkanna, 2009). Jumlah ini tidak jauh berbeda dengan apa yang diutarakan Hemavathy and Prabhakar (1990) yaitu sebesar 60,1%.

Dari penelitian yang dilakukan oleh Venkanna (2009) tentang properti minyak nyamplung, didapatkan hasil yang dijabarkan pada tabel II.2 berikut ini:

Tabel II.2 Properti minyak nyamplung

Properti	Nilai
<i>Density</i> , kg/m ³	910,0
K. V., at 400°C	32,48
<i>Flash point</i> , °C	224
<i>Saponification value</i>	191 – 202
<i>Iodine value</i>	82 – 98
<i>Acid value</i> mg KOH/g	4,76

Triacylglycerol (TAG) adalah kandungan yang dominan di dalam minyak, yaitu sebesar 76,7%, diikuti oleh *Free Fatty Acid* (FFA) sebesar 7,0%, dan yang terakhir *Diacylglycerol* (DAG) sebesar 5,1%. Sisa dari % beratnya adalah milik *Monoacylglycerol* (MAG) di mana, hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh hidrolisis TAG selama masa penyimpanan (Crane et al., 2005).

Berikut ini pada **Tabel II.3** diberikan kadar kemurnian tiap komponen di dalam minyak nyamplung dari beberapa sumber.

Tabel II.3 Kandungan lemak dalam tanaman nyamplung

Komponen	% Kemurnian		
	Minyak Nyamplung ^a	Minyak Nyamplung ^b	Minyak Nyamplung ^c
Trigliserida	74,00	54,17	72,46
Digliserida	6,36	4,08	7,43
Monogliserida	3,00	2,97	2,55
FFA	8,85	4,33	9,16
Others	7,79	34,45	8,41

a diadaptasi dari Dweck, 2002

b diadaptasi dari Rudi Wijaya et al., 2009

c diadaptasi dari Gunawan et al., 2014

II.1.4 Manfaat dan Kandungan dalam Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Calophyllum Inophyllum (Nyamplung) merupakan tanaman serba guna, mulai dari manfaat pohonnya sebagai tanaman konservasi dan penghijauan sampai pada produk yang dihasilkan yaitu kayu dan hasil hutan bukan kayu (HHBK) berupa biji yang dimanfaatkan sebagai penghasil minyak nabati (Wibowo et al, 2011).

Di dunia farmasi, tanaman ini dikenal dapat berfungsi sebagai anti bakteri, anti kankerantineoplastic, anti inflamasi, antiplatelet, antipsikotik, antiviral, Photoprotective, Molluscicidal, dan Piscicidal (Ling et al, 2009). Berikut ini manfaat tanaman nyamplung yang didapat dari berbagai sumber :

Tabel II.4 Manfaat Tiap Bagian Tanaman Nyamplung

Nama Bagian Tanaman	Ciri-ciri
Getah	Penduduk Samoa menggunakan getah tanaman ini dengan mengoleskannya di ujung panah mereka untuk berburu. Getah ini menyebabkan kebutaan jika terjadi kontak dengan mata, dan akan menyebabkan kematian apabila terbawa ke sirkulasi darah.
Akar	Di Mauritius rebusan akar tanaman ini digunakan untuk mengobati bisul dan <i>ophthalmia</i> (mata bengkak).
Kulit Pohon	Kulit pohon dapat digunakan sebagai obat analgesic, anti-plasmodic, dan mengandung tannin. Di India dan Indo-China, kulit pohon yang ditumbuk digunakan dalam orchitis. Di Indo-China, kulit pohon digunakan untuk mengobati disentri. Sementara di Indonesia, rebusan kulit pohon digunakan setelah melahirkan sebagai pembersih alat kelamin dan pada penyakit gonorrhoea.
Daun	Rebusan daun hangat digunakan untuk luka toreh, luka lecet, jerawat, dan beberapa penyakit kulit ringan lain akibat bakteri. Di Madagaskar, Linga, dan Fiji, air rebusan ini juga digunakan untuk mengobati mata bengkak.

*) Sumber: Lim, 2012

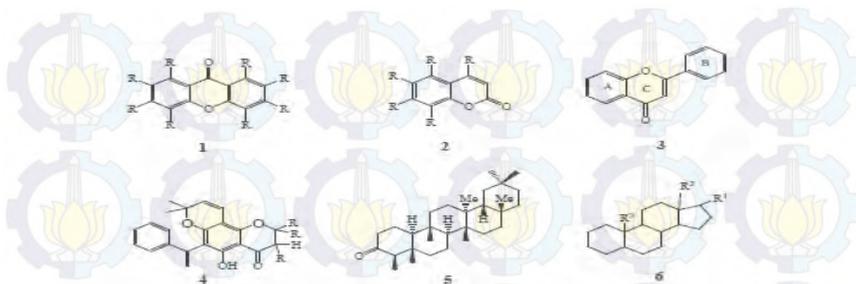
Karena seluruh bagian tanaman ini dapat bermanfaat dalam mengobati berbagai macam penyakit, maka sejumlah peneliti telah melakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan fitokimia dalam tanaman nyamplung ini. Menurut Ling et al, 2009 senyawa yang terkandung didalam tanaman ini

diantaranya, *Inophynone*, *Canophyllol*, *Canophyllic acid*, *Calophyllolide*, *Inophyllolide*, *Inophyllum B*, *C*, *P*, and *E*, *Jacareubin*, (+)- *Calanolide A*, *Inocalophyllins A* dan *B*, *Calophynone*, *Calophyllumin* dan *C*, *Inophyllin A*. Sementara dari Su et al, 2008 menyebutkan bahwa menurut Cechinel Filho et al. (2009), pada berbagai bagian dari pohon *Calophyllum inophyllum* mengandung komponen bioaktif, termasuk diantaranya adalah : *xanthones*, *coumarins*, *chromanones (flavonoids, biflavonoids)*, *tripenes*, *tripenoids* dan *steroids*.

Menurut Ling et al 2009, penelitian lebih lanjut mengenai senyawa kumarin di dalam tanaman ini. Kumarin dalam *Calophyllum inophyllum* mengandung dua komponen, yaitu *Calanolide A* dan *Calanolide B*. Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa senyawa kumarin dalam *Calophyllum inophyllum* ini mungkin dapat efektif dalam mengobati penyakit kanker dan menghambat virus HIV.

Menurut Lim, T. K. 2012, dalam bukunya menurut Li et al, 2007, sedikitnya sembilan komponen telah di isolasi dari daun *Calophyllum inophyllum*, diantaranya : *2-hydroxyxanthone*; *4-hydroxyxanthone*; *1,5-dihydroxyxanthone*; *1,7-dihydroxyxanthone*; *1,3,5-trihydroxy-2methoxyxanthone*; *6-6-deoxyjacareubin*; *flavonoids*, *amentoflavone*; *kaempferol-3-O- α -L-rhamnoside*; and *quercetin-3-O- α -L-rhamnoside*.

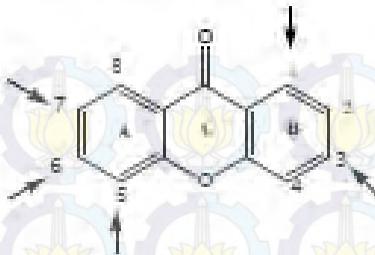
Dari ketiga penelitian mengenai daun, terdapat beberapa perbedaan sekaligus persamaan yang didapat dari hasil analisa kandungan daun *Calophyllum inophyllum*. Beberapa senyawa yang sama yang telah di isolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* cukup beragam, diantaranya senyawa turunan xanthone (**1**) (Yimdjo et al, 2004; linuma et al, 1994), kumarin (**2**) (Su et al, 2008), flavonoid (**3**) (linuma, 1994), benzodipiranon (**4**) (Khan et al, 1996), Triterpenoid (**5**) (Yimdjo et al, 2004; Kumar et al, 1976) dan steroid (**6**) (Su et al, 2008). Dibawah ini akan dijelaskan secara singkat mengenai komponen-komponen yang terkandung dalam *Calophyllum inophyllum*.



Gambar II.4 1. Xanthone, 2. Kumarin, 3. Flavonoid, 4. Benzodipiranon, 5. Triterpenoid, 6. Steroid. Komponen yang terkandung dalam *Calophyllum inophyllum*.

1) Xanthone

Xanthone merupakan senyawa dengan kerangka dasarnya dua fenil yang dihubungkan dengan jembatan karbonil dan oksigen (eter). Xanthone mempunyai kerangka dasar yang terdiri atas 13 atom karbon yang membentuk susunan C6-C1-C6. Biosintesis senyawa xanthone belum diketahui secara jelas namun diduga masih berhubungan dekat dengan biosintesis senyawa flavonoid dan stilbenoid. Hal ini bisa dilihat dari tipe oksigenasi dua jenis cincin aromatik yaitu satu cincin aromatik (A) memperlihatkan ciri berasal dari jalur sikimat dan satu cincin (B) lagi memperlihatkan ciri berasal dari jalur asetat-malonat. Senyawa xanthone yang di isolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* memperlihatkan kondisi terdapat senyawa yang terprenilasi dan maupun tidak terprenilasi. Kebanyakan senyawa xanthone yang diisolasi dari tumbuhan ini menunjukkan adanya ciri khas, salah satunya adalah gugus hidroksi pada C1. Kemungkinan posisi oksigenasi ditunjukkan pada gambar berikut ini.



Gambar II.5 Kemungkinan posisi oksigenasi senyawa xanthone

Senyawa xanthone yang telah diisolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* cukup banyak. Kebanyakan senyawa tersebut mengandung gugus tambahan terutama gugus isoprenil. Dalam dunia medis, xanthone memiliki fungsi sebagai antioksidan dan anti kanker. Gugus hidroksil yang terdapat dalam rangkaian struktur xanthone efektif mengikat radikal bebas di dalam tubuh (Blanko-Ayala, 2013).

2) Kumarin

Senyawa bahan alam yang juga banyak diisolasi dari tumbuhan *Calophyllum inophyllum* adalah golongan kumarin. Biosintesis senyawa kumarin berasal dari jalur sikimat, atau masih sejalur dengan golongan fenil propanoid. Dari segi biogenetik, kerangka benzopiran-2-on dari kumarin berasal dari asam-asam sinamat melalui orto-hidrolaksi. Asam orto-kumarat yang dihasilkan setelah menjalani isomerisasi cis-trans mengalami kondensasi (Lenny, 2006). Ciri khas senyawa ini adalah adanya gugus lakton yang terbentuk dari asam pada ujung gugus propan dengan hidroksi pada gugus fenil. Oksigenasi senyawa kumarin pada cincin aromatiknya juga khas, yaitu berselang-seling. Struktur senyawa turunan kumarin dilihat dari gugus yang terikat pada C4 dapat dibedakan menjadi 4-metilkumarin, 4-fenilkumarin, dan 4-(n-propil) kumarin. Diantara ketiganya senyawa

kumarin dengan gugus fenil dan n-propil pada C4 merupakan senyawa yang terbanyak ditemukan. Dalam dunia medis, kumarin memiliki fungsi sebagai antioksidan dan anti kanker. Gugus hidroksil yang terdapat dalam rangkaian struktur kumarin efektif mengikat radikal bebas di dalam tubuh (Blanko-Ayala, 2013).

3) **Benzodipiranon**

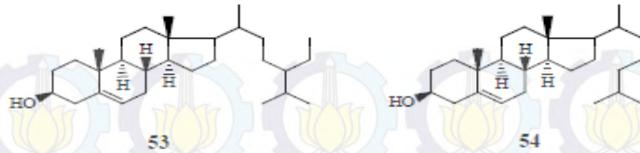
Benzodipiranon merupakan senyawa turunan dari kromanon. Senyawa-senyawa ini memiliki kerangka yang mirip dengan stilben dengan tambahan dua gugus prenil.

4) **Triterpenoid**

Triterpenoid merupakan golongan senyawa terpenoid yang terdiri dari 30 atom C atau 6 unit isopren. Triterpenoid dalam jaringan tumbuhan dapat dijumpai dalam bentuk bebasnya, tetapi juga banyak dijumpai dalam bentuk glikosidanya. Triterpenoid terbagi dalam struktur siklik dan asiklik. Triterpenoid asiklik yang penting hanya squalene yang dianggap sebagai senyawa antara dalam biosintesis steroid. Triterpenoid yang paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik. Kerangka yang paling banyak dijumpai pada senyawa golongan triterpenoid adalah ursam, lupan, oleanan, dan friedelin (Kristanti dkk, 2008).

5) **Steroid**

Steroid ditemukan pada *Calophyllum inophyllum* adalah sitosterol (**53**) (Kumar, et al 1976; Goh et al, 1991) dan kolesterol (**54**) (Ali et al, 1962). Sterol adalah steroid yang memiliki gugus hidroksi pada C3nya. Sterol dijumpai dalam bentuk bebas ataupun bergabung dengan glukosa membentuk glikosida (sterolin) atau sebagai ester asam lemak. Sterol merupakan senyawa bahan alam yang umumnya tersusun dari 27 atom karbon (Kristianti dkk, 2008).



Gambar II.6 53. Sitosterol, 54. Kolesterol Rumus bangun Sitosterol dan Kolesterol.

6) Flavonoid

Flavonoid mempunyai kerangka dasar yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana rantai benzene (C_6) terikat pada suatu rantai propana (C_3) sehingga membentuk susunan $C_6-C_3-C_6$. Golongan terbesar dari flavonoid adalah flavon. Senyawa flavon memiliki kerangka 2-fenil kroman dimana posisi orto dari cincin A dan atom karbon yang terikat pada cincin B dari 1,3 dialilpropana dihubungkan oleh jembatan oksigen sehingga membentuk cincin heterosiklik yang baru (Lenny, 2006).

II.2 Metode Mendapatkan Ekstrak Minyak Nyamplung

Polaritas merupakan salah satu ciri ikatan kimia, dimana dua atom yang berbeda dalam molekul yang sama memiliki elektronegativitas yang berbeda. Akibatnya, elektron-elektron di dalam ikatan tidak dibagi sama rata oleh dua buah atom. Hal ini mengakibatkan medan elektrik (berkutub) yang asimetris. Ikatan kovalen molekul dapat dideskripsikan sebagai polar atau nonpolar. Senyawa polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat satu atom mempunyai keelektronegatifan yang substansial lebih besar daripada yang lain. Semakin elektronegatif suatu atom, semakin besar tarikannya terhadap ikatan elektron. Hasilnya adalah suatu ikatan dengan distribusi rapat elektron yang tak merata. Senyawa non-polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat atom dengan keelektronegatifan yang sama atau hampir sama membentuk ikatan kovalen, dimana kedua atom menerapkan tarikan yang sama atau hampir sama terhadap elektron ikatan. Umumnya, ikatan karbon-karbon dan ikatan

karbon-hidrogen adalah jenis ikatan nonpolar yang paling umum (Fessenden, R.J., 1986)

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa polar dan non-polar dari minyak tanaman nyamplung, hal yang perlu dilakukan pertama kali adalah memisahkan antara kandungan polar dan non-polarnya. Pemisahan ini berdasarkan pada *solvent* yang digunakan.

Pemilihan *solvent* tersebut berdasarkan *polarity index*. Air merupakan *solvent* polar dengan *polarity index* sebesar 9. Sedangkan metanol merupakan senyawa agak polar dengan *polarity index* sebesar 5,1. Untuk n-heksana/*petroleum eter* merupakan senyawa non-polar dengan *polarity index* sebesar 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam daun nyamplung akan terlarut pada *solvent* polar begitu pun sebaliknya. Polar atau non-polar suatu senyawa dapat dilihat pada tabel II.5 berikut ini:

Tabel II.5 Polaritas *solvent* (Sadek, P. 2002)

Relative Polarity	Formula	Group	Solvents
 Non-polar	R-H	Alkanes	Petroleum ethers, hexanes, ligroin
	Ar-H	Aromatics	Toluene
	R-O-R	Ethers	Diethyl ether
	R-X	Alkyl halides	Trichloromethane, chloroform
	R-COOR	Esters	Ethyl acetate
	R-CO-R	Aldehydes, Ketones	Acetone, MEK

Lanjutan II.5 Polaritas *solvent* (Sadek, P. 2002)



R-NH ₂	Amines	Phyridine, triethylamine
R-OH	Alcohols	MeOH, EtOH, IPA, Butanol
R-COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
R-COOH	Carboxylic Acid	Ethanoic acid
Polar H-O-H	Water	

II.2.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat atau beberapa dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Pelarut di sini, tidak atau hanya sebagian larut dengan padatan atau cairan dengan kontak secara terus-menerus agen aktif berpindah dari campuran padatan/cairan (*raffinate*) menuju pelarut (*extract*). Setelah pencampuran dua fase, proses pemisahan dilakukan dengan prinsip gravitasi atau dengan gaya sentrifugal (Games, 2004).

Pada percobaan yang dilakukan oleh Hargono dan Haryani (2010), dijelaskan tentang pengaruh jenis *solvent* pada berbagai variasi *tray* dari jumlah 6 – 10 buah untuk pengambilan minyak nyamplung dengan metode ekstraksi kolom dengan *solvent* yang digunakan adalah *n-hexane* dan *n-petroleum*. Dari hasil penelitiannya, penulis menjelaskan bahwa *solvent n-hexane* lebih baik daripada *solvent n-petroleum*. Hal ini dikarenakan pada penggunaan *n-petroleum* jumlah minyak sudah mencapai kondisi maksimum atau suatu kondisi di mana minyak yang terekstrak sudah mencapai titik optimum yaitu pada *tray* 7, sehingga pada *tray* 8, 9, dan 10 hasil minyak yang didapat menjadi lebih sedikit dan cenderung menurun. Lain halnya pada *solvent n-hexane* yaitu minyak yang diperoleh terus meningkat di setiap kenaikan *tray*, dan ini akan lebih bermanfaat pada ekstraksi dengan penggunaan *tray* yang lebih banyak.

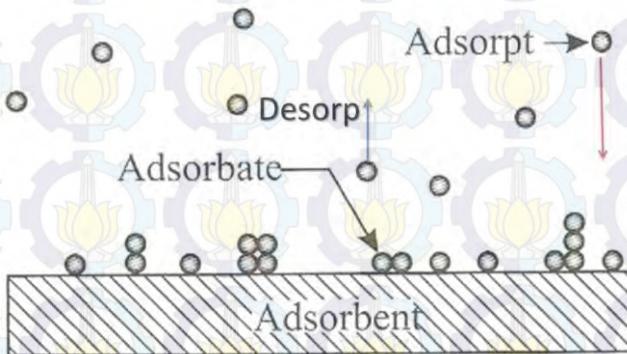
Tabel II.6 Kondisi operasi untuk berbagai proses ekstraksi

	<i>Modified Soxhlet Extraction</i>	Ekstraksi Soxhlet	Maserasi	<i>Pressurized Liquid Extraction</i>
Pelarut Umum yang Digunakan	Heksana, Ethyl acetate	Methanol, ethanol, atau campuran etanol dan air	Methanol, ethanol, atau campuran etanol dan air	CO ₂ , Alkohol, Dichloromethane-acetone
Temperatur (°C)	Dipanaskan	Tergantung pelarut yang digunakan	Dapat dipanaskan	Dipanaskan
Penggunaan Tekanan diatas 1 atm	Tidak bisa	Tidak bisa	Tidak bisa	Bisa (50-250 bar)
Waktu yang Dibutuhkan	11-12 jam	3 – 18 jam	3-4 hari	5 menit
Volume Pelarut yang Dibutuhkan (ml)	350	150 – 200	Tergantung banyaknya sampel	Dapat mengurangi penggunaan pelarut 30 mL/sampel dibandingkan dengan ekstraksi soxhlet
Referensi	Fabian et al.,2009; Gunawan et al.,2008; Kasim et al.,2009; Gunawan et al.,2013	Hargono dan Haryani, 2010.	Sasidharan et al., 2011.	Saleh, N.M. et al., 2009

II.2.2 Adsorpsi - Desorpsi

Adsorpsi adalah fenomena fisik yang terjadi saat molekul-molekul gas atau cair dikontakkan dengan suatu permukaan padatan dan sebagian dari molekul-molekul tadi mengembun pada permukaan padatan tersebut. Secara singkat adsorpsi merupakan proses dimana molekul fluida mengalami kontak dan melekat pada permukaan suatu material padat.

Untuk mengetahui karakteristik yang terjadi dalam proses adsorpsi diilustrasikan dengan **Gambar II.7** dimana padatan berpori yang menghisap dan melepaskan suatu fluida disebut sebagai adsorben. Molekul fluida yang dihisap tetapi tidak terakumulasi atau melekat ke permukaan adsorben disebut *adsorptive*, sedangkan yang terakumulasi disebut adsorbat.



Gambar II.7 Proses adsorpsi

Berdasarkan perbedaan jenis gaya yang bekerja antara molekul-molekul fluida dengan molekul-molekul padatan, adsorpsi dapat diklasifikasi menjadi 2, yaitu adsorpsi fisika (*Van der Wall's adsorption*) dan adsorpsi kimia (*activated adsorption*).

Adsorpsi fisik terjadi akibat adanya perbedaan energi atau gaya tarik bermuatan listrik (gaya van der Wall's). Molekul adsorbat mulai diikat secara fisik menuju molekul adsorben. Tipe adsorpsi fisik ini adalah adsorpsi multilayer, karena masing-masing molekul membentuk lapisan di atas lapisan sebelumnya. Adsorpsi fisika ini terjadi pada zat-zat yang bersuhu rendah

dengan adsorpsi relatif rendah. Pada adsorpsi fisik bersifat *reversibel* karena kebutuhan energi yang sangat kecil dan memungkinkan terjadinya proses desorpsi pada temperatur yang sama. Adsorpsi kimia bersifat spesifik dan terjadi berdasarkan ikatan kimia antara adsorben dengan zat yang teradsorpsi (adsorbat), sehingga dibandingkan dengan adsorpsi fisik, kerja yang terjadi jauh lebih besar.

Adsorpsi kimia terjadi pada suhu yang tinggi. Pada adsorpsi kimia, karena terjadinya ikatan kimia, maka pada permukaan adsorben dapat berbentuk suatu lapisan dan apabila hal ini berlanjut maka adsorben tidak akan mampu lagi menyerap zat lainnya. Proses adsorpsi secara kimia ini bersifat *irreversible*.

Adsorben adalah zat atau material yang mempunyai kemampuan untuk mengikat dan mempertahankan fluida di dalamnya. Adapun beberapa adsorben yang digunakan secara komersial adalah kelompok polar adsorben atau disebut *hydrophilic* seperti silika gel, alumina aktif, dan zeolit. Sementara kelompok lainnya adalah kelompok non polar adsorben atau *hydrophobic* seperti polimer adsorben dan karbon aktif. Karakteristik adsorben yang dibutuhkan untuk adsorpsi adalah sebagai berikut:

1. Luas permukaan besar sehingga kapasitas adsorpsinya tinggi
2. Memiliki aktivitas terhadap komponen yang diadsorpsi
3. Memiliki daya tahan yang baik
4. Tidak ada perubahan volume yang berarti selama peristiwa adsorpsi dan desorpsi

Berikut adalah jenis dan karakteristik dari adsorben ditunjukkan pada **Tabel II.7** :

Tabel II.7 Jenis dan karakteristik adsorben

Tipe	Karakteristik	Kegunaan	Kerugian	Luas Permukaan
Karbon aktif	Hidrofobik	Menghilangkan polutan organik	Relatif sulit untuk diregenerasi	600-1600 m ² /g
Silica gel	Hidrofilik, polar	Untuk zat organik tertentu, pengeringan gas, kapasitas tinggi	Kurang efektif dalam menghilangkan senyawa-senyawa tertentu	750 m ² /g
Alumina aktif	Hidrofilik	Untuk pengeringan gas, kapasitas tinggi	Kurang efektif dalam menghilangkan senyawa-senyawa tertentu	210-360 m ² /g

Desorpsi adalah prose yang berkebalikan dari proses adsorpsi, dimana adsorbate dilepaskan dari adsorben. Proses desorpsi dapat dikatakan sebagai proses lepasnya gas atau uap atau molekul pada permukaan padatan (adsorben). Desorpsi dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya adalah :

1. Meningkatkan temperature adsorben di atas temperatur didih adsorben, dengan cara mengalirkan uap panas atau udara panas atau dengan kata lain menggunakan pemanasan.
2. Menambahkan bahan kimia seperti solvent.
3. Menurunkan tekanan pada proses.

(Aditya et al,2013)

Metode *stirred batch-reactor* menggunakan prinsip adsorpsi-desorpsi, sementara dasar yang menentukan berapa banyak jumlah *batch* yang akan dilakukan dalam metode *stirred batch reactor*, adalah berdasarkan hasil uji TLC. Dalam percobaan, untuk memperoleh xanthone dan kumarin secara efektif dilakukan analisa perbandingan metode yang sudah ada sebagai konsep proses terbaik. Analisa tersebut disajikan pada **Tabel II.8** berikut:

Tabel II.8 Perbandingan proses separasi komponen

	Soxhlet ^a	<i>Modified Soxhlet</i> ^b	<i>Stirred batch-reactor</i> ^c
Waktu treatment	Lama	Lama	Cepat
Ruang Instalasi	Tidak membutuhkan tempat yang luas	Membutuhkan tempat yang luas karena peralatan banyak	Tidak membutuhkan tempat yang luas
Pengoperasian	Relatif mudah, namun hanya untuk suhu tinggi	Rumit serta langkah yang dibutuhkan cukup banyak	Relatif mudah
Waktu yang dibutuhkan untuk konstruksi alat	Konstruksi alat cepat	Konstruksi alat lama	Konstruksi alat cepat
Biaya konstruksi	Relatif kecil	Butuh banyak biaya investasi untuk konstruksi	Relatif kecil

Lanjutan **Tabel II.8** Perbandingan proses separasi komponen

Solvent yang digunakan	Banyak	Banyak	Relatif sedikit
Pemeliharaan	Mudah	Sulit karena banyaknya alat	Mudah

a diadaptasi dari Huie, 2002

b diadaptasi dari Fabian et al., 2009

c diadaptasi dari Gunawan et al., 2013

II.2.3 Identifikasi dan Karakterisasi

Pemisahan campuran menjadi komponen-komponennya adalah hal yang penting dalam semua cabang kimia dan tidak kalah pentingnya dalam banyak bidang lain di mana teknik-teknik kimia digunakan untuk memecahkan berbagai macam masalah. Pemisahan untuk identifikasi dan karakterisasi umumnya dibagi menjadi dua macam, yaitu metode kromatografi dan metode non-kromatografi. Kromatografi adalah suatu metode pemisahan fisik, di mana komponen-komponen yang dipisahkan didistribusikan di antara dua fasa, salah satu fasa tersebut adalah suatu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, yang lainnya sebagai fluida yang mengalir perlahan di sepanjang landasan stasioner (Day and Underwood, 2002).

Fase diam dapat berupa *solid* atau *liquid*, biasanya dalam bentuk *solid* atau gel. Sedangkan fase gerak dapat berupa *packed* dalam kolom, tersebar sebagai *layer*, atau terdistribusi dalam *film*, dan sebagainya. Fase gerak dapat berupa gas, *liquid*, atau fluida superkritis. Proses pemisahannya dapat berupa adsorpsi, distribusi massa, pertukaran ion, dan lain-lain, atau berdasarkan perbedaan sifat *physicochemical* dari molekulnya seperti ukuran, massa, volume, dan lain-lain (European

Pharmacopeia, 2005). Dalam penelitian ini akan digunakan adalah TLC dan GC-MS.

II.2.2.1 Metode Kromatografi

II.2.2.1.1 *Thin Layer Chromatography* (TLC)

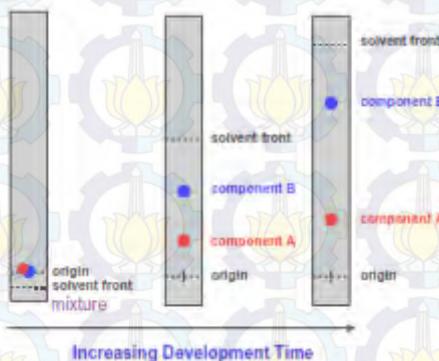
Thin Layer Chromatography (TLC) merupakan metode yang banyak digunakan untuk pemisahan dan identifikasi suatu senyawa di dalam suatu campuran. TLC menggunakan prinsip yang sama dengan ekstraksi untuk mencapai pemisahan dan pemurnian senyawa, yaitu pemisahan yang berbeda dari senyawa antara dua fase berdasarkan perbedaan kelarutan senyawa dalam dua tahap. Dalam metode TLC, satu fase adalah fase gerak dan fase lainnya adalah fase diam dengan luas permukaan yang tinggi. Fase diam biasanya terdiri dari adsorben halus, contohnya silica (SiO_2), atau alumina (Al_2O_3) yang digunakan dalam bentuk lapisan tipis (sekitar 0,25 mm). Fase gerak terdiri dari pelarut organik yang mudah menguap.

Tabel II.9 Kekuatan *adsorben*

	<i>Adsorben</i>
<i>Most Strongly Adsorben</i>	Silika Gel Charcoal Aluminium Oksida Magnesium Karbonat Kalsium Phospat
<i>Least Strongly Adsorben</i>	Selulosa

TLC terdiri atas tiga langkah yaitu *spotting*, *development*, dan *visualization*. Pada *spotting*, sampel akan ditotolkan pada plate TLC dalam jumlah yang kecil dengan menggunakan *micropipet*. Pada *development*, senyawa-senyawa dalam sampel akan terelusi dengan kecepatan yang tergantung pada sifat senyawa-senyawa tersebut (kemampuan terikan pada fasa diam dan kemampuan larut dalam fasa gerak). Senyawa non-polar akan lebih sedikit tertarik pada *plate* sehingga akan

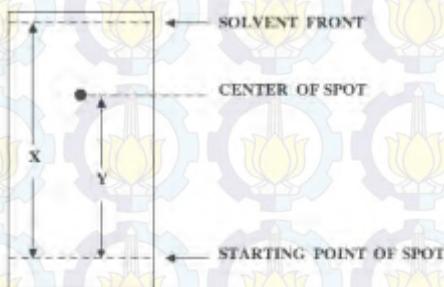
menghabiskan waktu yang lebih banyak pada fase gerak. Senyawa ini akan bergerak lebih cepat dan muncul lebih dekat dengan puncak dari plate. Sedangkan senyawa polar akan lebih tertarik pada *plate* sehingga akan menghabiskan waktu lebih sedikit pada fase gerak dan akan muncul lebih rendah pada *plate*. Pada visualisasi, *spot-spot* dapat secara langsung diamati setelah proses *development*. Namun karena pada umumnya suatu senyawa tidak berwarna, metode visualisasi dibutuhkan. Misalnya pada silika gel dalam *plate* TLC yang akan menampilkan dark spot dibawah sinar ultraviolet atau dengan menempatkan *plate* pada iodin *vapor* dalam beberapa menit. Senyawa-senyawa organik pada umumnya akan membentuk warna gelap kompleks dengan iodin.



Gambar II.8 Penggambaran skema TLC dengan campuran dua komponen

Pada **Gambar II.8** dapat dilihat bahwa semakin berjalannya waktu, komponen A dan komponen B akan terpisah. *Solvent* terus bergerak menuju atas dengan prinsip kapilaritas. Komponen B merupakan senyawa yang kurang polar dibandingkan komponen A karena lebih dekat dengan puncak *plate*. Sedangkan komponen A merupakan senyawa yang lebih polar.

Analisis suatu senyawa dalam TLC biasanya dilakukan dengan dibandingkan terhadap senyawa standarnya. Nilai R_f (*-Retardation factor*) digunakan untuk mengkuantitaskan perpindahan dari suatu material sepanjang *plate*. R_f sebanding dengan jarak yang berpindah dari suatu substansi dibagi dengan jarak yang berpindah dari suatu *solvent*. Biasanya nilainya diantara nol dan satu. Umumnya efektif *solvent* memiliki nilai R_f antara 0,3-0,7. Secara ideal, nilai R_f akan sama dari senyawa yang diberikan dengan menggunakan pelarut yang sama. Secara praktis, perpindahan berdasarkan dari struktur dan ketebalan dari *layer*, jumlah air tersisa, dan efek dari *binding agents*.



Gambar II.9 $R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1)

Thin Layer Chromatography (TLC) ini adalah analisa kualitatif. Keuntungan dengan menggunakan metode TLC adalah mudah, cepat, dan murah. Namun terkadang juga ada masalah dengan metode ini, misalnya adalah sampel tidak muncul yang kemungkinan dapat disebabkan karena sampel tidak cukup atau dibutuhkan metode visualisasi yang berbeda (<https://www.chem.wisc.edu>).

Dari penelitian yang dilakukan Yimdjo et al. (2004) metode TLC digunakan untuk mengisolasi senyawa *anti-microbial* di dalam minyak tanaman nyamplung. Kandungan ini kemudian digunakan untuk untuk uji toksisitas melawan *human epidermoid carcinoma* pada sel *nasopharynx* (KB). Ekstrak minyak seberat 200 gram dimasukkan ke atas silika gel, lalu

dielusi oleh campuran *n-hexane* dan *ethyl acetate*. Total didapatkan 117 fraksi yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok.

Anna Iskandari (2010), TLC digunakan untuk menentukan tiap langkah yang dilakukan pada proses kromatografi untuk isolasi senyawa bahan seperti pemilihan sistem eluen dan monitoring jumlah komponen yang ada dalam suatu fraksi. TLC juga digunakan untuk memonitoring kemurnian dari suatu senyawa. Senyawa tunggal tersebut dimonitoring dengan uji TLC menggunakan variasi eluen, jika spot dari beberapa elusi tetap satu, maka senyawa diduga murni. Pada penelitian ini digunakan plat silika yang spesifik untuk senyawa aromatik yaitu plat silika GF₂₅₄. Reagen penyemprot yang digunakan adalah reagen umum untuk mendeteksi adanya senyawa aromatik, yaitu Ce(SO₄)₂. Senyawa yang diduga murni ini dielusidasi dengan spektrofometri IR, UV, H NMR, C NMR, C NMR DEPT 90 dan NMR dua dimensi.

II.2.2.1.2 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

GC-MS merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu kromatografi gas (GC) untuk menganalisa jumlah senyawa secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit. *Gas Chromatography* (GC) menggunakan *carrier* gas untuk membawa komponen sampel melewati *packed column* atau kolom kapiler yang mengandung fase diam. Gas pembawa yang dipilih biasanya adalah gas yang *inert* contohnya helium yang bisa digunakan juga untuk deteksi MS. Fasa diam yang digunakan bisa dalam bentuk *solid* atau *immobilised polymeric liquid*.

Prinsip pemisahan campuran dari GC berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi komponen-komponen penyusunnya. Ketika fase gerak membawa sampel melewati fase diam, sebagian komponen sampel akan menempel ke fase diam dan bergerak lebih lama dari komponen lain sehingga masing-masing komponen akan keluar kolom dengan waktu yang berbeda

(*retention time*). Pada GC, jika spektra mengandung banyak senyawa, maka semakin banyak pula *peak* yang terbentuk. Berdasarkan data waktu retensi yang sudah diketahui dari literatur, bisa diketahui senyawa apa saja yang ada dalam sampel.

Mass spectrometer (MS) merupakan suatu instrumen yang didesain untuk memisahkan ion-ion fase gas berdasarkan nilai *mass to charge ratio* (m/z). MS memasukkan pemisahan dari *charged species* yang dihasilkan berdasarkan variasi dari metode ionisasi, umumnya yang digunakan adalah *Electron Impact* (EI) dan *Chemical Ionization* (CI). Pemisahan dari fase ion dapat diperoleh dengan MS menggunakan bidang elektrik atau magnetik yang akan membedakan ion. Pada ionisasi EI di mana molekul analit diionisasi secara langsung melewati *collision* dengan membombardir aliran elektron sehingga menghasilkan penghilangan elektron untuk membentuk spesies kation radikal. Pada CI molekul analit diionisasi melalui proses reaksi dengan *men-charge* reagen gas plasma menghasilkan baik spesies anion atau kation berdasarkan kepolaran analit atau *analyzer*.

II.2.2.2 Metode Non-kromatografi

II.2.2.2.1 UV-VIS Spectrophotometer

Spektrofotometer UV-VIS merupakan alat analisis sampel dengan menggunakan prinsip-prinsip absorpsi radiasi gelombang elektromagnetik oleh bahan untuk panjang gelombang sinar UV sampai dengan sinar tampak. Kegunaan dari alat ini adalah untuk menentukan kandungan zat organik/anorganik dalam suatu sampel larutan.

Beberapa komponen spektrofotometer yang penting yaitu: sumber energi radiasi yang stabil, monokromator (celah, lensa, atau cermin), wadah sampel transparan (kuvet), dan detector radiasi yang dilengkapi oleh *recorder*.



Gambar II.10 Skema Susunan Spektrofotometer UV-VIS

II.2.3 Metode *Stirred Batch-Reactor*

Metode *Stirred batch-reactor* merupakan metode pemisahan menggunakan prinsip adsorpsi-desorpsi. Proses adsorpsi adalah proses dengan penggunaan energi yang sangat efisien dan sesuai untuk isolasi komponen-komponen dengan titik didih yang hampir sama (Ruthven, 1984).

Adsorpsi adalah suatu proses yang terjadi ketika suatu fluida (cairan maupun gas) terikat kepada suatu padatan dan akhirnya membentuk suatu film (lapisan tipis) pada permukaan padatan tersebut. Padatan berpori (*pores*) yang menghisap (*adsorp*) dan melepaskan (*desorp*) disebut adsorben. Molekul fluida yang dihisap (kondisi *mobile*) tetapi tidak terakumulasi/melekat ke permukaan adsorben disebut *adsorptive*, sedangkan yang terakumulasi/melekat disebut adsorbat.

Pada umumnya proses adsorpsi diklasifikasikan menjadi dua proses, yaitu proses adsorpsi secara fisik yang disebabkan oleh gaya Van der Waals dan secara kimia yang disebabkan oleh reaksi kimia antara molekul-molekul adsorbat dengan atom-atom penyusun permukaan adsorben. Pada dasarnya adsorben dibagi menjadi tiga, yaitu: adsorben yang mengadsorpsi secara fisik (karbon aktif, silika gel, dan zeolite), adsorben yang mengadsorpsi secara kimia (*calcium chloride*, *metal hydrides*, dan *complex salts*), dan *composite adsorben* yang mengadsorpsi secara fisik dan kimia. Daya adsorpsi dipengaruhi oleh lima faktor, yaitu:

1. Jenis adsorbat

- a. Ukuran molekul adsorbat

Ukuran molekul yang sesuai merupakan hal penting agar proses adsorpsi dapat terjadi, karena molekul-molekul yang dapat diadsorpsi adalah molekul-molekul yang diameternya lebih kecil atau sama dengan diameter pori adsorben.

- b. Kepolaran zat

Apabila berdiameter sama, molekul-molekul polar lebih kuat diadsorpsi daripada molekul-molekul tidak polar. Molekul-molekul yang lebih polar dapat menggantikan molekul-molekul yang kurang polar, yang terlebih dahulu teradsorpsi.

2. Karakteristik adsorben
 - a. Kemurnian adsorben
Sebagai zat untuk mengadsorpsi, maka adsorben yang lebih murni diinginkan karena kemampuan adsorpsi lebih baik.
 - b. Luas permukaan dan volume pori adsorben
Jumlah molekul adsorbat yang teradsorpsi meningkat dengan bertambahnya luas permukaan dan volume pori adsorben.
3. Tekanan (P)
Tekanan yang dimaksud adalah tekanan adsorbat. Kenaikan tekanan adsorbat dapat menaikkan jumlah yang diadsorpsi.
4. Temperatur absolut (T)
Temperatur yang dimaksud adalah temperatur adsorbat. Pada saat molekul-molekul gas atau adsorbat melekat pada permukaan adsorben akan terjadi pembebasan sejumlah energi yang dinamakan peristiwa eksotermik. Berkurangnya temperatur akan menambah jumlah adsorbat yang teradsorpsi demikian juga untuk peristiwa sebaliknya.
5. Interaksi potensial (E)
Interaksi potensial antara adsorbat dengan dinding adsorben sangat bervariasi, tergantung dari sifat adsorbat-adsorben.

II.3 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya

Penelitian-penelitian tentang minyak nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) yang telah dilakukan antara lain :

1. Marie C. Yimdjo et. al. (2004)

melakukan penelitian tentang *Antimicrobial and Cytotoxic Agent from Calophyllum inophyllum*. Senyawa yang di isolasi dari jenis nyamplung ini adalah *caloxanthones A dan B, macluraxanthone, 1,5-dihydroxyxanthone, calophynic acid, brasiliensic acid, inophylloidic acid, friedelan-3-one, calaustralin, calophyllolide, inophyllum C dan E, dan inoxanthone*. Dari penelitian ini didapat bahwa 7 senyawa termasuk *caloxanthones A, calophynic acid, brasiliensic acid, inophylloidic acid, calophyllolide dan inophyllum C dan E* dapat menghambat *S. aureus* tapi tidak mikroba lainnya. *Calophyllolide* sendiri merupakan satu-satunya senyawa yang menunjukkan efek sitotoksik yang paling signifikan terhadap sel KB. Selain itu ditemukan juga senyawa baru yang disebut *inoxanthone*.

2. B.K. Venkanna dan C. Venkaratama Reddy (2009)

Melakukan penelitian dengan judul *Biodiesel Production and Optimization from Calophyllum inophyllum Linn. oil (honne oil)- three stage method*. Penelitian ini menggunakan tiga tahap untuk mendapatkan biodiesel dengan tahap pertama adalah *pre-treatment*. Pada tahap pertama, minyak nyamplung dengan kandungan FFA tinggi diubah menjadi trigliserida menggunakan metanol dengan katalis asam sulfat, dilakukan pada suhu 60°C selama 120 menit. Tahap kedua adalah transesterifikasi di mana larutan yang telah dipanaskan, ditambahkan *alkali methoxide* lalu dilakukan pengadukan dengan *mechanical stirrer*. Produk dibiarkan selama 8 jam, dan akan terbentuk dua lapisan atas dan bawah. Lalu, tahap ketiga adalah *post-treatment* di mana lapisan atas dari proses transesterifikasi dicampur dengan *petroleum ester* lalu dipanaskan hingga suhu 65°C. Biodiesel dicampur dengan air pada suhu 60°C, kemudian dibiarkan selama 8 jam, dilakukan pencucian dan dipanaskan hingga 110°C

selama 10 menit. Dari hasil penelitian didapat kesimpulan bahwa esterifikasi asam dengan 0,5 ml asam sulfat pada suhu 60°C selama 120 menit dengan perbandingan metanol dan minyak 4:1 memberikan konversi maksimum dari FFA menjadi trigliserida. Nilai asam berkurang dari 4,76 menjadi 1,64 mg KOH/g. Kondisi optimum dari transesterifikasi basa terjadi pada perbandingan molar 8:1, 1,25% KOH pada suhu 60°C dan waktu reaksi 120 menit.

3. Sylvie Crane et al. (2005)

Melakukan penelitian dengan judul *Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in Calophyllum calaba L. oil from Guadeloupe*. Pada penelitian ini, kandungan *physicochemical* antara *C. inophyllum* dan *C. calaba* dibandingkan. Didapatkan bahwa densitas dan *refractive index* *C. inophyllum* didapatkan 1,470. *C. inophyllum* memiliki *saturated fatty acid* sebesar 29,1% dan *unsaturated* sebesar 70,8%, serta kadar FFA *C. inophyllum* yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebesar 5,1%.

4. A.C. Dweck dan T. Meadowsy (2002)

Minyak mengandung 2 komponen bioaktif yaitu *calophyllic acid* dan *lactone* yang memiliki sifat antibiotik. Kulit kayu mengandung tanin dan asam benzoat. Daun mengandung *friedelin* dan *triterpene* dari grup *friedelin* yang disebut *calophyllal*, *calophyllol*, dan *calophyllic acid*. *Xanthone* seperti *mesuxxanthone B* dan *calophyllin B* bisa didapat dari *heartwood*. Minyak tamanu mengandung *terpenic essences*, asam benzoat, dan asam oxi-benzoat, dan sejumlah kecil vitamin F fosfor jenuh. Tanaman ini mengandung *4-phenylcoumarins* yang memiliki aktifitas sebagai anti tumor. Zat aktif yang terdapat dalam minyak adalah *calophyllolide* (C₂₅H₂₂O₅), molekul yang mengandung gugus *lactonic* dan *amethoxyl*, *calophyllic acid*

(C₂₅H₂₄O₆) yang berasal dari saponifikasi calophyllolide. Selain itu, Dweck juga menyebutkan bahwa minyak nyamplung memiliki kandungan resin beracun yang membuat manusia tidak bisa mengkonsumsi minyak tersebut.

5. Frederic Laure, et. al. (2008)

melakukan penelitian tentang *Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of Calophyllum Inophyllum Leaf Extract from French Polynesia Islands*. Penelitian ini menggunakan HPLC untuk menganalisa senyawa bioaktif di ekstrak daun *Calophyllum inophyllum*. Hasilnya, di tiap-tiap daerah kandungan bioaktifnya tidak seragam.

6. S.r. Thengane, et. al. (2006)

melakukan penelitian tentang *Micropropagation of Indian Laurel (Calophyllum Inophyllum), a source of anti-HIV compounds*. Penelitian ini bertujuan untuk menumbuhkan tanaman nyamplung dari *seed plant*. Biji nyamplung pertama kali mengalami proses pencucian dan perendaman agar steril. Setelah itu, biji ini di inokulasi pada media WPM yang telah disterilkan. Dari hasil penelitian, tanaman yang mengalami proses ini memiliki rata-rata kelangsungan hidup sebesar 77% setelah 5 minggu.

7. D.E. Games (1972)

Mengidentifikasi adanya senyawa turunan *coumarin* dalam biji dan daun *C. inophyllum* dengan menggunakan GC-MS. Games berhasil mengidentifikasi adanya *calophyllolide*, *cis/trans inophyllolide*, dan beberapa senyawa *coumarin* yang berbeda. Senyawa *coumarin* dengan MW 416 yang diidentifikasi adalah *calophyllolide* dan *apetalolide*. Selain itu beberapa senyawa *coumarin* lain seperti *costatolide* berhasil diidentifikasi dari daun dan biji *C. inophyllum*.

8. Masataki Itoigawa, et al. (2001)

melakukan penelitian tentang *Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from Calophyllum inophyllum*. Peneliti melakukan uji coba terhadap efek *inhibitor* 10 *4-phenylcoumarin* berpotensi sebagai *inhibitor* pertumbuhan kanker, tetapi yang paling efektif adalah *Calocoumarin-A* karena adanya bagian rantai *prenyl* yang meningkatkan efek anti-tumor.

9. Pai, B. R. et. al. (1966)

Melakukan penelitian Mengenai kandungan Triterpenes yang ada pada *Calophyllum inophyllum linn.* Objek penelitian yang digunakan dalam penelitiannya adalah daun nyamplung. Hasil ekstraksi daun nyamplung dengan n-Heksane menghasilkan campuran solida yang mengandung triterpenes yang kemudian di uji menggunakan *Chromatography* untuk membuktikannya. Hasil *Chromatography* menunjukkan bahwa sampel mengandung 4 jenis komponen kristal, A, B, C, dan D yang dibedakan menurut tingkat kepolarannya. Dimana kristal A tersusun atas 3 triterpenes yaitu *canophyllal*, *canophyllol*, dan *canophyllic acid*. Kristal B dianalisa sebagai senyawa dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$. Sementara kristal C dianalisa sebagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_2$. Dan Komponen D, dianalisa sebagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_3$.

10. Friday, J. B. And Okano, D. (2006)

Dalam Penelitiannya yang berjudul *Calophyllum inophyllum* telah disebutkan bahwa tanaman ini merupakan jenis tanaman yang dapat hidup di daerah dengan suhu tropis dan biasanya seringkali ditemukan disekitar bibir pantai. *Calophyllum inophyllum* tumbuh ditempat yang bertemperatur hangat atau sedang dan tidak cocok tumbuh pada area yang sangat dingin dengan udara yang kering. *Calophyllum inophyllum* ini memiliki banyak manfaat, selain sebagai bahan obat-obatan dan

untuk membuat *furniture*, fungsi lain tanaman ini adalah dapat berguna untuk menahan angin kencang, pengikisan daerah pantai oleh gelombang laut, dan lain-lain. Tanaman ini tumbuh dengan baik di wilayah dengan tanah yang bereongga (tanah berpasir). Tanaman ini memiliki kurang lebih 190 species, kebanyakan berasal dari Asia dan Kepulauan Pasifik. Bahkan di Indonesia, beberapa species bahkan dikatakan langka dan hanya ada di Indonesia.

11. Pretto, J.B. et. al. (2004)

Pretto et. al. Membuat suatu penelitian yang bertujuan untuk mencari fraksi / komponen yang bersifat sebagai antimikroba yang terdapat dalam *Calophyllum Brasiliensi*. Prosedurnya adalah, bagian tanaman yang akan digunakan untuk percobaan (akar, batang, daun, dan buah) dihilangkan kandungan airnya dan dijadikan bentuk serbuk. Setelah itu kemudian bahan tersebut di maserasi dengan menggunakan methanol selama 7 hari dan didiamkan pada suhu ruangan. Setelah diambil larutan ekstraknya kemudian dievaporasi untuk menghilangkan sisa campuran pelarut yang masih ada. Setelah itu kemudian *crude extract* dilarutkan dalam chloroform untuk memisahkan fraksi polar dan nonpolarnya. Fraksi polar dan non polar kemudian di uji kandungannya menggunakan TLC. Untuk menguji sifat antimikroba ekstrak, digunakan beberapa mikroorganisme, diantaranya : *Bacillus Aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Candida albicans*, dan *Candida tropicalls*. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa dari ke empat bagian tanaman tersebut, tanaman yang memiliki sifat antimikroba paling baik adalah pada bagian daun.

12. Malarvizhi P dan Ramakhrisan N (2011)

Penelitian yang berjudul GC-MS analysis of biologically active compound in leaves of *Calophyllum inophyllum* ini menghasilkan bahwa ekstrak dari *Calophyllum inophyllum* ini mengandung banyak hydrocarbon, komponen phenolic dan grup keton. Penelitian ini menggunakan daun *Calophyllum inophyllum* yang telah dibuat menjadi serbuk yang kemudian di maserasi dengan alkohol selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dari ampasnya, kemudian dikentalkan lalu di analisa menggunakan GC-MS.

13. Isaivani Indrakumar et al (2012)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen *phytochemical* yang terkandung dalam daun *Calophyllum inophyllum*. Daun *Calophyllum inophyllum* segar dikeringkan terlebih dahulu selama 15 hari lalu diblender hingga halus. Serbuk daun tersebut kemudian dilarutkan dalam 3 pelarut yang berbeda yaitu Petroleum Eter, Methanol, dan Chloroform kemudian di ekstraksi menggunakan soklet. Ekstrak yang dihasilkan kemudian di uji kandungan senyawanya menggunakan Mayer's test untuk uji alkaloids, Benedict's test untuk uji karbohidrat, Modified Borntrager's test untuk uji glikosid, Froth test untuk uji saponin, Xanthoproteic untuk uji protein, Alkaline reagent test untuk uji flavonoids, deteksi steroid, anthraquinone oleh Harbone, dan deteksi diterpenes, phenol dan kumarin oleh Mace.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Isolasi Kumarin, Xanthone dan Variabel

1. Pemisahan dengan ekstraksi liquid-liquid
 - a. Liquid yang digunakan berupa minyak daun nyamplung 70 g
 - b. Pelarut yang digunakan adalah petroleum eter (PE) - methanol 98% dengan rasio = 75:25 (g/g)
 - c. Rasio pelarut : minyak nyamplung = 5 : 1 (g/g)
 - d. Ekstraksi multi stage = 8 kali
2. Pemurnian dengan *Stirred batch-reactor*
 - a. Rasio silica gel : PLF = 6:1 ; dan 8:1 (g/g)
 - b. Rasio N-hexane : PLF = 10:1 , 15:1 , 20:1 , dan 25:1 (g/g)
 - c. Suhu adsorpsi-desorpsi (°C) = 20 °C
 - d. Proses Operasi selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm
3. Identifikasi produk
 - a. Ekstrak diuji menggunakan TLC dan GC-MS untuk analisa kualitatif
 - b. Spectrophotometer UV-Vis untuk analisa kuantitatif

III.2 Bahan dan Peralatan

III.2.1 Bahan

1. Minyak biji nyamplung
2. N-Heksane teknis
3. Metanol (98%) teknis
4. Petroleum eter teknis
5. Asam Asetat
6. Ethyl Asetat
7. Silica Gel
8. Aquades
9. Kertas Saring
10. Kertas TLC

III.2.2 Peralatan

1. Erlenmeyer
2. Stirer magnetik
3. Labu alas bulat
4. Hot plate
5. Neraca analitik
6. Beaker glass
7. Kondensor liebigh
8. Kondensor reflux
9. Soxhlet
10. Corong Pemisah
11. Pipet ukur
12. Pipet volume
13. Pipet tetes
14. Gelas Ukur
15. Karet Penghisap
16. Termometer

III.3 Metode Penelitian

III.3.1 Bahan Penelitian

1. Minyak biji nyamplung
Minyak nyamplung yang digunakan berasal dari Cilacap, Jawa Tengah. Berikut adalah karakteristik minyak nyamplung yang digunakan adalah sebagai berikut:
 - a. Kadar air : 0,25%
 - b. Densitas (20°C) : 0,944 gr/ml
 - c. Viskositas (40°C) : 56,7 cP
 - d. Bilangan asam : 59,94 mg KOG/gr
 - e. Kadar asam lemak bebas : 29,53%
 - f. Bilangan Penyabunan : 198,1 mg KOH/gr
 - g. Bilangan iod : 86,42 mg/gr
 - h. Indeks refraksi : 1,447
 - i. Penampakan/ warna : Hijau gelap dan kental
2. N-Heksane teknis
Sifat-sifat dari n-heksana yang digunakan adalah sebagai berikut:
 - a. Rumus molekul : C_6H_{14}
 - b. Berat molekul : 86,18

- c. Titik lebur : $-94,3\text{ }^{\circ}\text{C}$
- d. Titik didih : $69\text{ }^{\circ}\text{C}$
- e. Densitas ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) : 0,66
- f. Kenampakan : Liquid tak berwarna
- g. Tekanan uap : 160 hPa ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- h. Kelarutan : 0,0095

3. Metanol (98%) teknis
Sifat-sifat dari metanol (98%) yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Rumus molekul : CH_3OH
- b. Berat molekul : 32,04
- c. Titik lebur : $-98\text{ }^{\circ}\text{C}$
- d. Titik didih : $64,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- e. Densitas : 0,792
- f. Kenampakan : Liquid tak berwarna
- g. Tekanan uap : 128 hPa ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

4. Petroleum eter teknis
Sifat-sifat dari petroleum eter yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Berat molekul : 82,2
- b. Kenampakan : Liquid tak berwarna
- c. Densitas : 0,67
- d. Titik didih : $40\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- e. Tekanan uap : 400 hPa ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- f. Kelarutan : $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

5. Asam Asetat
Sifat-sifat dari asam asetat yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Rumus molekul : CH_3COOH
- b. Berat molekul : 60,05
- c. Kenampakan : Liquid tak berwarna
- d. pH : 2,5

- e. Titik didih : 102 °C
- f. Titik lebur : -25 °C
- g. Densitas : 1,06
- h. Tekanan uap : 1,5 kPa (20 °C)

6. Ethyl Asetat

Sifat-sifat dari ethyl asetat yang digunakan adalah sebagai berikut:

- a. Rumus molekul : $C_4H_8O_2$
- b. Berat molekul : 88,11
- c. Kenampakan : Liquid tak berwarna
- d. Titik didih : 77 °C
- e. Titik lebur : -83 °C
- f. Densitas : 0,902
- g. Tekanan uap : 97 hPa (20 °C)

7. Silica Gel

Sifat-sifat dari silica gel yang digunakan adalah sebagai berikut

- a. Rumus : SiO_2
- b. Diameter : 0,063-0,200 mm
- c. Luas penampang : 70-230 mesh ASTM
- d. Berat molekul : 60,09
- e. Kenampakan : Serbuk putih
- f. Spesifik gravitasi : 2,1
- g. Titik didih : 2950 °C
- h. Titik lebur : 1713 °C

III.3.2 Prosedur Penelitian

III.3.2.1 Ekstraksi fraksi lemak polar (*Polar Lipid Fraction*) dari *Crude Oil*

Metode ini dilakukan sebagai alternatif metode saponifikasi. Rasio pelarut terhadap minyak nyamplung adalah 5:1 dan perbandingan pelarut Petroleum Eter-Metanol 98%

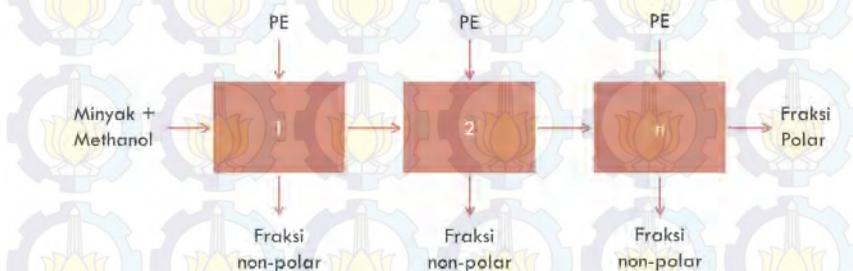
adalah 75:25. Kedua lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Semua senyawa polar akan terbawa dalam fase metanol, sedangkan sisanya akan terekstrak dalam fase PE. Ekstraksi dilakukan sampai *stage* ke-8. Fase metanol kemudian dikumpulkan dan diuapkan untuk mendapatkan fraksi lemak polar (*Polar Lipid Fraction*, PLF) sedangkan fase PE dikumpulkan dan diuapkan untuk mendapatkan fraksi lemak non-polar (*Non-Polar Lipid Fraction*, NPLF). Semua fraksi akhir yang didapatkan kemudian dianalisa menggunakan TLC (Saputra dan Claratika, 2014). Skema tahapan ekstraksi PLF terhadap minyak nyamplung diilustrasikan seperti gambar berikut:



Gambar III.1 Skema tahapan ekstraksi fraksi PLF

Pada tahap ini dilakukan proses ekstraksi *multistage* yang bertujuan untuk lebih memurnikan minyak dari proses *single stage* yang terbawa pelarut polar dengan membuang pengotor-pengotor yang terkandung dalam ekstrak yang lebih bersifat non-polar dibandingkan dengan kepolaran PLF yang diharapkan. Analisa *multistage* ini menggunakan metanol sebagai pelarut polar dan petroleum eter sebagai pelarut non polar.

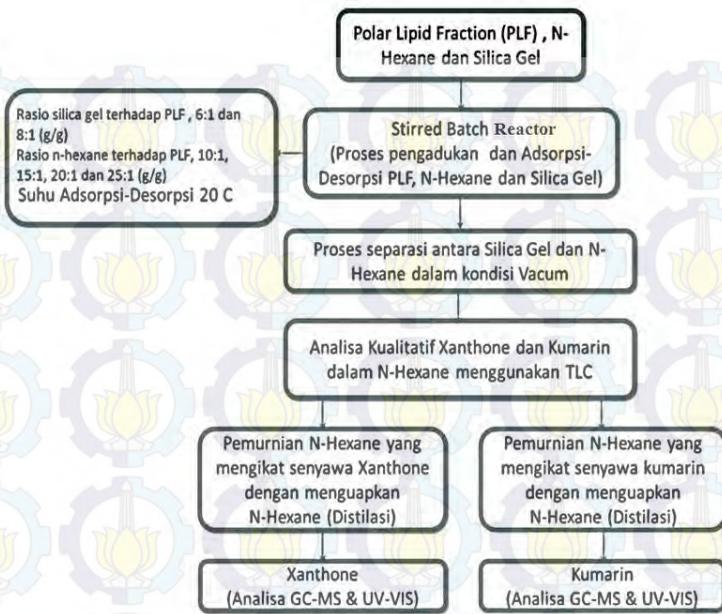
Proses ekstraksi *multistage* ini menggunakan sistem *cross-current* seperti pada gambar III.2 di bawah ini. Sistem ini dikatakan *cross-current* karena menggunakan petroleum eter baru untuk setiap proses ekstraksinya hingga *n-stage* dan produk yang diharapkan bersifat polar yang terikat dalam metanol. Adapun jumlah petroleum eter yang ditambahkan tiap *stage* selalu sama. Dengan kata lain, rasio yang digunakan selalu sama yaitu petroleum eter : metanol = 75 :25.



Gambar III.2 Sistem *cross-current* pada ekstraksi *multistage*

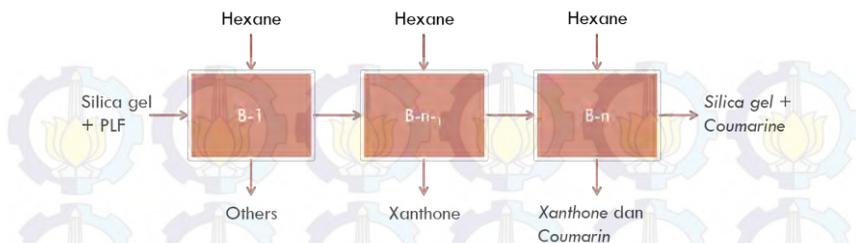
III.3.2.2 Pemisahan dan Pemurnian Kumarin dan Xanthone Menggunakan *Stirred Batch-Reactor*

Silica gel dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 1 jam untuk menghilangkan kandungan airnya. Kemudian PLF, *silica gel* dengan variabel rasio *silica gel* terhadap PLF adalah 6:1 dan 8:1 (g/g) dan variabel rasio *n-hexane* terhadap PLF 10:1, 15:1, 20:1 dan 25:1 (g/g) dimasukkan ke dalam alat *stirred batched-reactor*. Campuran tersebut kemudian diaduk pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit dengan variabel suhu 20 °C. Kemudian campuran di-*filter* menggunakan *replacable filter* ukuran 200 µm dengan bantuan pompa vakum.



Gambar III.3 Skema metodologi pemisahan xanthone dan kumarin

Silica gel adalah komponen berbentuk serbuk yang bersifat polar, sedangkan n-hexane adalah *solvent* yang bersifat non-polar. Kemudian, kandungan n-hexane dianalisa menggunakan metode TLC. Karena n-hexane bersifat non-polar dan xanthone bersifat lebih non-polar dibanding kumarin, maka komponen yang akan lebih dulu ditangkap oleh n-hexane adalah xanthone. Apabila pada pelat TLC tidak didapatkan komponen apapun (kosong) atau didapatkan komponen xanthone, maka *run* dilanjutkan ke *batch* selanjutnya. *Silica gel* dan komponen yang ter-*filter* ditambahkan n-hexane lagi dengan volume yang sama. Penambahan pelarut n-hexane pada silica gel yang ter-*filter* dilakukan beberapa kali atau sampai beberapa *batch*. Penambahan hexane dihentikan ketika fraksi kumarin mulai muncul pada saat tes TLC. Ilustrasi dari *batch* pada penelitian ini dijelaskan pada gambar III.4 berikut:



Gambar III.4 Sistem *Batch (B)* Pada Metode *Stirred Batch-Reactor*

Setelah fraksi kumarin didapatkan dalam *silica gel*, selanjutnya fraksi kumarin dalam *silica gel* diekstraksi menggunakan pelarut metanol pada suhu ruangan kemudian metanol diuapkan. Sedangkan untuk fraksi xanthone dalam *n*-hexane didapatkan dengan cara menguapkan *n*-hexane. Produk yang didapatkan kemudian dianalisa menggunakan metode TLC, GC-MS dan UV-VIS.

III.3.2.3 Analisa Kumarin dan Xanthone Menggunakan TLC

Fraksi polar yang didapatkan kemudian di uji kandungannya menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*). TLC digunakan untuk menguji secara kualitatif ada atau tidaknya senyawa xanthone dan kumarin di dalam fraksi polar minyak nyamplung ini. Sebelum dilakukan uji TLC, mula-mula pelat TLC yang telah ditetesi oleh sampel direndam dalam *mobile phase* dengan kadar *n*-hexane:etil asetat:asam asetat sebesar 90:10:1. Perendaman dalam *mobile phase* dilakukan dalam botol tertutup rapat. Pada saat perendaman, tinggi *mobile phase* tidak diperbolehkan melebihi area yang telah ditentukan pada kertas TLC. Setelah perendaman, pelat TLC kemudian dikeringkan pada suhu ruangan lalu dilakukan pewarnaan menggunakan iodine dengan takaran campuran iodine dan *silica gel* sebanyak $\frac{1}{4}$ sendok teh iodine dicampur dengan 2 sendok makan *silica gel* kemudian dicampur di dalam botol yang tertutup rapat. Pelat TLC yang telah direndam dalam *mobile phase* tersebut dimasukkan ke dalam

botol yang berisi iodine hingga terbentuk spot-spot pada kertas TLC. Fungsi dari iodine dan *silica gel* tersebut adalah untuk memberi warna pada sampel yang telah diteteskan dengan kertas TLC tersebut. Pada pembacaan di pelat TLC, selain menggunakan iodine, dapat juga menggunakan lampu UV dengan cara setelah pelat TLC direndam dalam *mobile phase*, pelat TLC disinari dengan menggunakan lampu UV gelombang 366 nm atau 254 nm.

III.3.2.4 Analisa Kumarin dan Xanthone Menggunakan GC-MS

Analisa menggunakan analisa GC-MS dengan GC Agilent 6890N dengan autosampler. Kolom kapiler, HP5 5% fenilmetilsiloksan panjang 30 m x 320 μm i.d., dengan ketebalan lapisan fase diam 0,25 μm , detektor menggunakan MS, Agilent 6971 inert mass selective detector (Agilent Tech. Palo Alto, California, USA). Suhu injector diatur pada suhu 250⁰ C. Suhu dinaikkan 2⁰C/menit hingga suhu 100⁰ C lalu dinaikkan 5⁰C/menit hingga suhu 290⁰ C dan dijaga tetap pada suhu tersebut selama 10 menit. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium, Alphagaz. Transfer line dengan suhu 280⁰ C, MS Quadrupole 150⁰ C, MS Source 230⁰ C. Volume injeksi sebanyak 5 μl , menggunakan model inlet split 1:10 dengan laju alir gas dalam kolom sebesar 1,3 ml/menit.

III.3.2.5 Analisa Kumarin dan Xanthone Menggunakan UV-VIS

Analisa menggunakan Spektrofotometer UV-VIS menggunakan Thermo Scientific Genesys 10S UV Scanning. Setelah PLF melewati metode *stirred-batch reactor* dan didapatkan dua buah fraksi yaitu fraksi metanol dan fraksi n-hexane, selanjutnya adalah mengukur konsentrasi kumarin dan xanthone yang terkandung di dalam dua fraksi tadi menggunakan UV-VIS. Hal yang pertama kali dilakukan adalah mengencerkan

kedua sampel, yang dalam kasus ini masing-masing fraksi menggunakan pelarut yang berbeda. Sampel yang didapat dari hasil distilasi n-hexane diambil sebanyak 0,1 ml dan diencerkan ke dalam 100 ml n-hexane, sementara itu sampel yang diperoleh dari hasil ekstraksi soklet *silica gel* dilarutkan dengan menggunakan metanol dengan variabel sama.

Untuk mendapatkan konsentrasi dari metode UV-VIS, terlebih dahulu harus didapatkan panjang gelombang dengan absorbansi maksimum dari larutan standar. Caranya dengan *scanning* panjang gelombang. Setelah didapatkan panjang gelombang maksimum, larutan standar dibuat menjadi beberapa variabel konsentrasi dan di-*run* untuk mengetahui absorbansinya menggunakan panjang gelombang yang telah didapatkan sebelumnya. Data absorbansi yang didapat dari larutan standar pada berbagai konsentrasi ini lalu dijadikan kurva kalibrasi. Setelah didapatkan kurva kalibrasi, pembacaan terhadap sampel yang telah diencerkan lalu dilakukan. Akan didapat beberapa titik tergantung pada rentang waktu yang ditentukan. Dari beberapa titik ini akan didapatkan nilai absorbansi rata-rata yang nantinya akan diproses ke dalam perhitungan di appendix.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berapa jumlah kandungan senyawa xanthone dan kumarin yang dapat diisolasi dari fraksi polar minyak nyamplung. Pada penelitian ini akan dipelajari proses pemisahan awal hingga proses isolasi dan pemurnian senyawa xanthone dan kumarin dari fraksi lemak polar (*Polar Lipid Fraction*, PLF) dari minyak nyamplung mentah, dengan menggunakan metode sebagai berikut :

1. Proses pemisahan fraksi lemak polar (PLF) menggunakan metode ekstraksi liquid-liquid (*Liquid-liquid extraction*, LLE) dengan *solvent* metanol dan petroleum eter secara *multistage*, sebanyak 8 stage.
2. Proses pemisahan xanthone dan kumarin dari PLF dengan metode *stirred batch reactor*.
3. Proses pemurnian xanthone dan kumarin dilakukan dengan metode distilasi sederhana dan ekstraksi solid-liquid

Hasil dari tahapan proses tersebut dianalisa menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan GC-MS (*Gas Column Chromatography*) untuk analisa kualitatif dan analisa UV-VIS untuk analisa kuantitatif.

Pada tahapan proses ekstraksi *liquid-liquid* multistage, minyak nyamplung sebelumnya berwarna hijau kehitaman gelap dan setelah melewati proses ekstraksi, fraksi polar minyak nyamplung tersebut menghasilkan warna hijau gelap. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan minyak nyamplung dengan kandungan seperti pada **Tabel II.3** poin C.

Pada penelitian ini, diharapkan produk dari fraksi polar minyak nyamplung, terdapat senyawa xanthone dan kumarin dengan kemurnian yang tinggi.

IV.1 Ekstraksi *Liquid-liquid* Fraksi Lemak Polar (PLF) dari Crude Minyak Nyamplung

Metode ekstraksi liquid-liquid ini menggunakan dua jenis pelarut, yaitu petroleum eter dan metanol. Pemilihan kedua *solvent* ini berdasarkan pada indeks polaritas, di mana metanol adalah senyawa agak polar dengan indeks polaritas sebesar 5,1 sedangkan petroleum eter merupakan senyawa non-polar dengan indeks polaritas 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda inilah, diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam *crude* akan terlarut dalam metanol dan senyawa tidak polarnya akan terlarut dalam fraksi petroleum eter.

Proses ekstraksi ini dimulai dengan penimbangan *crude* minyak nyamplung seberat 70 gram, dan rasio perbandingan antara *crude* dengan *solvent* yang digunakan adalah 1:5 gram/gram. Sementara itu, rasio perbandingan antara petroleum eter dan metanol yang digunakan adalah 75:25 gram/gram.

Crude minyak nyamplung yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian ditambahkan metanol. Campuran *crude* minyak dan metanol ini kemudian di-*stir* menggunakan *stirrer* magnetik selama 15 menit. Langkah ini bertujuan agar metanol mengikat seluruh komponen polar di dalam *crude* terlebih dahulu. Setelah 15 menit, kemudian ditambahkan petroleum eter ke dalam campuran *crude* dan metanol yang telah di-*stir* sebelumnya, kemudian dilakukan pengadukan lagi selama 15 menit. Pada *stir* kedua ini, komponen yang agak polar sampai non-polar akan terikat di dalam petroleum eter. Selain untuk melarutkan dan mempermudah transfer massa, langkah ini juga bertujuan untuk mempersingkat waktu pemisahan di langkah selanjutnya.

Campuran di dalam *beaker glass* kemudian dipindahkan ke dalam corong pemisah. Pada tahap ini, akan terlihat bahwa *crude* terlarut ke dalam dua fraksi, yaitu fraksi methanol (fraksi polar) dan fraksi petroleum eter (fraksi non-polar). Karena *crude* minyak nyamplung berwarna kehitaman, dibutuhkan pencahayaan lebih untuk melihat pemisahan fraksi polar dan non-

polar yang ditunjukkan dengan *layer* yang terbentuk di dalam corong pemisah. Berikut adalah gambaran *layer* yang terbentuk saat ekstraksi pada *stage* pertama.

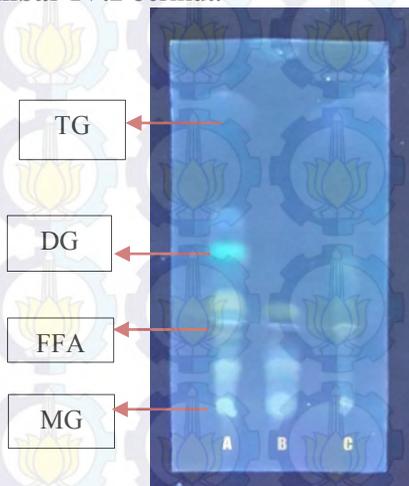


Gambar IV.1 *Layer* di Corong Pemisah *Stage* 1

Pada **Gambar IV.1**, terdapat dua bagian, dimana bagian atas adalah *layer* petroleum eter yang melarutkan fraksi non-polar, dan bagian bawah adalah *layer* metanol yang melarutkan fraksi polar. Pada gambar tersebut, fraksi polar terlihat lebih sedikit karena perbandingan rasio antara metanol yang lebih kecil dibandingkan dengan petroleum eter. Ekstraksi kemudian dilanjutkan ke *stage* selanjutnya hingga 8 *stage*. Semakin banyaknya jumlah *stage* yang dijalankan akan terlihat bahwa fraksi petroleum eter akan semakin bersih. Hal ini dikarenakan fraksi yang agak non-polar yang melarut di dalam petroleum eter pun semakin sedikit karena senyawa non-polar telah dihilangkan di setiap *stage*, sementara itu fraksi metanol akhirnya semakin sedikit.

Setelah mencapai *stage* 8, fraksi metanol kemudian diuapkan untuk memurnikan fraksi polar (PLF) dari metanol, sementara fraksi petroleum eter dikumpulkan dari *stage* 1 hingga 8 lalu diuapkan juga untuk memurnikan fraksi non-polar (NPLF) dari petroleum eter. Dari metode ini, didapatkan fraksi metanol sebanyak 26,74 gram (PLF) dan fraksi petroleum eter sebanyak 43,26 (NPLF). Selanjutnya dilakukan analisa secara kualitatif

menggunakan TLC untuk masing-masing fraksi dan dibandingkan dengan *crude*. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada Gambar IV.2 berikut:



Gambar IV.2 Hasil analisa TLC menggunakan lampu UV. (A) *crude* minyak nyamplung; (B) fraksi polar; dan (C) fraksi non-polar

Dari hasil analisa di atas dapat diketahui bahwa pada awalnya *crude* nyamplung mengandung *triglyceride*, *diglyceride*, *free fatty acid*, dan *monoglyceride*. Hal ini dibuktikan dengan adanya *spot* yang terpisah pada pelat TLC. Setelah *crude* mengalami proses ekstraksi, komponen-komponen seperti asam lemak akan mengalami penurunan. Pernyataan ini terbukti pada fraksi polar setelah pencucian memiliki *spot* semakin sedikit dibandingkan *crude*. Komponen yang masih terdapat di dalam fraksi polar minyak nyamplung jika dilihat berdasarkan hasil TLC di atas adalah *free fatty acid* yang mengalami penurunan dan *monoglyceride*. Sementara *triglyceride* dan *diglyceride* tidak terlihat pada fraksi polar minyak nyamplung

Pada fraksi non-polar, terdapat *spot* yang mirip seperti di *crude*. Hal ini menunjukkan bahwa komponen-komponen seperti asam lemak dan hidrokarbon larut pada fraksi petroleum eter, dan

selain itu pada **Gambar IV.2** di atas juga menunjukkan bahwa pemisahan berhasil dilakukan. Analisa TLC ini hanya merupakan analisa secara kualitatif.

IV.2 Pemisahan dan Pemurnian Xanthone dan Kumarin Menggunakan Metode *Stirred Batch-reactor*

Terdapat beberapa metode yang telah dilakukan untuk mengisolasi suatu komponen dari minyak mentah. Chu et al pada tahun 2004 melakukan pemisahan vitamin E dari distilat *palm fatty acid* menggunakan *silica* pada metode adsorpsi *stirred batch*. Kemudian, pada tahun 2009, Gunawan et al menggunakan *stirred batch-reactor* untuk memisahkan fraksi PLF dan NPLF dari SODD (*Soybean Oil Deodorizer Distillate*).

Metode *stirred batch-reactor* menggunakan prinsip adsorpsi-desorpsi, di mana *silica gel* adalah adsorben bersifat polar, sehingga dalam percobaan, *silica gel* akan mengadsorpsi komponen yang juga bersifat polar. Sementara dasar yang menentukan berapa banyak jumlah *batch* yang akan dilakukan dalam metode *stirred batch reactor*, adalah berdasarkan hasil uji TLC yang dilakukan untuk melihat spot adanya xanthone dan kumarin, serta sifat kepolaran dari xanthone dan kumarin. Berdasarkan uji TLC tersebut akan didapatkan hasil bahwa xanthone bersifat lebih non-polar daripada kumarin, terbukti dari *spot* larutan standar xanthone yang berada lebih di atas daripada *spot* larutan standar kumarin. Kumarin yang bersifat polar akan tertahan, sementara xanthone akan terus terbawa oleh *mobile phase*. Prinsip yang sama juga digunakan pada penelitian sebelumnya oleh Teguh et al pada tahun 2014 ketika memisahkan squalene dari fraksi non-polar minyak nyamplung. Squalene bersifat lebih non-polar dibanding TG (*triglyceride*), maka *batch* akan berakhir apabila *spot* TG terlihat pada hasil uji TLC fraksi n-hexane.

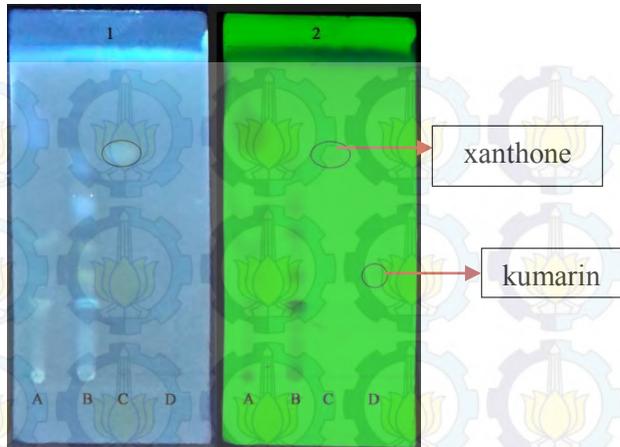
Untuk memperoleh xanthone dan kumarin secara efektif dilakukan analisa perbandingan metode yang sudah ada sebagai konsep proses terbaik. Analisa tersebut disajikan pada **Tabel II.8**.

Dari data yang dijelaskan pada **Tabel II.8** pada bab dua, hasil analisa penulis yang dikutip dari berbagai sumber dapat disimpulkan bahwa cara separasi komponen dalam minyak nyamplung yang terbaik adalah menggunakan *stirred batch-reactor*. Diketahui bahwa metode ini sangat efektif karena waktu *treatment* cepat, dengan pengoperasian yang mudah dan pelarut yang dibutuhkan relatif sedikit.

Metode ini bertujuan untuk memisahkan xanthone dan kumarin dari PLF. Proses *stirred batch-reactor* ini dimulai dengan men-*setting* suhu di dalam reaktor sebesar 20°C. Setelah suhu di dalam reaktor menunjukkan 20°C, kemudian *silica gel* dan PLF dimasukkan ke dalam reaktor. Pada *silica gel* sebelumnya telah dikeringkan terlebih dahulu di dalam *oven* pada suhu 60°C selama 1 jam, kemudian dimasukkan kedalam eksikator hingga suhu *silica gel* turun menjadi suhu ruang. Pengeringan *silica gel* dilakukan agar daya adsorpsi *silica gel* lebih maksimal dan kandungan uap air yang terdapat di dalam *silica gel* hilang. Pada proses *stirred batch-reactor* rasio perbandingan *silica gel* terhadap PLF adalah 6:1 dan 8:1 (g/g). Setelah itu dilakukan penambahan n-hexane ke dalam campuran *silica gel* dan PLF, di mana rasio n-hexane terhadap PLF yang digunakan adalah 10:1 ; 15:1 ; 20:1 dan 25:1 (g/g). Campuran ini diaduk pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit yang ditetapkan sebagai 1 *batch*, dengan suhu ketika *silica gel* mengadsorpsi PLF dan mendesorpsi dijaga tetap 20°C. Setelah 10 menit, campuran *silica gel* yang telah mengadsorpsi PLF dipisahkan dengan n-hexane dengan menggunakan *replacable filter* berukuran 40-100 µm dengan bantuan pompa vakum. Hasil pemisahan berupa n-hexane akan tertampung dalam tangki produk. Setiap produk n-hexane pada tiap *batch* akan dianalisa TLC untuk mengetahui ada atau tidaknya spot xanthone dan kumarin. Pada proses ini, karena xanthone bersifat lebih non-polar dibandingkan kumarin, maka komponen yang pertama kali larut dalam n-hexane adalah xanthone. Apabila pada pelat TLC tidak ditemukan komponen apapun (kosong) atau ditemukan *spot*

xanthone, maka *run* dilanjutkan ke *batch* selanjutnya. Banyaknya *batch* ditentukan apabila fraksi kumarin mulai muncul pada saat analisa TLC. Hal ini dimaksudkan bahwa ketika fraksi kumarin telah larut dalam n-hexane, berarti pada saat itu di dalam *silica gel* hanya tersisa fraksi-fraksi polar karena fraksi non-polar dan fraksi agak non-polarnya telah terbawa oleh n-hexane. Pada proses *stirred batch reactor*, untuk *run* pada *batch* berikutnya, ditambahkan n-hexane baru dengan volume yang sama. Penambahan n-hexane baru pada *silica gel* merupakan proses desorpsi, dimana *silica gel* yang bertindak sebagai adsorban akan melepas komponen di dalam PLF yang bersifat kurang polar seperti xanthone, dengan adanya penambahan pelarut n-hexane.

Setelah sebelumnya pada analisa TLC terlihat adanya spot xanthone dan kumarin, maka produk n-hexane setiap *batch* dikelompokkan berdasarkan fraksinya. Pada *batch* yang dianalisa dengan TLC tidak terlihat spot komponen apapun (kosong), maka n-hexane *batch* tersebut dikumpulkan dalam fraksi 1. Sementara pada *batch* yang dianalisa dengan TLC menunjukkan spot xanthone hingga sebelum spot kumarin terlihat, maka n-hexane pada *batch* tersebut dikumpulkan dalam fraksi 2. Pada *batch* yang dianalisa dengan TLC menunjukkan spot kumarin dan hasil ekstraksi silica, maka termasuk dalam fraksi 3. Fraksi yang telah dikelompokkan tadi, kemudian akan diuapkan dengan distilasi sederhana untuk mendapatkan xanthone. Penguapan ini bertujuan untuk memisahkan xanthone dari n-hexane. Sementara itu, untuk memurnikan kumarin dari *silica gel*, digunakan ekstraksi soklet dengan pelarut metanol. Setelah seluruh kumarin larut dalam metanol, selanjutnya metanol diuapkan untuk mendapatkan komponen kumarin. Berikut adalah hasil TLC standar xanthone dan standar kumarin pada **Gambar IV.3** berikut ini :



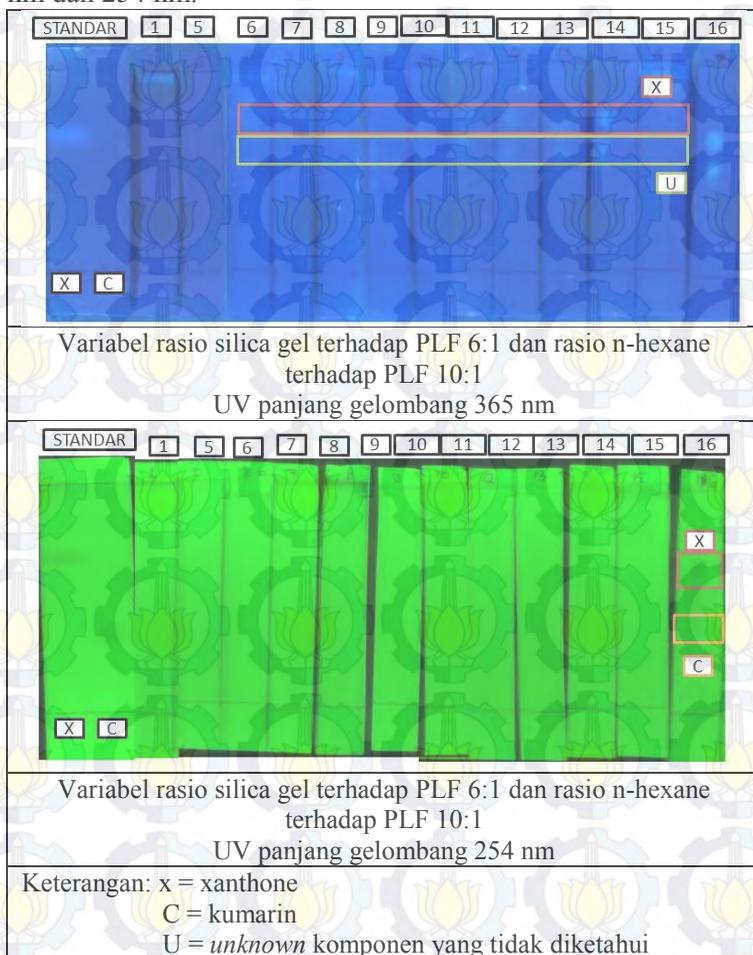
Gambar IV.3 Hasil analisa larutan standar pada pelat TLC. (A) fraksi non-polar; (B) fraksi polar; (C) standar xanthone; dan (D) standar kumarin

Berdasarkan hasil analisa pada **Gambar IV.3** di atas terlihat bahwa xanthone lebih non-polar daripada kumarin, terbukti dari posisi spot xanthone yang lebih berada di atas dibanding kumarin. Gambar nomor 1 di sebelah kiri adalah hasil analisa yang disinari UV dengan panjang gelombang 365 nm, sementara gambar nomor 2 di sebelah kiri hasil analisa yang disinari UV dengan panjang gelombang 254 nm. Dari **Gambar IV.3** di atas terlihat pula bahwa dari letak *spot*, disimpulkan bahwa kumarin bersifat lebih polar dibandingkan xanthone, karena letak spot larutan standar kumarin berada lebih di bawah xanthone. Atas dasar inilah, penentuan *batch* pada metode *stirred batch-reactor* didasarkan saat spot kumarin sudah mulai terlihat ketika analisa TLC. Berdasarkan hasil TLC tersebut, diharapkan jika spot kumarin telah terlihat, maka spot xanthone telah terikut semua pada pelarut n-hexane.

IV.3 Hasil Analisa TLC Pada Setiap Variabel

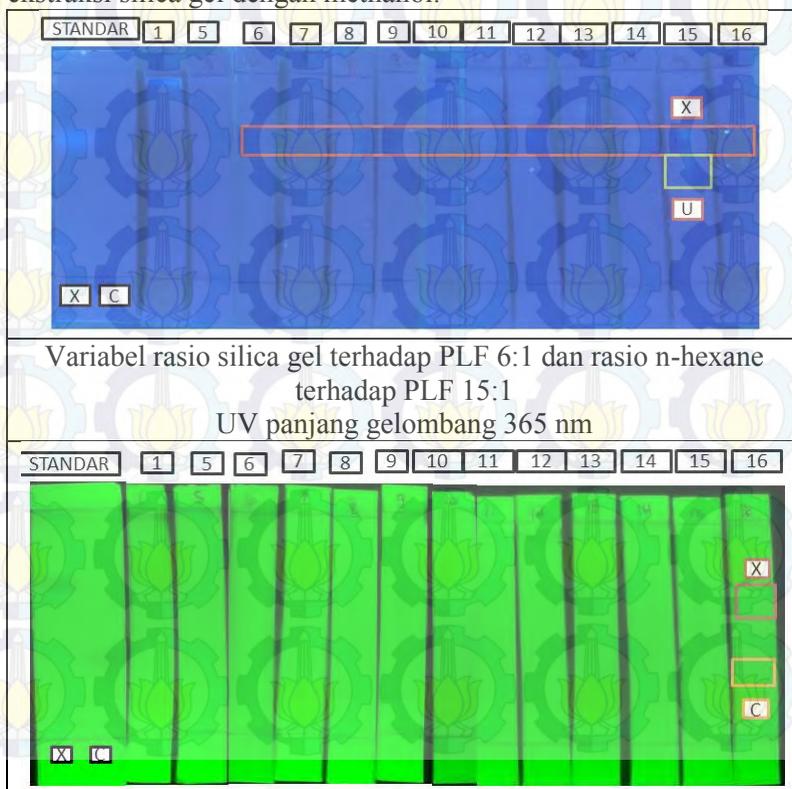
Pada proses *stirred batch reactor* sebelumnya, telah dilakukan run dengan variabel rasio silica gel terhadap PLF

adalah 6:1 dan 8:1 (g/g), serta variabel rasio n-hexane terhadap PLF adalah 10:1 ; 15:1 ; 20:1 dan 25:1 (g/g). Berdasarkan proses stirred *batch* pada variabel tersebut, dilakukan analisa TLC pada setiap *batch*. Berikut adalah gambar hasil TLC pada setiap variabel dengan menggunakan sinar uv panjang gelombang 365 nm dan 254 nm.



Gambar IV.4 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:10:1

Pada hasil TLC variabel 6:10:1 pada batch 1 hingga batch 5 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 5 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 6 hingga batch 15 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 6 sampai batch 15 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 16 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 16 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 16 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silika gel dengan methanol.



Variabel rasio silica gel terhadap PLF 6:1 dan rasio n-hexane terhadap PLF 15:1

UV panjang gelombang 254 nm

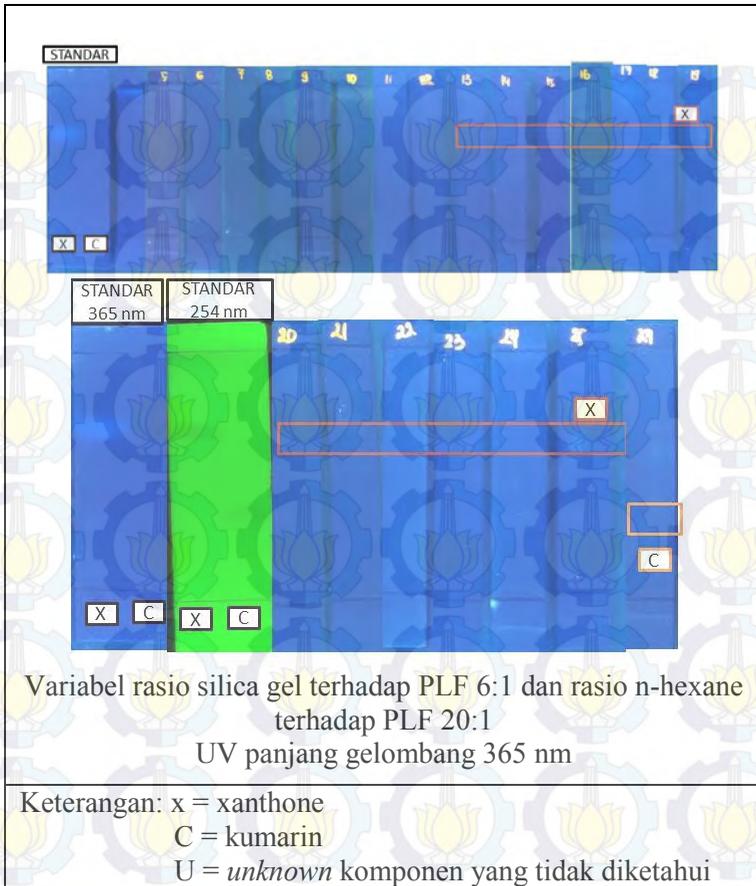
Keterangan: x = xanthone

C = kumarin

U = *unknown* komponen yang tidak diketahui

Gambar IV.5 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:15:1

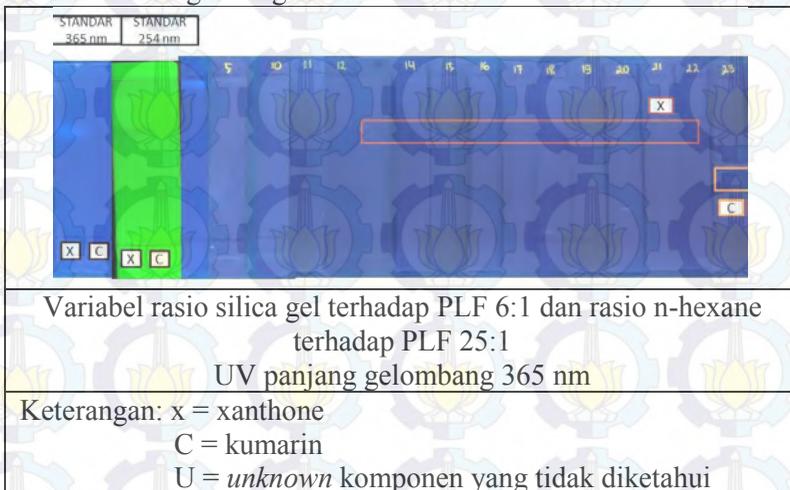
Pada hasil TLC variabel 6:15:1 pada batch 1 hingga batch 5 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 5 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 6 hingga batch 15 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 6 sampai batch 15 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 16 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 16 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 16 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



Gambar IV.6 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:20:1

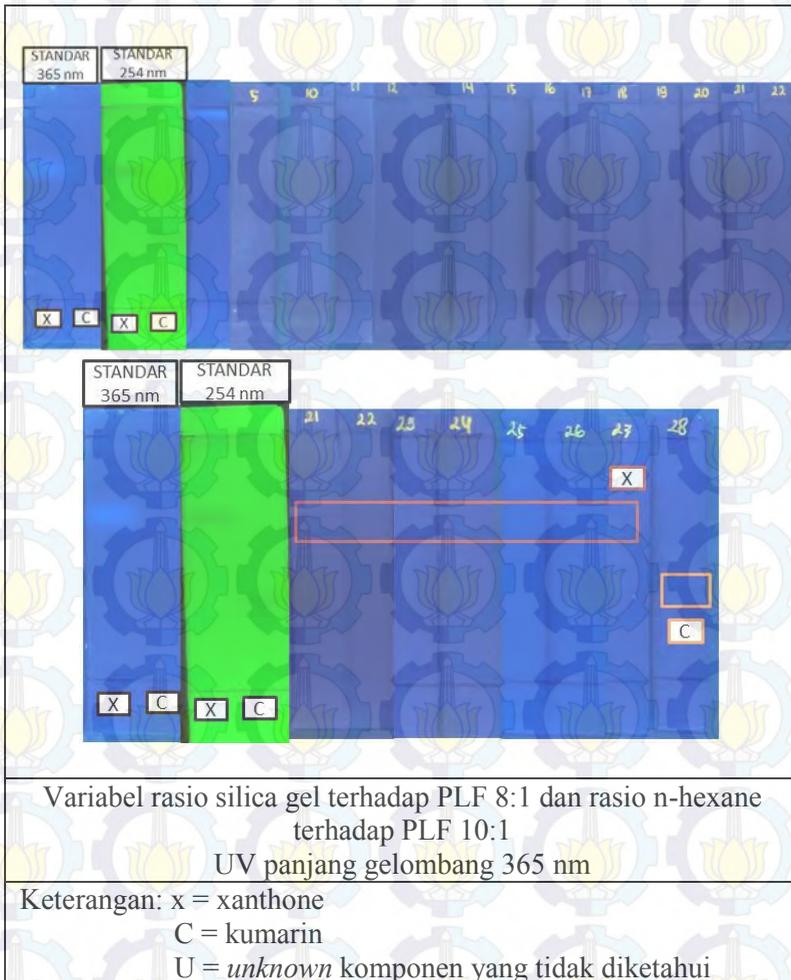
Pada hasil TLC variabel 6:20:1 pada batch 1 hingga batch 12 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 12 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 13 hingga batch 25 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 13 sampai batch 25 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 26

terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 26 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 26 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



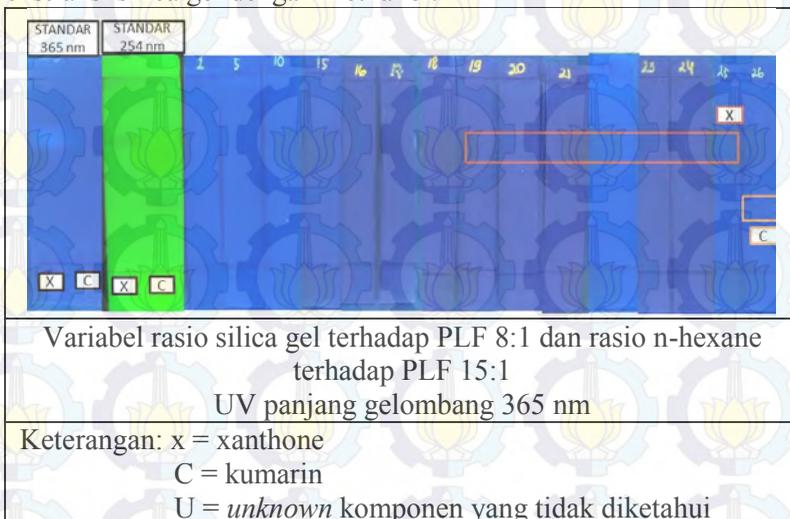
Gambar IV.7 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 6:25:1

Pada hasil TLC variabel 6:25:1 pada batch 1 hingga batch 12 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 12 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 13 hingga batch 22 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 13 sampai batch 22 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 23 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 23 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 23 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



Gambar IV.8 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:10:1

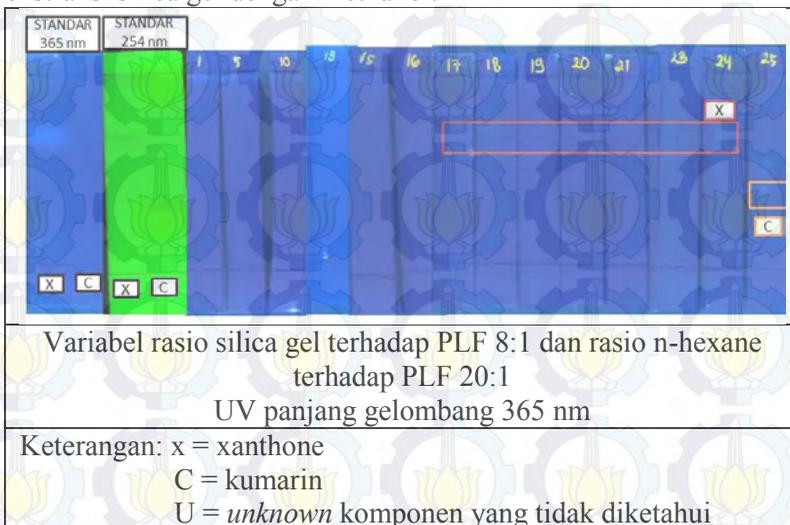
Pada hasil TLC variabel 8:10:1 pada batch 1 hingga batch 20 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 20 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 21 hingga batch 27 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 21 sampai batch 27 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 28 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 28 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 28 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



Gambar IV.9 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:15:1

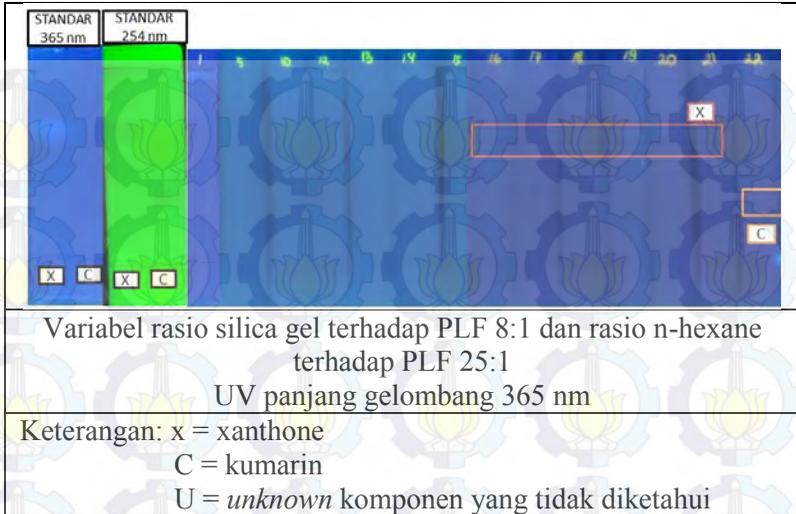
Pada hasil TLC variabel 8:15:1 pada batch 1 hingga batch 18 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 18 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 19 hingga batch 25 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 19 sampai

batch 25 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 26 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 26 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 26 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



Gambar IV.10 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:20:1

Pada hasil TLC variabel 8:20:1 pada batch 1 hingga batch 16 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 16 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 17 hingga batch 24 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 17 sampai batch 24 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 25 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 25 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 25 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.



Gambar IV.11 Hasil TLC n-hexane setiap batch variabel 8:25:1

Pada hasil TLC variabel 8:25:1 pada batch 1 hingga batch 15 tidak ditemukan spot xanthone maupun kumarin, sehingga n-hexane pada batch 1 sampai batch 15 masuk ke dalam fraksi 1. Sementara pada hasil TLC pada batch 16 hingga batch 21 menunjukkan adanya spot xanthone dan spot yang tidak diketahui dibawah spot xanthone, sehingga n-hexane pada batch 16 sampai batch 21 masuk ke dalam fraksi 2. Pada hasil TLC batch 22 terdapat spot yang sejajar dengan spot xanthone, namun terlihat spot yang sejajar dengan standar kumarin, sehingga hasil TLC batch 22 masuk ke dalam fraksi 3 dimana hasil penguapan n-hexane pada batch 22 ini akan ditambahkan dengan kumarin hasil ekstraksi silica gel dengan methanol.

Pada **Tabel IV.1** ini merupakan kesimpulan hasil TLC setiap batch untuk mengelompokkan fraksi pada setiap variabel :

Tabel IV.1 Hasil TLC setiap batch untuk pengelompokan fraksi

Variabel	Fraksi	Batch
6:10:1	F1	1-5
	F2	6-15
	F3	16
6:15:1	F1	1-5
	F2	6-16
	F3	17
6:20:1	F1	1-12
	F2	13-25
	F3	26
6:25:1	F1	1-12
	F2	13-22
	F3	23
8:10:1	F1	1-20
	F2	21-27
	F3	28
8:15:1	F1	1-18
	F2	19-25
	F3	26
8:20:1	F1	1-16
	F2	17-24
	F3	25
8:25:1	F1	1-15
	F2	16-21
	F3	22

Berdasarkan data pengelompokan hasil TLC pada setiap variabel, spot xanthone pada variabel 6:10:1 dan 6:15:1 terlihat pada batch 6. Sementara pada variabel 6:20:1 dan 6:25:1 spot xanthone terlihat pada batch 13. Pada variabel rasio silica gel terhadap PLF 8:1, spot xanthone terlihat pada batch 21 untuk variabel 8:10:1, batch 19 pada variabel 8:15:1, batch 17 pada variabel 8:20:1 dan batch 16 pada variabel 8:25:1. Dilihat dari

variabel jumlah pelarut n-hexane pada rasio silica gel terhadap PLF 8:1, dapat dilihat bahwa semakin banyaknya pelarut, semakin cepat spot xanthone terlihat. Begitu juga dengan spot kumarin yang terlihat semakin cepat. Hal tersebut terlihat dari jumlah batch yang semakin sedikit dengan semakin besarnya pelarut.

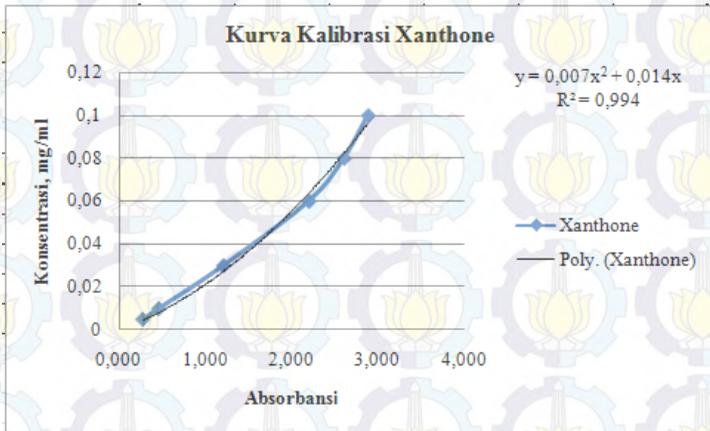
Sementara pada variabel rasio silica gel terhadap PLF 6:1, pada variabel 6:10:1 dan 6:15:1 spot xanthone dan kumarin terlihat pada batch lebih awal dibanding dengan variabel 6:20:1 dan 6:25:1. Hal ini berbeda dengan variabel 8:1 sebelumnya, dimana semakin besar pelarut, semakin cepat pula spot xanthone dan kumarin terlihat. Pada variabel 6:1 ini, dapat dikarenakan proses pengeringan silica gel yang kurang maksimal pada variabel 6:10 dan 6:15, serta adanya kontak yang lama antara silica gel dengan udara ketika akan memasukkan silica gel dari eksikator ke dalam reaktor pada proses stirred batch-reactor. Hal tersebut dapat mempengaruhi luas permukaan silica gel yang berkurang, karena semakin besar luas permukaan adsorben, maka daya adsorpsi akan semakin besar. Sehingga pada variabel 6:10 dan 6:15 daya adsorpsi dan desorpsi silica gel tidak sekuat pada variabel 6:20 dan 6:25.

Banyak sedikitnya jumlah pelarut akan mempengaruhi semakin cepat atau tidaknya spot xanthone dan kumarin ditemukan. Pada variabel 6:1 ini, hanya pada variabel 6:20 dan 6:25 yang jumlah batchnya semakin sedikit seiring bertambah besarnya jumlah pelarut.

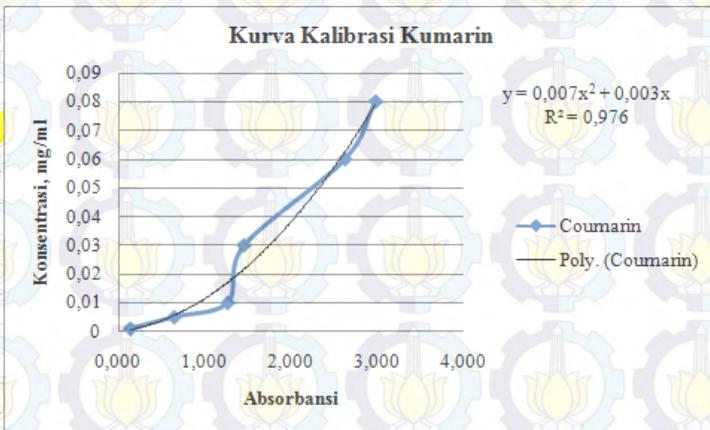
IV.4 Hasil Analisa Spectrophotometry UV-Visible

Untuk mengetahui berapa besar kandungan xanthone dan kumarin, maka digunakan analisa Spectrophotometry UV-Vis sebagai analisa kuantitatif. Sesuai prosedur, hal yang pertama kali dilakukan adalah mengetahui panjang gelombang maksimum dari larutan standar xanthone dan kumarin, yang diketahui masing-masing adalah 332 nm dan 308 nm. Panjang gelombang tersebut akan digunakan sebagai acuan untuk kurva kalibrasi xanthone dan

kumarin, serta pembacaan absorbansi pada sampel untuk mengetahui kadar xanthone dan kumarin dalam sampel.



Gambar IV.12 Kurva kalibrasi xanthone



Gambar IV.13 Kurva kalibrasi kumarin

Berdasarkan kurva kalibrasi yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi tersebut, didapatkan persamaan. Hasil absorbansi pada sampel masing-masing variabel kemudian akan dimasukkan dalam persamaan pada kurva kalibrasi untuk mengetahui konsentrasi masing-masing sampel. Setelah konsentrasi pada

sampel diketahui, selanjutnya dapat dilakukan perhitungan untuk menghitung % kadar dan % recovery xanthone dan kumarin pada setiap sampel untuk seluruh variabel. Berikut adalah hasil perhitungan % kadar dan % recovery xanthone dan kumarin pada setiap variabel :

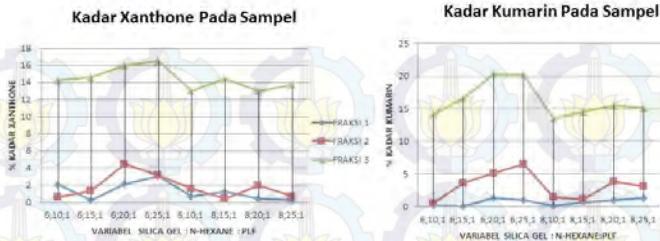
Tabel IV.2 Hasil perhitungan kadar dan % recovery xanthone dan kumarin

Variabel	N-Hexane				Methanol	
	F1		F2		F3	
	Xanthone	Kumarin	Xanthone	Kumarin	Xanthone	Kumarin
6:10:1	(2,0580) ^a (4,7570) ^b	(0,2006) (0,5056)	(0,6039) (1,0739)	(0,2443) (0,4738)	(14,2505) (94,1689)	(13,7429) (99,0205)
6:15:1	(0,2541) (0,6561)	(0,0685) (0,1928)	(1,2919) (1,8704)	(3,489) (5,5077)	(14,6172) (97,4733)	(12,9694) (94,2993)
6:20:1	(2,1330) (6,6160)	(1,2697) (4,2941)	(4,5009) (11,0489)	(3,8043) (10,1827)	(16,0140) (82,3349)	(15,2557) (85,5231)
6:25:1	(3,0524) (5,4054)	(0,9799) (1,8920)	(3,1589) (12,5061)	(5,5287) (23,8658)	(16,5230) (82,0884)	(13,7053) (74,2421)
8:10:1	(0,7274) (1,7650)	(0,0955) (0,2527)	(1,5939) (1,2857)	(1,2964) (1,1402)	(12,9871) (96,9491)	(12,1146) (98,6069)
8:15:1	(1,2060) (2,7235)	(0,5684) (1,3998)	(0,4042) (0,7094)	(0,5645) (1,0803)	(14,4465) (95,5669)	(13,3801) (97,5198)
8:20:1	(0,4612) (1,1657)	(1,0213) (2,8147)	(1,9809) (1,3605)	(2,8201) (2,1118)	(13,0250) (97,4737)	(11,6515) (95,0733)
8:25:1	(0,2417) (0,4998)	(1,3342) (3,0078)	(0,6496) (0,9498)	(1,7085) (2,7236)	(13,7480) (98,5503)	(12,0609) (94,2684)

a. %Kadar

b. % recovery

Berdasarkan hasil perhitungan % kadar dan % recovery xanthone dan kumarin pada setiap sampel, dapat dibuat grafik yang menunjukkan hubungan antara respon yang dihasilkan dengan variabel yang digunakan.

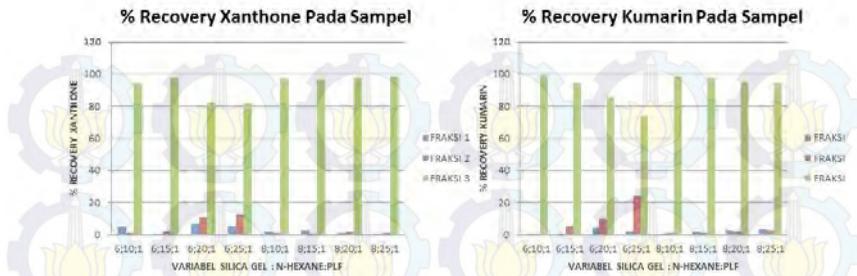


Gambar IV.14 Grafik pengaruh kadar xanthone dan kumarin terhadap variabel

Pada grafik diatas, merupakan grafik hubungan antara pengaruh kadar xanthone dan kumarin yang dihasilkan terhadap rasio variabel perbandingan silica gel terhadap PLF 6:1 dan 8:1 (g/g) serta rasio perbandingan n-hexane dengan PLF 10:1, 15:1, 20:1, 25:1. Fraksi 1 adalah fraksi n-hexane, dimana pada fraksi tersebut adalah n-hexane hasil keluaran proses stirred batch reactor pada hasil analisa TLC-nya tidak menunjukkan spot apapun. Fraksi 2 adalah fraksi n-hexane dengan hasil analisa TLC menunjukkan spot xanthone hingga sebelum spot kumarin terlihat. Fraksi 3 adalah fraksi methanol, dimana pada hasil TLC menunjukkan spot kumarin dan kemudian silica gel setelah proses stirred batch reactor diekstraksi dengan menggunakan methanol. Kadar xanthone terbaik untuk fraksi 1 ditunjukkan oleh variabel 6:25:1 dengan %kadar xanthone sebesar 3,0524. Sementara pada fraksi 2, kadar xanthone terbaik ditunjukkan oleh variabel 6:20:1 dengan % kadar xanthone sebesar 4,5009. Pada fraksi 3, kadar xanthone terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 dengan kadar xanthone sebesar 16,5230. Sementara untuk kumarin, kadar kumarin terbesar pada fraksi 1 terdapat pada variabel 8:25:1 dengan kadar kumarin sebesar 1,3342. Pada fraksi 2 kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 dengan kadar kumarin sebesar 5,5287. Pada fraksi 3 kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:20:1 dengan kadar kumarin sebesar 15,2557.

Apabila dilihat berdasarkan hasil perhitungan dan grafik, maka hasil kadar terbaik xanthone terdapat pada variabel 6:20:1 dan 6:25:1, untuk hasil kadar kumarin terbaik terdapat pada variabel 6:20:1 ; 6:25:1 dan 8:25:1. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh banyaknya jumlah silica yang digunakan, sehingga luas permukaan adsorben semakin besar dan daya adsorpsinya semakin kuat. Selain itu pada variabel tersebut, dapat dilihat kadar xanthone dan kumarin terbaik terdapat pada variabel yang memiliki jumlah pelarut besar. Sehingga, semakin banyaknya pelarut maka semakin besar daya ikat pelarut tersebut terhadap senyawa xanthone dan kumarin.

Pada penelitian ini diharapkan kadar xanthone dan kumarin sesuai dengan pengelompokan fraksi yang dibuat. Pada fraksi 1, yaitu fraksi n-hexane yang hasil analisa TLC-nya tidak menunjukkan spot apapun diharapkan kadar xanthone dan kumarin sangat kecil atau hampir tidak ada. Pada fraksi 2, yaitu fraksi n-hexane yang hasil analisa TLC-nya menunjukkan spot xanthone saja, diharapkan memiliki kadar xanthone yang tinggi dan kadar kumarin yang rendah. Sementara pada fraksi 3, yaitu fraksi methanol yang merupakan hasil ekstraksi silica gel, diharapkan kadar kumarin tinggi dan kadar xanthone yang sangat rendah apabila masih terdapat xanthone dalam fraksi tersebut. Pada hasil perhitungan yang ditampilkan pada **Tabel IV.1**, kadar xanthone tidaklah besar pada fraksi 2. Pada hasil perhitungan, dapat dilihat bahwa kadar xanthone dan kumarin sama besarnya pada fraksi 3. Hal ini belum sesuai dengan hasil yang diharapkan sebelumnya. Hal tersebut dapat dikarenakan sifat kepolaran xanthone dan kumarin yang tidak jauh berbeda, sehingga dalam proses pemisahannya harus digunakan proses isolasi yang lebih baik. Namun apabila dilihat dari kadar yang didapat, kadar xanthone dan kumarin pada sampel rata-rata meningkat pada fraksi 3 dari kadar xanthone dan kumarin yang terdapat di dalam PLF. Kadar xanthone dan kumarin pada PLF adalah 9,3476 dan 8,5730.



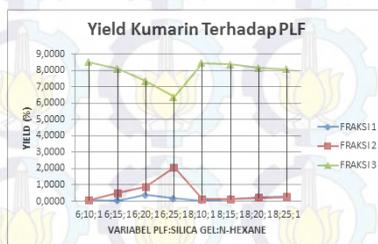
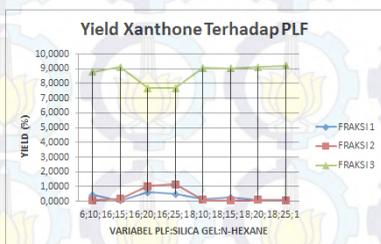
Gambar IV.15 Grafik pengaruh % recovery xanthone dan kumarin terhadap variabel

Berdasarkan gambar grafik hubungan antara % recovery dengan variabel diatas, %recovery xanthone pada fraksi 1 yang terbaik terdapat pada variabel 6:20:1 dengan %recovery sebesar 6,61 %. Sementara % recovery xanthone pada fraksi 2, yang terbaik ditunjukkan oleh variabel 6:25:1 dengan %recovery sebesar 12,5061% dan pada fraksi 3 %recovery terbaik terdapat pada variabel 8:25:1 sebesar 98,5503 %. Sementara untuk %recovery kumarin yang terbaik pada fraksi 1 terdapat pada variabel 6:20:1 dengan %recovery sebesar 4,2941% . Pada fraksi 2, % recovery kumarin terbaik terdapat pada variabel 6:25:1 dengan %recovery sebesar 23,8658% dan untuk fraksi 3 hasil %recovery terbaik terdapat pada variabel 6:10:1 sebesar 99,0205 %. Pada %recovery xanthone dan kumarin terdapat perbedaan antara hasil %recovery dalam fraksi 3 yang terbaik. Hal ini dapat dikarenakan karena proses pemisahan senyawa yang kurang maksimal. Sementara itu pada %recovery terbaik untuk xanthone seharusnya terdapat pada fraksi 2, namun %recovery xanthone dan kumarin sama besarnya pada fraksi 3. Hal ini dikarenakan proses pengisolasian senyawa xanthone dan kumarin yang tidak maksimal. Selain itu sifat kepolaran xanthone dan kumarin yang tidak jauh berbeda, sehingga diperlukan proses isolasi yang lebih baik untuk mengikat senyawa tersebut. Selain itu, variabel jumlah silica gel yang banyak yakni 6 dan 8 (g) mempengaruhi proses adsorpsi xanthone dan kumarin yang sangat kuat, sehingga hasil yang kurang stabil karena proses stirred batch-reactor yang terlalu

panjang. Jika dilihat pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fika et al pada tahun 2015, jumlah rasio silica yang digunakan tidaklah besar, yakni 2, 3 dan 6 (g). Pada proses stirred batch reactor yang dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Fika et al, jumlah batch yang diperlukan hanya 4 batch untuk rasio silica gel 2 (g), 16 batch untuk rasio silica gel 3 (g) dan 23 batch untuk rasio silica gel 6 (g). Berdasarkan perbandingan tersebut, jumlah silica gel yang semakin banyak akan semakin kuat mengikat xanthone, sehingga xanthone akan terlihat pada jumlah batch yang semakin meningkat. (Fika et al,2015).

TABEL IV.3 % Yield xanthone dan kumarin terhadap plf

VARIABEL	YIELD XANTHONE			YIELD KUMARIN		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
6:10:1	0,4447	0,1004	8,8026	0,0433	0,0406	8,4890
6:15:1	0,0613	0,1748	9,1114	0,0165	0,4722	8,0843
6:20:1	0,6184	1,0328	7,6964	0,3681	0,8730	7,3319
6:25:1	0,5053	1,1690	7,6733	0,1622	2,0460	6,3648
8:10:1	0,1650	0,1202	9,0624	0,0217	0,0978	8,4536
8:15:1	0,2546	0,0663	9,0267	0,1200	0,0926	8,3604
8:20:1	0,1090	0,1272	9,1115	0,2413	0,1811	8,1506
8:25:1	0,0467	0,0888	9,2121	0,2579	0,2335	8,0816



GAMBAR IV.16 Grafik yield xanthone dan kumarin terhadap plf

Pada Gambar IV.16 merupakan gambar grafik dari yield xanthone dan kumarin terhadap PLF. Yield ini merupakan massa senyawa bioaktif yang diperoleh dari fraksi setiap variabel per total PLF. Berdasarkan hasil grafik yield xanthone terhadap plf, yield terbaik untuk fraksi 1 terdapat pada variabel 6:20:1 dengan

%yield sebesar 0,6184. Pada fraksi 2, yield terbaik ada pada variabel 6:25:1 sebesar 1,1690. Pada fraksi 3, yield terbaik ada pada variabel 8:25:1 dengan %yield sebesar 9,2121. Sementara untuk yield kumarin terhadap PLF, pada fraksi 1 yield terbaik terdapat pada variabel 6:20:1 dengan yield sebesar 0,3681. Pada fraksi 2, yield kumarin terbaik terdapat pada variabel 6:25:1 dengan yield sebesar 2,0460. Pada fraksi 3, yield kumarin terbaik terdapat pada variabel 6:10:1 dengan yield sebesar 8,4890.

Pada hasil perhitungan yield terhadap PLF terdapat kesamaan hasil pada fraksi 1 dan fraksi 2 untuk xanthone dan kumarin, yaitu variabel terbaik terdapat pada 6:20:1 dan 6:25:1. Sementara pada fraksi 3 terdapat perbedaan variabel yield yang terbaik. Hal ini dapat dikarenakan proses isolasi xanthone dan kumarin yang kurang maksimal.

IV.5 Analisa Pengaruh Variabel Terhadap Hasil Penelitian

Dengan hasil yang didapatkan dari penelitian yang sudah dilakukan, untuk mengetahui variabel-variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan dapat digunakan bantuan software Desain Expert 9.03. Dengan mengetahui variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan, maka akan semakin mudah untuk memaksimalkan variabel respon yang diinginkan.

Tabel IV.4 Hasil urutan percobaan untuk xanthone dengan menggunakan Desain Expert

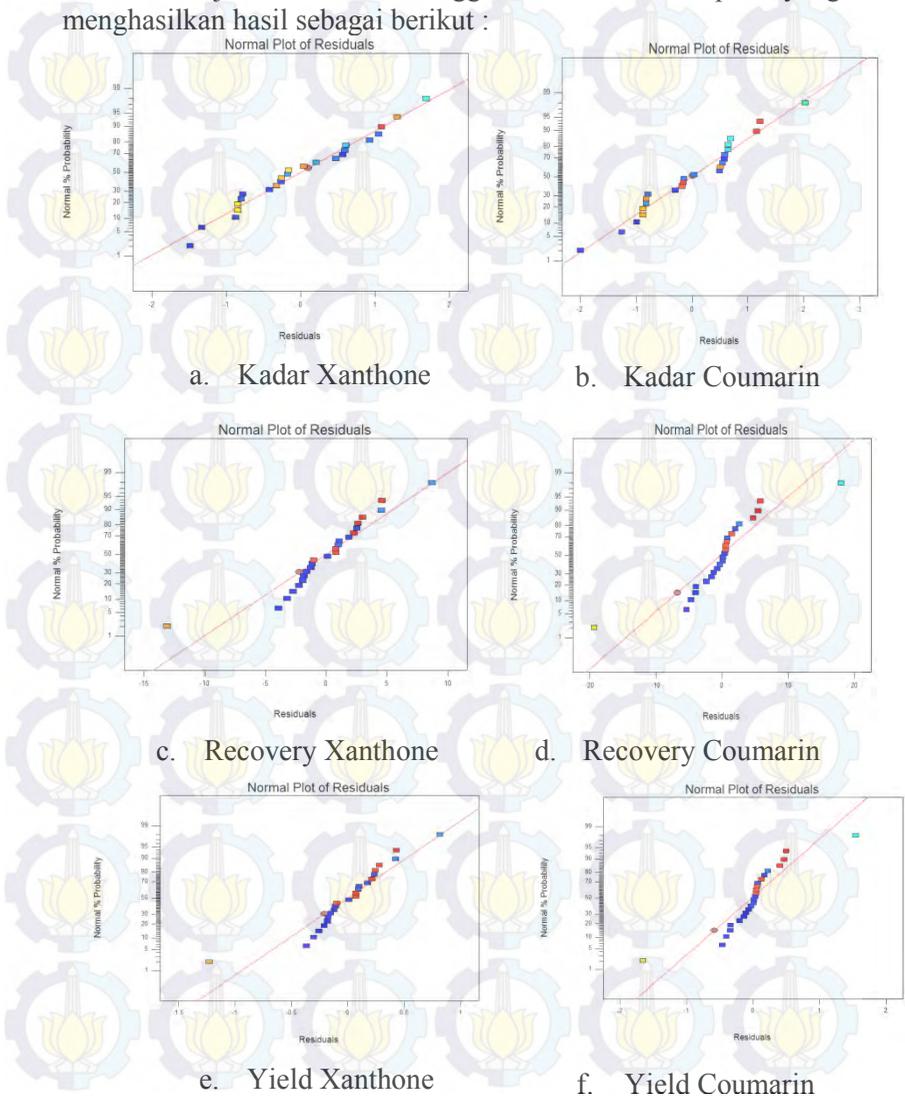
Run	A- Silika gel terhadap PLF (g/g)	B- N-Hexane terhadap PLF (g/g)	C- Fraksi	Kadar Xanthone (%)	Recovery Xanthone (%)	Yield Xanthone (%)
1	8	10	F2	1.59399	1.28575	0.120187
2	8	25	F1	0.24177	0.499872	0.0467261
3	6	25	F1	3.05244	5.40545	0.505281
4	6	10	F1	2.05804	4.75708	0.444673
5	6	10	F3	14.2505	94.169	8.80255
6	6	10	F2	0.603903	1.07395	0.100389
7	6	15	F2	1.29197	1.87049	0.174846
8	8	20	F3	13.0251	97.4737	9.11147
9	8	15	F3	14.4466	96.567	9.02671
10	8	10	F3	12.9872	96.9492	9.06244
11	8	15	F1	1.206	2.72355	0.254587
12	6	20	F1	2.13306	6.61607	0.618444
13	8	20	F1	0.461214	1.16575	0.108969
14	6	15	F1	0.254143	0.656138	0.0613332
15	8	10	F1	0.727474	1.76506	0.164991
16	8	20	F2	1.98092	1.36051	0.127175
17	8	25	F2	0.649644	0.949811	0.0887847
18	6	15	F3	14.6173	97.4734	9.11143
19	6	25	F3	16.5231	82.0884	7.67331
20	6	20	F2	4.50092	11.0489	1.03281
21	8	25	F3	13.748	98.5503	9.2121
22	8	20	F3	13.0251	97.4737	9.11147
23	8	15	F2	0.404233	0.709498	0.0663211
24	6	25	F2	3.15896	12.5061	1.16903

Tabel IV.5 Hasil urutan percobaan untuk coumarin dengan menggunakan Desain Expert

Run	A- Silika gel terhadap PLF (g/g)	B- N-Hexane terhadap PLF (g/g)	C- Fraksi	Kadar Coumarin (%)	Recovery Coumarin (%)	Yield Coumarin (%)
1	8	10	F2	1.29649	1.14027	0.0977555
2	8	25	F1	1.33424	3.00786	0.257864
3	6	25	F1	0.979904	1.89207	0.162207
4	6	10	F1	0.200625	0.505637	0.0433483
5	6	10	F3	13.743	99.0205	8.48902
6	6	10	F3	0.244364	0.47383	0.0406214
7	6	10	F2	3.48904	5.5078	0.472183
8	6	15	F2	11.6515	95.0733	8.15063
9	8	20	F3	13.3802	97.5199	8.36037
10	8	15	F3	12.1146	98.607	8.45357
11	8	10	F3	0.568479	1.39981	0.120006
12	8	15	F1	1.26973	4.29414	0.368136
13	6	20	F1	1.02135	2.81479	0.241312
14	8	20	F1	0.0685016	0.192835	0.0165317
15	6	15	F1	0.0955468	0.252771	0.02167
16	8	10	F1	2.82011	2.11188	0.181051
17	8	20	F2	1.70854	2.72367	0.2335
18	8	25	F2	12.9694	94.2994	8.08428
19	6	15	F3	13.7054	74.2421	6.36477
20	6	25	F3	3.80433	10.1827	0.872967
21	6	20	F2	12.0609	94.2685	8.08163
22	8	25	F3	11.6515	95.0733	8.15063
23	8	20	F3	0.564495	1.08031	0.0926148
24	8	15	F2	5.52877	23.8658	2.04601

Dari data yang didapatkan selama percobaan, dengan menggunakan software desain expert, dilakukan uji normalitas terhadap data-data yang didapatkan. Uji normalitas tersebut dapat digunakan untuk mengetahui apakah data yang dihasilkan tersebut sudah cukup bagus dan untuk meminimalisir nilai deviasi

yang besar. Dari ketiga jenis respon yang dihasilkan tersebut, dilakukan uji normalitas menggunakan desain expert yang menghasilkan hasil sebagai berikut :



Gambar IV.17 Grafik uji normalitas dari desain expert

Berdasarkan gambar di atas, data yang memuat nilai kadar, recovery, dan yield baik itu dari *xanthone* maupun *coumarin* tersebar merata pada garis diagonal. Hal ini menunjukkan bahwa data yang didapatkan dari hasil percobaan memiliki distribusi yang cukup normal. Suatu data dapat dikatakan memiliki distribusi yang normal apabila data tersebut persebarannya mengikuti garis diagonal (Warman, 2013).

Setelah menguji kenormalan data-data yang dihasilkan pada percobaan, selanjutnya dengan menggunakan software yang sama dapat diketahui variabel-variabel yang memiliki pengaruh yang paling signifikan untuk setiap respon yang diberikan (*Analisa Of Variance*). Dalam analisa ini, P-Value dapat diaplikasikan untuk mengetahui pengaruh variabel yang paling signifikan terhadap respon yang diberikan. Apabila nilai P-Value < 0,05, maka hal tersebut mengindikasikan bahwa variabel tersebut memiliki pengaruh yang signifikan (Montgomery, 2005).

Tabel IV.6 ANOVA pengaruh variabel terhadap kadar xanthone

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	856,92	6	142,82	143,78	<0,0001
A ^{*)}	11,69	1	11,69	11,77	0,0032
B ^{**)}	3,79	3	1,26	1,27	0,3161
C ^{***)}	853,78	2	426,89	429,77	<0,0001
Residual	16,89	17	0,99		
<i>Lack of Fit</i>	16,89	16	1,06		
<i>Pure Error</i>	0,000	1	0,00		
Total	873,81	23			

^{*)} Variabel Silica Gel

^{**)} Variabel N-Hexane

^{***)} Fraksi: F1, F2, F3

Tabel IV.7 ANOVA pengaruh variabel terhadap kadar coumarin

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	679,40	6	113,23	96,97	<0,0001
A ^{*)}	5,52	1	5,52	4,73	0,0441
B ^{**)}	5,28	3	1,76	1,51	0,2483
C ^{***)}	673,91	2	336,96	288,54	<0,0001
Residual	19,85	17	1,17		
<i>Lack of Fit</i>	19,85	16	1,24		
<i>Pure Error</i>	0,000	1	0,000		
Total	699,26	23			

^{*)} Variabel Silica Gel

^{**)} Variabel N-Hexane

^{***)} Fraksi: F1, F2, F3

Untuk analisa variabel yang memiliki pengaruh paling signifikan terhadap kadar yang dihasilkan pada percobaan, dari data tabel yang tersaji di atas diketahui bahwa variabel A memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kadar yang dihasilkan karena nilai P-Value yang $< 0,05$. Dari tabel tersebut menunjukkan kadar xanthone dan coumarin yang dihasilkan bergantung pada jumlah silica gel yang digunakan dalam percobaan karena nilai P-value $< 0,05$.

Tabel IV.8 ANOVA pengaruh variabel terhadap recovery xanthone

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	44881,64	6	7480,89	338,89	<0,0001
A ^{*)}	8,72	1	8,72	0,40	0,5380
B ^{**)}	32,79	3	10,93	0,50	0,6905
C ^{***)}	44352,22	2	22176,11	1004,67	<0,0001
Residual	375,24	17	22,07		
<i>Lack of Fit</i>	375,24	16	23,45		
<i>Pure Error</i>	0,0000	1	0,0000		
Total	45256,88	23			

^{*)} Variabel Silica Gel

^{**)} Variabel N-Hexane

^{***)} Fraksi: F1, F2, F3

Tabel IV.9 ANOVA pengaruh variabel terhadap recovery coumarin

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	42968,00	6	7161,33	136,55	<0,0001
A ^{*)}	3,38	1	3,38	0,064	0,8026
B ^{**)}	13,02	3	4,34	0,083	0,9685
C ^{***)}	42430,96	2	21215,48	404,54	<0,0001
Residual	891,54	17	52,44		
<i>Lack of Fit</i>	891,54	16	55,72		
<i>Pure Error</i>	0,0000	1	0,000		
Total	43859,54	23			

^{*)} Variabel Silica Gel

^{**)} Variabel N-Hexane

^{***)} Fraksi: F1, F2, F3

Dari data pada kedua tabel diatas, dapat diketahui bahwa variabel A tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon berupa recovery xanthone dan coumarin yang dihasilkan.

Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai P-Value pada variabel A yang memiliki nilai $> 0,05$. Hal ini dikarenakan variabel silika gel yang digunakan dalam percobaan sudah berada dalam rentang dimana banyak sedikitnya silika gel akan menghasilkan hasil (recovery) yang sama.

Tabel IV.10 ANOVA pengaruh variabel terhadap yield xanthone

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	392,17	6	65,36	338,89	<0,0001
A ^{*)}	0,076	1	0,076	0,40	0,5380
B ^{**)}	0,29	3	0,095	0,50	0,6905
C ^{***)}	387,54	2	193,77	1004,67	<0,0001
Residual	3,28	17	0,19		
<i>Lack of Fit</i>	3,28	16	0,20		
<i>Pure Error</i>	0,000	1	0,000		
Total	395,45	23			

^{*)} Variabel Silica Gel

^{**)} Variabel N-Hexane

^{***)} Fraksi: F1, F2, F3

Tabel IV.11 ANOVA pengaruh variabel terhadap yield coumarin

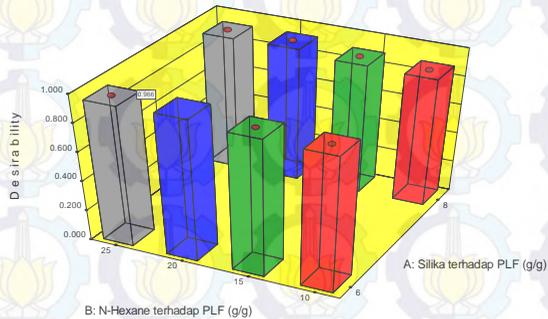
Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	315,80	6	52,63	136,55	<0,0001
A ^{*)}	0,025	1	0,025	0,064	0,8026
B ^{**)}	0,096	3	0,032	0,083	0,9685
C ^{***)}	311,85	2	155,93	404,54	<0,0001
Residual	6,55	17	0,39		
<i>Lack of Fit</i>	6,55	16	0,41		
<i>Pure Error</i>	0,000	1	0,000		
Total	322,35	23			

- *) Variabel Silica Gel
- **) Variabel N-Hexane
- ***) Fraksi: F1, F2, F3

Dari data pada kedua tabel diatas, dapat diketahui bahwa variabel A tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon berupa yield xanthone dan coumarin yang dihasilkan. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai P-Value pada variabel A yang memiliki nilai > 0,05. Hal ini dikarenakan variabel silika gel yang digunakan dalam percobaan sudah berada dalam rentang dimana banyak sedikitnya silika gel akan menghasilkan hasil (yield) yang sama.

Design: Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Desirability

X1 = A: Silika terhadap PLF
 X2 = B: N-Hexane terhadap PLF
 Actual Factor
 C: Fraksi = F3

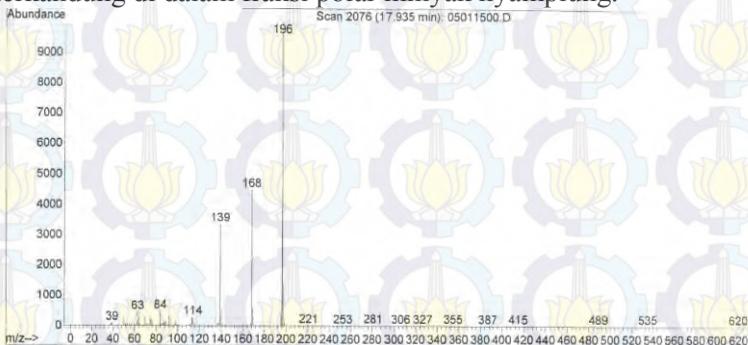


Gambar IV.18 Grafik optimasi variabel dari desain expert

Dari hasil eksperimen yang telah dilakukan, hasil paling maksimal didapatkan dari variabel 6:20:1 (Silika gel: n-hexane:PLF) dengan *desirability* sebesar 0,966. Dari hasil tersebut maka dicari variabel yang bisa digunakan untuk optimasi hasil yang didapatkan dengan menggunakan desain expert. Dari grafik optimization plot tersebut, didapatkan bahwa variabel yang dapat digunakan untuk menghasilkan produk yang optimum adalah variabel 6:20:1.

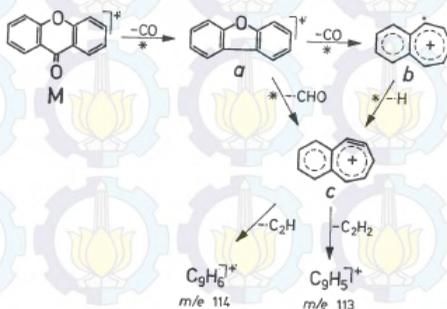
IV.6 Hasil Analisa GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Berdasarkan hasil TLC, pada sampel fraksi polar minyak nyamplung terdapat senyawa xanthone dan coumarin. Untuk membuktikan hasil kualitatif dengan TLC, dilakukan analisa GC-MS untuk mengetahui senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung di dalam fraksi polar minyak nyamplung.



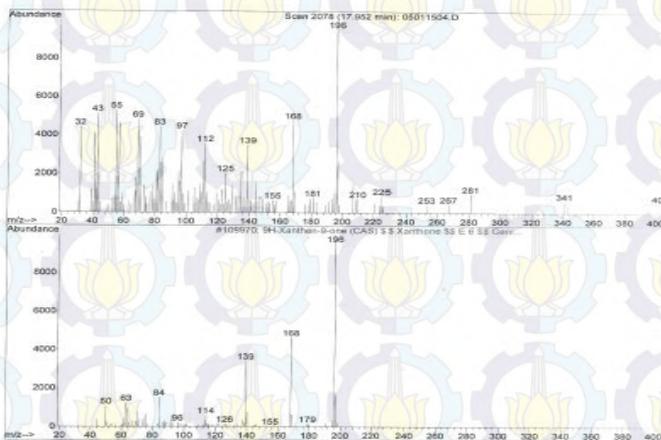
Gambar IV.19 Hasil analisa GC-MS dari larutan standar xanthone

Berdasarkan **Gambar IV.19** diketahui bahwa senyawa xanthone pada larutan standar terdeteksi di menit 17,935 dengan *base peak* sebesar 196. Untuk ciri khas peak dari senyawa xanthone terdeteksi muncul pada 196, 168, 139, 113, 98, 84, 63, 50, dan 38 m/z. Fragmentasi yang diperkirakan terjadi pada senyawa xanthone ditunjukkan pada gambar sebagai berikut :



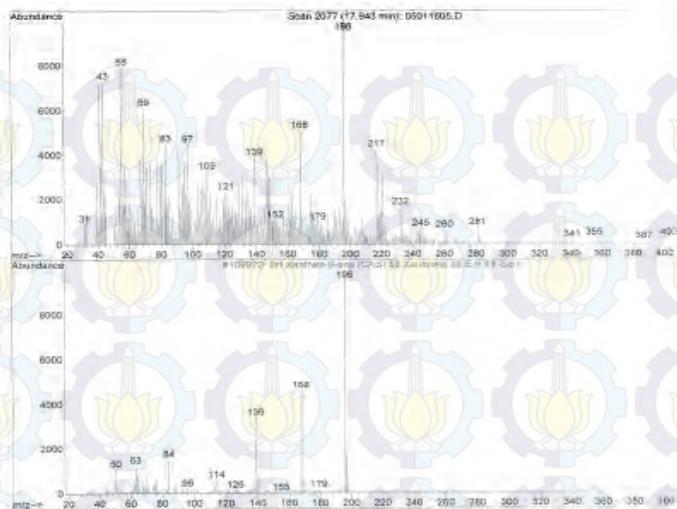
Gambar IV.20 Fragmentasi standar xanthone

Untuk mengetahui apakah fraksi polar minyak nyamplung mengandung senyawa xanthone, hasil GC-MS yang sudah dilakukan untuk F2 dan F3 didasarkan pada hasil uji GC-MS larutan standar di atas



Gambar IV.21 Hasil GC-MS xanthone pada fraksi 2 yang dibandingkan dengan larutan standar xanthone

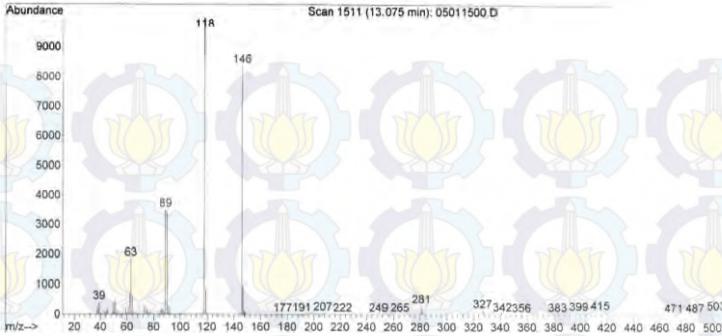
Dari **Gambar IV.21** di atas, dapat diketahui bahwa sampel fraksi 2, yaitu fraksi yang hasil analisa TLC n-hexane pada proses stirred batch-reactor menunjukkan spot xanthone dengan *base peak* 196 m/z yang sesuai dengan larutan standar xanthone, artinya F2 mengandung senyawa xanthone di dalamnya. Pada hasil uji GC-MS fraksi ini terlihat ada banyak peak yang tersebar di dalamnya, hal ini disebabkan karena hasil sampel yang digunakan belum murni 100% sehingga masih ada beberapa kandungan senyawa lain yang terdeteksi dalam uji GC-MS.



Gambar IV.22 Hasil GC-MS xanthone pada fraksi 3 yang dibandingkan dengan larutan standar xanthone

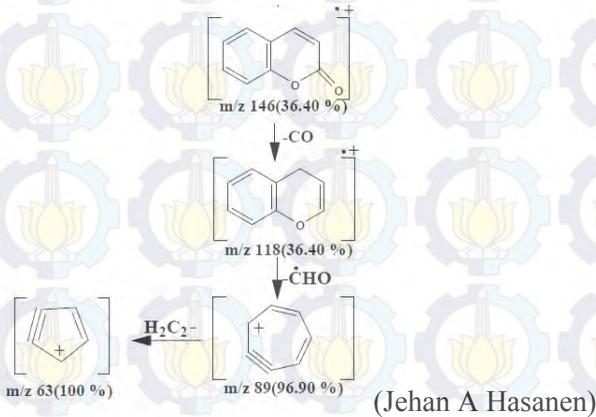
Dari **Gambar IV.22** di atas, dapat diketahui bahwa sampel Fraksi 3 yaitu fraksi yang hasil analisa TLC n-hexane pada proses *stirred batch-reactor* menunjukkan spot xanthone dengan *base peak* 196 m/z yang sesuai dengan larutan standar xanthone, artinya F3 mengandung senyawa xanthone setelah dibandingkan dengan hasil GC-MS pada larutan standar. Pada hasil uji GC-MS fraksi 3 ini dapat dilihat ada banyak peak yang tersebar di dalamnya, hal ini disebabkan karena hasil sampel yang digunakan belum murni 100% sehingga masih ada beberapa kandungan senyawa lain yang terdeteksi dalam uji GC-MS.

Dari uji GC-MS yang sudah dilakukan pada sampel fraksi 2 dan fraksi 3 mengandung senyawa xanthone di dalamnya.



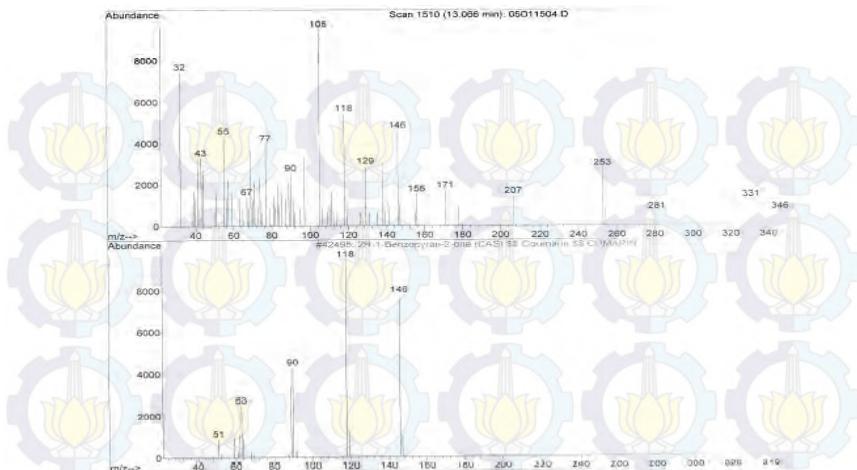
Gambar IV.23 Hasil GC-MS untuk larutan standar coumarin

Melalui uji GC-MS terhadap larutan standar kumarin yang digunakan dapat dilihat bahwa coumarin mulai terlihat pada menit ke 13,07 dengan peak sebesar 146. Sementara itu untuk ciri khas peak dari senyawa coumarin terdeteksi muncul pada 146, 118, 89, 63, 51, dan 39 m/z. Fragmentasi yang diperkirakan terjadi pada senyawa coumarin ditunjukkan pada gambar sebagai berikut :



Gambar IV.24 Fragmentasi standar xanthone

Untuk mengetahui apakah hasil percobaan mengandung senyawa coumarin di dalamnya, dilakukan pula uji GC-MS dan setelah itu hasil uji tersebut dibandingkan dengan hasil GC-MS pada larutan standar.



Gambar IV.25 Hasil GC-MS coumarin pada fraksi 2 yang dibandingkan dengan larutan standar coumarin

Dari **Gambar IV.25** di atas, dapat diketahui bahwa sampel fraksi 2 mengandung senyawa coumarin dengan *base peak* sebesar 146 m/z setelah dibandingkan dengan hasil GC-MS pada larutan standar. Pada hasil uji GC-MS F2 ini dapat dilihat ada banyak peak yang tersebar di dalamnya, hal ini disebabkan karena hasil sampel yang digunakan belum murni 100% sehingga masih ada beberapa kandungan senyawa lain yang terdeteksi dalam uji GC-MS.

Pada hasil uji GC-MS untuk F3, tidak ditemukan senyawa coumarin di dalamnya. Hal ini dikarenakan senyawa coumarin yang terdapat dalam fraksi 3 memiliki kadar yang masih kecil bila dibandingkan dengan *impurities* yang ada di dalam F3, sehingga terjadi *overlapped* yang menyebabkan senyawa coumarin dalam F3 tidak bisa terdeteksi.

Selain xanthone dan coumarin yang terdeteksi di dalam F2 dan F3, terdapat beberapa senyawa yang terdeteksi di dalamnya. **Tabel IV.12** dan **Tabel IV.13** berikut akan menyajikan beberapa senyawa yang terdeteksi pada uji GC-MS dari F2 dan F3

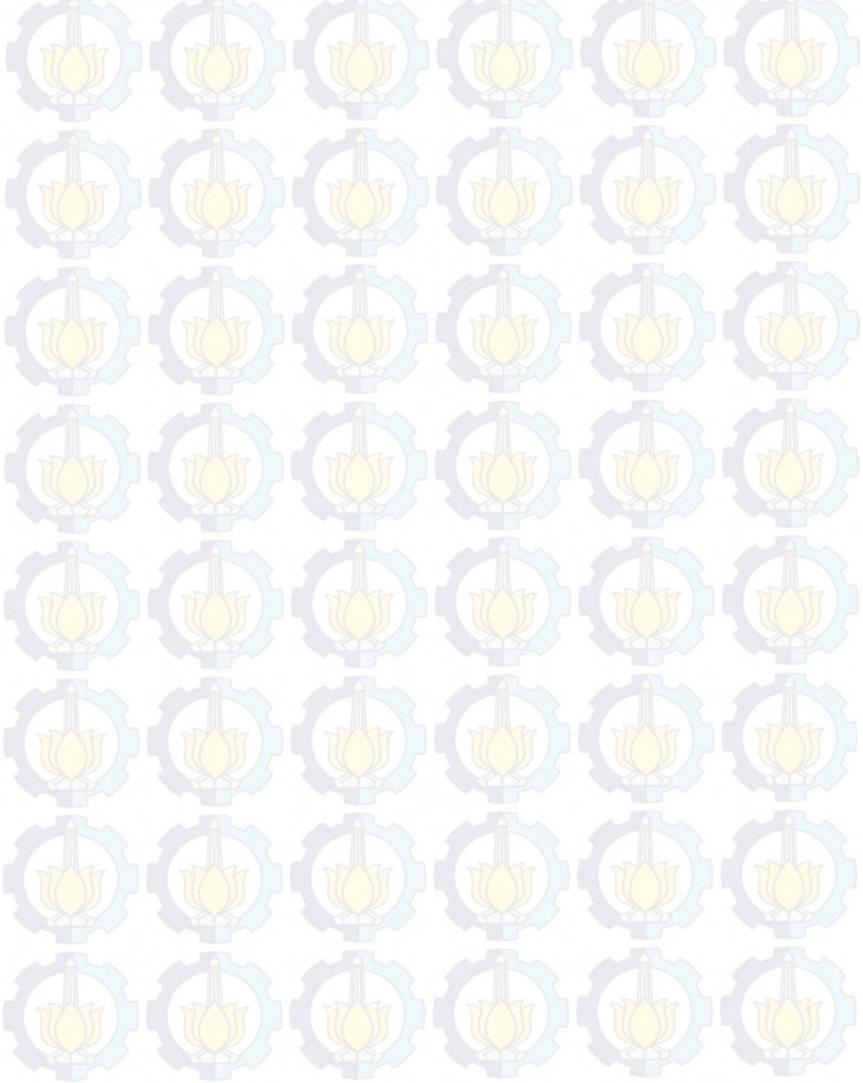
Tabel IV.12. Senyawa dalam F2

Peak	R,T (min)	Komponen	%Area	Quality
1	7,776	1-Octanol	4,640	90
2	13,066	2H-1Benzopyran-2-one (coumarin)	0,011	38
3	17,9	9H-Xanthen-9-one	0,129	49
4	18,494	Hexadecanoic acid, methyl ester	13,923	99
5	18,890	n-Hexadecanoic acid	0,484	99
6	20,240	8-Octadecanoic acid, methyl ester	44,187	99
7	20,421	Octadecanoic acid, methyl ester	13,348	99
8	20,558	9-Octadecanoic acid (z)-	1,730	97
9	21,462	5-Methylthio-6H-indeno [2,1-e] pyrazolo [1,5-a] pyrimidine	0,459	53
10	21,868	4,8-Ethano-4H-1, 3- benzodioxin, hexahydro	1,764	47
11	21,935	1-5-Diphenyl-2H-1,2,4- triazoline-3-thione	1,115	27
12	22,081	Eicosanoic acid, methyl ester	1,237	99
13	22,674	Hexanedioic acid, bis (2- ethylhexyl) ester	0,735	91
14	23,294	9-Octadecenal, (z)	1,051	93
15	25,350	9-Octadecanoic acid (z)	0,539	53
16	27,500	Hasubanan-6, 9-diol, 4,5- epoxy-3-methoxy-17- methyl	0,970	70
17	28,111	Hasubanan-6, 9-diol, 4,5- epoxy-3-methoxy-17- methyl	0,469	92
18	31,715	4-[bis(4- methylphenylsulfonyl) methyl] pyridine	1,366	59

Tabel IV.13. Senyawa dalam F3

Peak	R,T (min)	Komponen	%Area	Quality
1	12,404	2- Propenic acid, 3-phenyl-, methyl amic acid methyl ester	8,75	97
2	17,943	9H-Xanthen-9-one	0,012	64
3	18,502	Hexadecanoic acid	1,680	98
4	20,274	7-Octadecanoic acid	4,933	99
5	20,446	Octadecanoic acid	1,514	99
6	21,960	2-Methyl-7H-1, 3, 4-thiadiazolo [3, 2-A] pyrimidin-7-one	0,510	43
7	22,046	Cyclohexene, 4-(4-ethylcyclohexyl)-1-phenyl	0,458	78
8	23,397	9-Octadecenoic acid (z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	0,607	41
9	23,897	Hexadecanoic acid, 2-hydroxyl-1-(hydroxymethyl) ethyl ester	3,532	91
10	24,214	4a (2H)-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,3,4,9,10,10a-hexahydro-6-menthoxy-1,1-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, methyl ester, (4a-trans)	0,347	55
11	24,558	1,1,2,3,5,6- Hexamethyl-4-necpentyl-2,4-cyclohexadiene	0,381	46
12	24,730	Cholesta-3-one, 5-	0,381	81

		hydroxy-, (5, alpha)		
13	25,152	Herqueinone	1,397	90



BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan hasil analisa yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar xanthone terbesar yang terisolasi dari PLF, pada variabel rasio perbandingan *silica gel* : n-hexane : PLF untuk fraksi 1 terbesar pada variabel 6:25:1 sebesar 3,0524%. Pada fraksi 2 kadar xanthone terbesar terdapat pada variabel 6:20:1 sebesar 4,5009%. Pada fraksi 3 kadar xanthone terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 sebesar 16,5230%. Kadar kumarin pada fraksi 1 terbesar pada variabel 8:25:1 sebesar 1,3342%. Pada fraksi 2, kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:25:1 sebesar 5,5287%. Pada fraksi 3, kadar kumarin terbesar terdapat pada variabel 6:20:1 sebesar 15,2557%.

V.2 Saran

1. Variabel *silica gel* yang digunakan tidak terlalu banyak, karena semakin banyak *silica gel* yang digunakan maka daya adsorpsi akan semakin kuat dan jumlah batch pada proses stirred batch-wise akan semakin bertambah banyak. Banyaknya jumlah batch akan berpengaruh pada kestabilan proses adsorpsi-desorpsi, sehingga dapat mempengaruhi hasil terbaik pada setiap fraksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiani, Fika Marissa., Pertiwi, Anggie Puteri. 2015. *Pemisahan dan Pemurnian Bioactive Compounds dari Fraksi Polar Minyak Nyamplung (Calophyllum inophyllum)*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember
- Blanco-Ayala, Tonali., Lugo-Huitron, Rafael., Serano-Lopez, Elizabeth M., et al. 2013. *Antioxidant properties of xanthenes from Calophyllum brasiliense: prevention of oxidative damage induced by FeSO₄*. Mexico: Instituto Nacional de Neurología Neurocirugía Manuel Velasco Suárez
- Cechinel Filho, V., Junior, I.F.S., Zacchino, S.A., Lima, J.C.S., and Martins, DTO., 2009. *Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado*. Brazilian Journal of Pharmacognory 19 (1B): 242-248.
- Crane, S., Aurore, G., Joseph, H., Mouloungui, Z., and Bourgeois, P., 2005. *Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in Callophyllum calaba L. oil from Guadeloupe*. Phytochemistry 66: 1825-1831.
- Day, R.A.Jr. and Underwood, A.L., 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga
- Demirbas, A. 2003. *Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterification and other methods: a survey*. Energy Convers Manage 44: 2093-2109.
- Dhar, A., Kevin, R., and Agarwal, A.K., 2012. *Production of biodiesel from high FFA neem oil and its performance, emission, and combustion characterization in a single cylinder DIC1 engine*. Fuel Process Technology 97: 118-129.
- Dweck, A.C., and Meadows, T., 2002. *Tamanu*. International Journal of Cosmetic Science 2002, 24: 1-8.

- Fessenden, J.R., 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Friday, J.B., and Okano, D., 2006. *Calophyllum inophyllum (kamani)*. Species Profiles for Pacific Island Argoforestry.
- Games, D.E., 1972. *Identification of 4-phenyl and 4-alkylcoumarin in mammea americana L., Mammea africana G. don and Calophyllum inophyllum L. by Gas Chromatography - Mass Spectrometry*. Tetrahedron Letters no. 31: 3187-3190.
- Giesen, W., Wulfraat, S., Zierem, M., and Scholten, L., 2006. *Mangrove Guide Book for Southeast Asia Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Thailand: Wetlands International Dharmasam Co., Ltd.*
- Gunawan, S., Jeng, B.R., Ju, Y.H., 2013. *Regeneration of Silica Gel for Separation of Squalene and Steryl Esters from Soybean Oil Deodorizer Distillate*. International Review of Chemical Engineering Vol. 5, N.2.
- Gunawan, S., Fabian, C., Ju, Y.H., 2008. *Isolation and Purification of Fatty Acid Steryl Esters from Soybean Oil Deodorizer Distillate*. Ind-Eng-Chem Rex (2008) 47: 7013-7018.
- Hargono dan Haryani, K. 2010. *Pengaruh Jenis Solvent dan Variasi Tray pada Pengambilan Minyak Nyamplung dengan Metode Ekstraksi Kolom*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”. ISSN 1693-4393.
- Hemavathy, J., and Prabhakar. J.V., 1990. *Lipid Composition of Calophyllum inophyllum Kernel*. Discipline of Convenience Foods and Confectionery. 67: 955-957.
- Iskandari, Anna. 2010. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Quercetrin dari Daun Nyamplung*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Ismail, A.F., Khulbe, K.C., and Matsuura, T. 2015. *Gas Separation Membranes: Polymeric and Inorganic*. Switzerland: Springer.

- Itoigawa, M., Ito, C., Tan, H.T.W., Kuchide, M., Tokuda, H., Nishino, H., and Furukawa, H., 2001. *Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from Calophyllum inophyllum*. *Cancer Letters*. 169: 223-231.
- Jena, P.C., Rachman, H., Prasama Kumar G.V., and Machavaram, R., 2010. *Biodiesel production from mixture of mahua and simarouba oils with high free fatty acids*. *Biomass Bioenergy* 34: 1108-1116.
- Laure, F., Raharivelomanana, P., Butaud, J.F., Bianchini, J.P., and Gaydou, E.M., 2008. *Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of Calophyllum inophyllum leaf extracts from French Polynesia Islands*. *Analytica Chimica Acta* 624, 147-153.
- Lim, T.K., 2012. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants Volume 2: Fruits*. Netherlands: Springer Netherlands.
- Ling, K.H., Kian, C.T., and Hoon, T.C., 2009. *A Guide to Medicinal Plant*. Singapore World Scientific.
- Muslihah, I. N., 2013. *Calophyllum inophyllum (Nyamplung): Obat HIV AIDS*. Jakarta: Wahana Berita Mangrove Indonesia.
- Montgomery, D.C., 2005. *Design and Analysis of Experiments 6th Edition*. New York: John Willey and Sons, Page 96
- Ong, H.C., Masjuki, H.H., Mahlia, T.M.I., Silitonga A.S., Chong, W.T., and Leong, K.Y., 2014. *Optimization of biodiesel production and engine performance from high free fatty acid Calophyllum inophyllum oil in CI diesel engine*. *Energy Conversion and Management*. 81: 30-40.
- Patil, A.D., Freyer, A.J., Eggleston, D.S., Haltiwanger, R.C., Bean, M.F., Taylor, P.B., Caranfa, M.J., Breen, A.L., Bartus, H.R., Johnson, R.K., Hertzberg, R.P., dan Westley, J.W., 1993. *The Inohyllum Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree Calophyllum inophyllum Linn*. *Journal of Medicinal Chemistry*. 36: 4131-4138.

- Pawar, K.D., Joshi, S.P., Bhide, S.R., and Thengane, S.R., 2007. *Pattern of anti-HIV dipyrano coumarin expression in callus cultures of Calophyllum inophyllum Linn.* Journal of Biotechnology. 130: 346-353.
- Pawar, K.D., and Thengane, S.R., 2009. *Influence of hormones and medium components on expression of dipyrano coumarins in cell suspension cultures of C. inophyllum L.* Process Biochemistry. 44: 916-922.
- Ruthven, D.M., 1984. *Principle of Adsorption and Adsorption Process.* New York: John Wiley and Sons Inc.
- Sadek, P. 2002. *The HPLC Solvent Guide.* United States of America: Wiley of Interscience
- Sahoo, P.K., and Das, L.M., 2009. *Process optimization for biodiesel production from Jatropha, Karanja, and Polanga oils.* Fuel 88: 1588-1594.
- Saputra, T. and Claratika, A. 2014. *Pemisahan dan Pemurnian Squalene dari Minyak Nyamplung.* Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Spino, C., Dodier, M., and Sotheeswaran., 1998. *Anti-HIV Coumarins from Calophyllum Seed Oil.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 8: 3475-4378
- Supriadi, H., dan Wicaksono, I.N.A., 2013. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Volume 19 Nomor 1.* April 2013
- Thengane, S.R., Bhosle, S.V., Deodhar, S.V., Pawar, K.D., and Kulkarni, D.K., 2006. *Micropropagation of Indian Laurel (Calophyllum inophyllum), a source of anti-HIV compounds.* Research Communications.
- Toro-Vazquez, J.F., and Rocha-Uribe, A., 1993. *Adsorption Isotherms of Sesame Oil in a Concentrated Miscella System.* J. Am. Oil Chem. Soc. 70: 589-594
- Venkanna, B.K. and Reddy, C.V., 2009. *Biodiesel production and optimization from Calophyllum inophyllum linn oil (honne oil) - A three stage method.* Bioresource Technology. 100: 5122-5125.

Wilkie, M.L., Fortuna, S., and Souksavat, O., 2002. *FAO's database on mangrove area est rest. Rome: Resources Assessment Working Paper No.62.*

Warman, Joni. 2013. *Mengolah Data Penelitian Kuantitatif.* <http://joniwarman.wordpress.com>. Diakses pada 10 Januari 2016 pukul 10.00 WIB

Yimdjo, M.C., Azebaze A.G., Nkengfack A.E., Meyer, A.M., Bodo, B., and Fomum, Z.T., 2004. *Antimicrobial and Cytotoxic Agents from Calophyllum inophyllum.* *Phytochemistry.* 65: 2789-2795.

Yunitasari, E.P., 2008. *Pengaruh Jenis Solvent dan Variasi Tray pada Pengambilan Minyak Nyamplung dengan Metode Ekstraksi Kolom.* Semarang: Universitas Diponegoro.

APPENDIKS

A.1 Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi untuk absorbansi maksimal larutan standar diperlukan kurva kalibrasi. Untuk membuat kurva kalibrasi, diperlukan data absorbansi maksimum untuk menentukan panjang gelombang. Didapatkan data panjang gelombang:

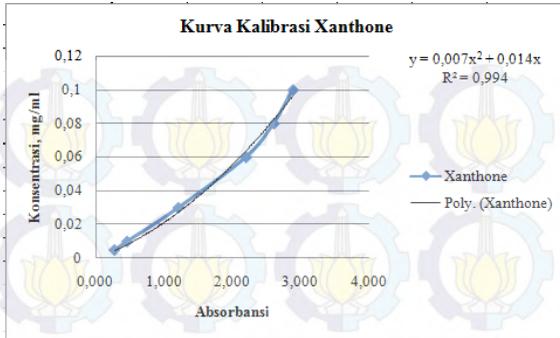
1. Xanthone = 322 nm
2. Kumarin = 308 nm

Melakukan run larutan standar pada spektrofotometer UV-VIS menggunakan panjang gelombang yang telah ditetapkan pada beberapa range konsentrasi. Didapatkan data absorbansi berikut:

Tabel A.1. Tabel Kalibrasi Xanthone

	Konsentrasi (mg/ml)					
	0.1	0.08	0.06	0.03	0.01	0.005
Absorbansi	2.89	2.614	2.203	1.211	0.461	0.277
	2.892	2.61	2.204	1.212	0.461	0.278
	2.893	2.612	2.207	1.212	0.461	0.277
	2.892	2.608	2.204	1.213	0.461	0.277
Rata-rata	2.892	2.611	2.205	1.212	0.461	0.277

Data ini kemudian dibuat grafik:



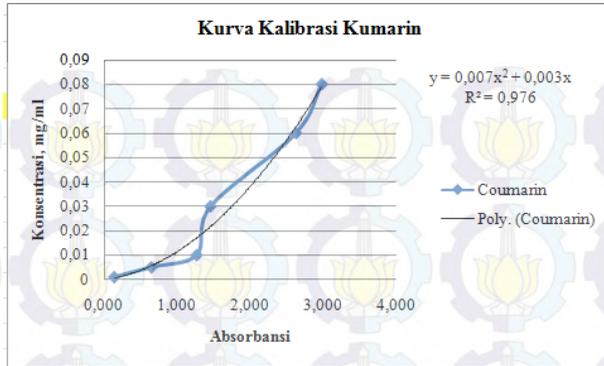
Gambar A.1. Kurva kalibrasi larutan standar xanthone

Hal yang sama dilakukan untuk larutan standar kumarin:

Tabel A.2. Tabel Kalibrasi Kumarin

	Konsentrasi (mg/ml)					
	0.08	0.06	0.03	0.01	0.005	0.001
Absorbansi	2.979	2.626	1.455	1.265	0.645	0.139
	2.981	2.625	1.455	1.265	0.645	0.139
	2.978	2.625	1.455	1.265	0.646	0.139
	2.98	2.626	1.455	1.266	0.647	0.138
Rata-rata	2.980	2.626	1.455	1.265	0.646	0.139

Data ini kemudian dibuat grafik:



Gambar A.2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kumarin

Diambil contoh untuk fraksi 1 n-hexane rasio perbandingan silica gel:n-hexane:PLF 6:10:1 Di-run menggunakan spektrofotometer UV-VIS dan didapatkan data absorbansi sebagai berikut:

Tabel A.3. Data Absorbansi Sampel

Sampel	λ	
	332 nm	308 nm
	0,614	0,219
	0,653	0,201
	0,683	0,191
	0,349	0,164
Rata-rata	0,574	0,193

Run PLF sebagai fresh feed yang masuk ke stirred-batch pada dua panjang gelombang:

Tabel A.4. Data Absorbansi PLF

PLF	λ	
	332 nm	308 nm
	2,471	2,787
	2,468	2,783
	2,478	2,781
	2,486	2,789
Rata-rata	2,475	2,785

Diambil contoh fraksi 1 n-hexane rasio perbandingan silica gel:n-hexane:PLF 6:10:1 yang di-run di panjang gelombang 332 nm

$A_{avrg} = 0,574$ (nilai ini dimasukkan ke persamaan regresi yang didapat di kurva kalibrasi)

$y = 0,0064 x^2 + 0,0149x$ (di mana y sebagai konsentrasi, dan x sebagai absorbansi)

$C1 = 0,0107 \text{ mg/mg}$ (konsentrasi di kuvet)

Mencari Konsentrasi Sampel Pada Saat Pengenceran

Massa sampel fraksi 1 variabel 6:10:1 yang diencerkan = 0,130 g

Massa jenis sampel = 0,75 g/ml

Volume sampel fraksi 1 variabel 6:10:1 yang diencerkan ($V2$) =

$$\frac{\text{massa sampel fraksi 1}}{\rho \text{ sampel}} = \frac{0,130}{0,75} = 0,173 \text{ ml}$$

Volume pengencer sampel = 250 ml

Volume total pengenceran ($V1$) = 250,173 ml

$$C2 = \frac{C1 \times V1}{V2} = \frac{0,0107 \times 250,173}{0,173} = 15,4353 \text{ mg/ml}$$

Menghitung Kadar Xanthone Pada Fraksi Produk (Fraksi N-Hexane Murni)

Fraksi produk didapat = 0,6482 gram

Volume produk didapat = 0,8643 ml

Xanthone dalam produk,

$$\text{Konsentrasi sampel } (C2) \times \text{Volume produk didapat} \\ 15,4353 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 0,8643 \text{ ml} = 13,3402 \text{ mg} = 0,0133 \text{ gr}$$

Untuk kadar xanthone dalam fraksi produk,

$$= \frac{\text{massa xanthone dalam fraksi produk}}{\text{massa fraksi produk}} \times 100\% = \frac{0,0133}{0,6482} \times 10 = 2,0580\%$$

Menghitung Recovery

Sebelumnya dilakukan perhitungan yang sama untuk PLF, dengan massa dan volume:

Massa PLF masuk *stirred-batch* = 3 gram

Volume PLF *stirred-batch* = 4 ml

Didapatkan kadar xanthone dalam PLF (setelah melewati perhitungan sama) = 9,347 %

Maka, untuk menghitung % *recovery*,

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{massa produk} \times \text{kadar xanthone di produk}}{\text{massa PLF} \times \text{kadar xanthone di PLF}} \times 100\% \\ &= \frac{0,6482 \times 2,0580 \%}{3 \times 9,347 \%} \times 100\% \\ &= 4,7571 \% \end{aligned}$$

Menghitung Kadar Xanthone Dalam PLF

PLF yang masuk dalam *stirred-batch* = 3 gram

Jumlah xanthone dalam fraksi produk = 0,0133 gram

Maka, kadar xanthone,

$$\begin{aligned} &= \frac{\text{xanthone dalam produk}}{\text{massa produk}} \times 100\% = \frac{0,0133}{3} \times 100\% \\ &= 0,4447 \% \end{aligned}$$

Menghitung Kadar Xanthone Dalam Crude Oil

Massa crude PLF didapat = 26,74 gram

Massa xanthone dalam PLF = 0,4447 % × 26,74 gram = 0,1189 gram

Massa *crude oil* yang digunakan = 70 gram

Maka, kadar xanthone,

$$= \frac{\text{xanthone dalam PLF}}{\text{massa crude oil}} \times 100\% = \frac{0,1189}{70} \times 100 = 0,170\%$$

Menghitung Yield Xanthone Dalam PLF

Massa xanthone dalam produk = 0,0133 gram

Massa PLF = 3 gram

Didapatkan *Yield*,

$$= \frac{\text{massa xanthone dalam produk}}{\text{massa PLF}} = \frac{0,0133}{3} = 0,0044$$

Menghitung *Yield* Xanthone Dalam *Crude Oil*

Massa xanthone dalam produk = 0,0133 gram

Massa PLF = 70 gram

Didapatkan *Yield*,

$$= \frac{\text{massa xanthone dalam produk}}{\text{massa PLF}} = \frac{0,0133}{70} = 0,0002$$

Perhitungan sama untuk variabel lainnya.

Tabel A-1 Absorbansi rata-rata dan konsentrasi xanthone pada sampel panjang gelombang 332 nm

Variabel	Fraksi	Absorbansi Rata-rata	Konsentrasi
6;10;1	F1	0,5748	0,0107
	F2	0,6460	0,0123
	F3	2,8910	0,0966
6;15;1	F1	0,3810	0,0066
	F2	1,0570	0,0229
	F3	2,9190	0,0980
6;20;1	F1	1,3548	0,0319
	F2	1,9228	0,0523

	F3	2,7918	0,0915
6;25;1	F1	0,9648	0,0203
	F2	1,3300	0,0311
	F3	2,6875	0,0863
8;10;1	F1	0,6553	0,0125
	F2	0,6853	0,0132
	F3	2,8973	0,0969
8;15;1	F1	1,0660	0,0232
	F2	0,4585	0,0082
	F3	2,9195	0,0981
8;20;1	F1	0,6310	0,0120
	F2	1,5798	0,0395
	F3	2,5688	0,0805
8;25;1	F1	0,1224	0,0019
	F2	0,1968	0,0032
	F3	2,8160	0,0927

Tabel A-2 Absorbansi rata-rata dan konsentrasi xanthone pada sampel panjang gelombang 308 nm

Variabel	Fraksi	Absorbansi Rata-rata	Konsentrasi
6;10;1	F1	0,1938	0,0010
	F2	0,5923	0,0050
	F3	2,8828	0,0744
6;15;1	F1	0,2913	0,0018
	F2	2,6075	0,0618
	F3	2,9060	0,0755
6;20;1	F1	2,0005	0,0382
	F2	2,1690	0,0442
	F3	2,8155	0,0712
6;25;1	F1	0,7050	0,0065
	F2	2,4335	0,0545
	F3	2,7930	0,0702
8;10;1	F1	0,2745	0,0016
	F2	0,8378	0,0086
	F3	2,8678	0,0737
8;15;1	F1	0,9690	0,0109
	F2	0,9958	0,0114
	F3	2,9103	0,0757
8;20;1	F1	1,6270	0,0265
	F2	2,4761	0,0563

	F3	2,7708	0,0692
8;25;1	F1	0,9515	0,0106
	F2	0,8233	0,0084
	F3	2,8115	0,0710

Tabel A-3 Kadar xanthone pada sampel

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	2,0580	0,6039	14,2505
6;15;1	0,2541	1,2920	14,6173
6;20;1	2,1331	4,5009	16,0141
6;25;1	3,0524	3,1590	16,5231
8;10;1	0,7275	1,5940	12,9872
8;15;1	1,2060	0,4042	14,4466
8;20;1	0,4612	1,9809	13,0251
8;25;1	0,2418	0,6496	13,7480

Tabel A-4 Kadar kumarin pada sampel

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,2006	0,2444	13,7430
6;15;1	0,0685	3,4890	12,9694
6;20;1	1,2697	3,8043	15,2557
6;25;1	0,9799	5,5288	13,7054
8;10;1	0,0955	1,2965	12,1146
8;15;1	0,5685	0,5645	13,3802
8;20;1	1,0214	2,8201	11,6515
8;25;1	1,3342	1,7085	12,0609

Tabel A-5 Kadar xanthone pada PLF

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,4447	0,1004	7,2358
6;15;1	0,0613	0,1748	2,2153
6;20;1	0,6184	1,0328	4,2125
6;25;1	0,5053	1,1690	4,5806
8;10;1	0,1650	0,1202	2,5958
8;15;1	0,2546	0,0663	2,1483
8;20;1	0,1090	0,1272	6,5269
8;25;1	0,0467	0,0888	3,5302

Tabel A-6 Kadar kumarin pada PLF

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,0433	0,0406	5,5749
6;15;1	0,0165	0,4722	1,7065
6;20;1	0,3681	0,8730	3,2799
6;25;1	0,1622	2,0460	3,7263
8;10;1	0,0217	0,0978	1,9741
8;15;1	0,1200	0,0926	1,6590
8;20;1	0,2413	0,1811	5,6064
8;25;1	0,2579	0,2335	2,7051

Tabel A-7 Kadar xanthone pada Crude Oil

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,1699	0,0383	2,7641
6;15;1	0,0234	0,0668	0,8462
6;20;1	0,2362	0,3945	1,6092

6;25;1	0,1930	0,4466	1,7498
8;10;1	0,0630	0,0459	0,9916
8;15;1	0,0973	0,0253	0,8207
8;20;1	0,0416	0,0486	2,4933
8;25;1	0,0178	0,0339	1,3486

Tabel A-8 Kadar kumarin pada Crude Oil

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,0166	0,0155	2,1296
6;15;1	0,0063	0,1804	0,6519
6;20;1	0,1406	0,3335	1,2529
6;25;1	0,0620	0,7816	1,4234
8;10;1	0,0083	0,0373	0,7541
8;15;1	0,0458	0,0354	0,6337
8;20;1	0,0922	0,0692	2,1416
8;25;1	0,0985	0,0892	1,0333

Tabel A-9 % Recovery xanthone pada sampel

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	4,7571	1,0740	94,1690
6;15;1	0,6561	1,8705	97,4734
6;20;1	6,6161	11,0489	82,3350
6;25;1	5,4054	12,5061	82,0884
8;10;1	1,7651	1,2857	96,9492
8;15;1	2,7235	0,7095	96,5670

8;20;1	1,1657	1,3605	97,4737
8;25;1	0,4999	0,9498	98,5503

Tabel A-10 % Recovery kumarin pada sampel

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,5056	0,4738	99,0205
6;15;1	0,1928	5,5078	94,2994
6;20;1	4,2941	10,1827	85,5231
6;25;1	1,8921	23,8658	74,2421
8;10;1	0,2528	1,1403	98,6070
8;15;1	1,3998	1,0803	97,5199
8;20;1	2,8148	2,1119	95,0733
8;25;1	3,0079	2,7237	94,2685

Tabel A-11 Yield xanthone pada PLF

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,0044	0,0010	0,0880
6;15;1	0,0006	0,0017	0,0911
6;20;1	0,0062	0,0103	0,0770
6;25;1	0,0051	0,0117	0,0767
8;10;1	0,0016	0,0012	0,0906
8;15;1	0,0025	0,0007	0,0903
8;20;1	0,0011	0,0013	0,0911
8;25;1	0,0005	0,0009	0,0921

Tabel A-12 Yield kumarin pada PLF

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,0004	0,0004	0,0849
6;15;1	0,0002	0,0047	0,0808
6;20;1	0,0037	0,0087	0,0733
6;25;1	0,0016	0,0205	0,0636
8;10;1	0,0002	0,0010	0,0845
8;15;1	0,0012	0,0009	0,0836
8;20;1	0,0024	0,0018	0,0815
8;25;1	0,0026	0,0023	0,0808

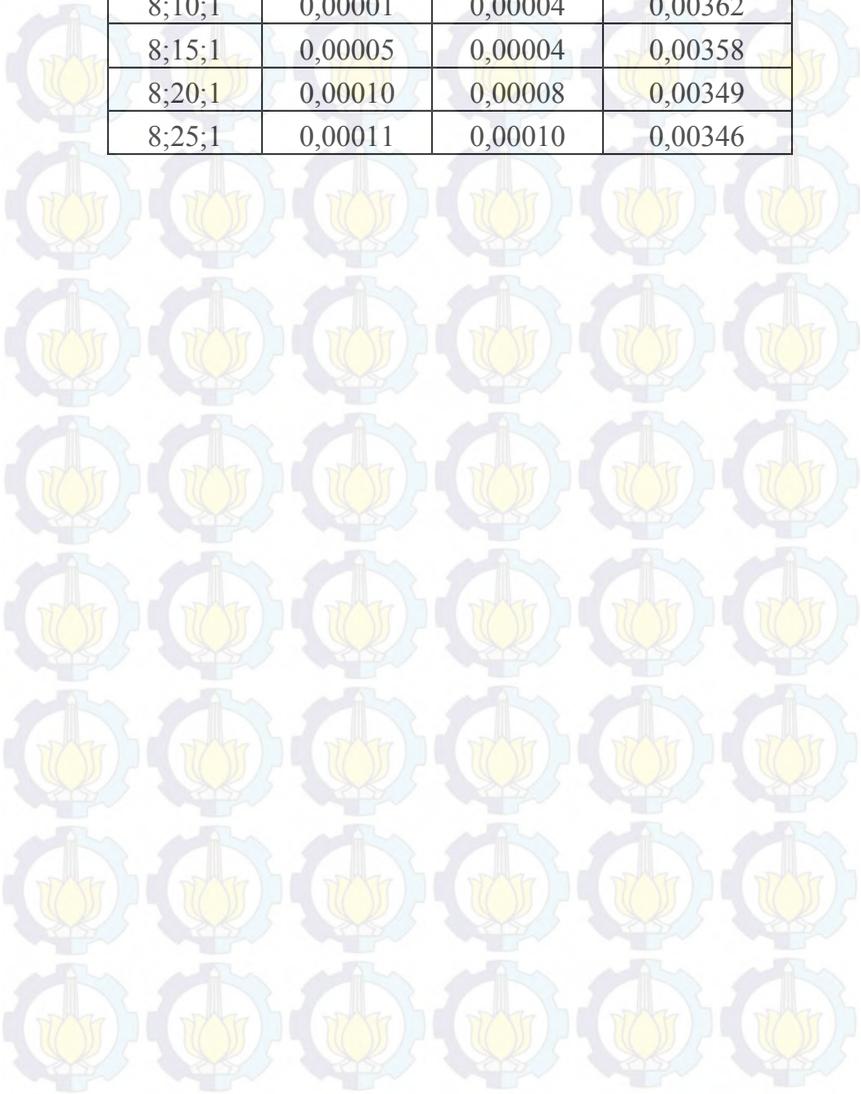
Tabel A-13 Yield xanthone pada Crude Oil

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,00019	0,00004	0,00377
6;15;1	0,00003	0,00007	0,00390
6;20;1	0,00027	0,00044	0,00330
6;25;1	0,00022	0,00050	0,00329
8;10;1	0,00007	0,00005	0,00388
8;15;1	0,00011	0,00003	0,00387
8;20;1	0,00005	0,00005	0,00390
8;25;1	0,00002	0,00004	0,00395

Tabel A-14 Yield kumarin pada Crude Oil

Variabel	FRAKSI 1	FRAKSI 2	FRAKSI 3
6;10;1	0,00002	0,00002	0,00364
6;15;1	0,00001	0,00020	0,00346
6;20;1	0,00016	0,00037	0,00314

6;25;1	0,00007	0,00088	0,00273
8;10;1	0,00001	0,00004	0,00362
8;15;1	0,00005	0,00004	0,00358
8;20;1	0,00010	0,00008	0,00349
8;25;1	0,00011	0,00010	0,00346



RIWAYAT HIDUP PENULIS I



Penulis yang bernama lengkap **Irma Ratnasari** adalah anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Surahmat dan Ibu Istikomah. Penulis yang dilahirkan di kota Kediri pada tanggal 27 Maret 1992 sekarang bertempat tinggal di Desa Seketi, Kecamatan Ngadiluwih, Kabupaten Kediri.

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SDN Jambean 1 (1999-2005), yang dilanjutkan pada jenjang pertama di SMPN 1 Ngadiluwih (2005-2008), dan pada tingkatan atas di SMAN 7 Kediri (2008-2011). Dari tahun 2011 sampai skripsi ini selesai ditulis, penulis masih tercatat sebagai mahasiswa program S1 Teknik Kimia FTI-ITS.

Penulis pernah aktif dalam beberapa organisasi Pers, salah satunya adalah menjadi anggota Pers Teknik Kimia FTI-ITS Emissivity pada tahun 2012-2013 dan kemudian menjadi sekretaris umum sekaligus bendahara di Emissivity pada tahun 2013-2014.

Untuk berhubungan dengan penulis, dapat menghubungi via email di irmaratna92@gmail.com

RIWAYAT HIDUP PENULIS II



Fitra Diani Trisnawati, anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Mochammad Su'ud dan Ibu Siti Fatimah lahir di Sidoarjo pada tanggal 16 Agustus 1993.

Penulis mulai mengenyam pendidikan di SDN Kalisari II Surabaya (1999-2000), SMPN 19 Surabaya (2005-2008), SMAN 4 Surabaya (2008-2011) dan S1 Teknik Kimia FTI-ITS (2011-2016).

Penulis pernah aktif organisasi di Himpunan Mahasiswa Teknik Kimia (HIMATEKK FTI-ITS) sebagai staff Entrepreneurship Development Department (2012-2013) dan sebagai Section Head of Fund Rising Entrepreneurship Development Department (2013-2014). Penulis juga pernah aktif sebagai staff Fund Rising dalam Unit Kegiatan Mahasiswa ITS Workshop Entrepreneurship and Technology (WE&T).

Untuk berhubungan dengan penulis, dapat menghubungi via email di fitradiani@gmail.com.