



## **SKRIPSI**

### **ISOLASI SENYAWA 3 $\beta$ -ASETOKSI-LUP-20(29)-EN-2 $\alpha$ - OL DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN KEPULAUAN ARU (*Sonneratia ovata* Backer)**

**FATMAWATI INNEKE PUTRI  
NRP. 1412 100 089**

Dosen Pembimbing I :  
Prof. Dr. Taslim Ersam

Dosen Pembimbing II :  
Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2016**



## **SCRIPT**

### **ISOLATION COMPOUND $3\beta$ -ACETOXY-LUP-20(29)- EN-2 $\alpha$ -OL AND ANTIOXIDANT ESSAY FROM ARU ISLANDS (*Sonneratia ovata* Backer)**

**FATMAWATI INNEKE PUTRI  
NRP. 1412 100 089**

Advisor lecturer I :  
Prof. Dr. Taslim Ersam

Advisor lecturer II :  
Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCES  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2016**

**ISOLASI SENYAWA 3 $\beta$ -ASETOKSI-LUP-20(29)-EN-2 $\alpha$ -  
OL DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN  
KEPULAUAN ARU (*Sonneratia ovata* Backer)**

**SKRIPSI**

Disusun Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Program Studi S-1 Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya

Oleh:

**FATMAWATI INNEKE PUTRI  
NRP 1412 100 089**

Surabaya, 22 Juli 2016

JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2016

LEMBAR PENGESAHAN

ISOLASI SENYAWA  $3\beta$ -ASETOKSI-LUP-20(29)-EN-2 $\alpha$ -  
OL DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN  
KEPULAUAN ARU (*Sonneratia ovata* Backer)

TUGAS AKHIR

Disusun Oleh :

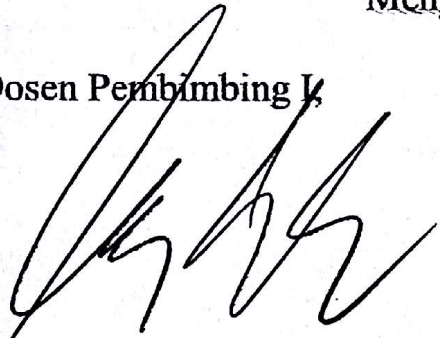
**FATMAWATI INNEKE PUTRI**  
**NRP. 1412 100 089**

Surabaya, 22 Juli 2016

Menyetujui,

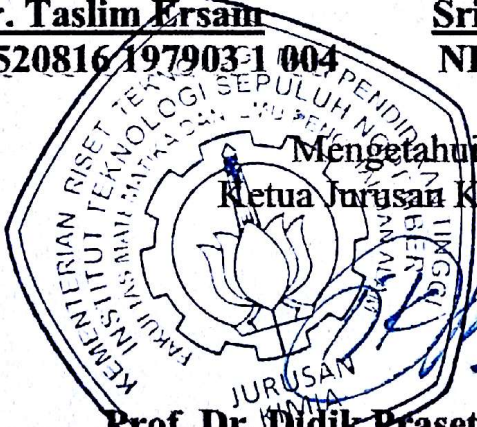
Dosen Pembimbing I,

Dosen Pembimbing II,

  
**Prof. Dr. Taslim Ersan**  
**NIP. 19520816 197903 1 004**

  
**Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.**  
**NIP. 19801130 200212 2 001**

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia,

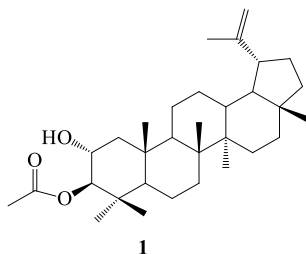
  
**Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc.**  
**NIP. 19710616 199703 1 002**

# ISOLASI SENYAWA 3 $\beta$ -ASETOKSI-LUP-20(29)-EN-2 $\alpha$ -OL DAN UJI ANTIOKSIDAN DARI TUMBUHAN KEPULAUAN ARU (*Sonneratia ovata* Backer)

Nama Mahasiswa : Fatmawati Inneke Putri  
NRP : 1412 100 089  
Jurusan : Kimia ITS  
Pembimbing I : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.  
Pembimbing II : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

## Abstrak

*Sonneratia ovata* Backer merupakan salah satu tanaman yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku. Senyawa 3 $\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol (**1**) berupa serbuk putih dengan titik leleh 200-201 $^{\circ}$ C berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer. Senyawa tersebut difraksinasi menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Senyawa murni diidentifikasi menggunakan spektroskopi IR,  $^1\text{H-NMR}$ , dan  $^{13}\text{C-NMR}$ . Uji bioaktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Ekstrak metanol menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai  $\text{IC}_{50} = 4,73 \mu\text{g/mL}$  untuk DPPH radikal dan fraksi dari senyawa (**1**) menunjukkan prosentase penghambatan sebesar  $20,91 \pm 0,006 \%$ .



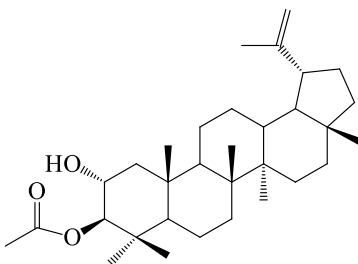
**Kata kunci :** *Sonneratia ovata* Backer, Antioksidan, Isolasi, Bahan alam, DPPH radikal

# ISOLATION COMPOUND 3 $\beta$ -ACETOXY-LUP-20(29)-EN-2 $\alpha$ -OL AND ANTIOXIDANT ESSAY FROM ARU ISLANDS (*Sonneratia ovata* Backer)

Name : Fatmawati Inneke Putri  
NRP : 1412 100 089  
Department : Kimia ITS  
Advisor Lecture I : Prof. Dr. Taslim Ersam, MS.  
Advisor Lecture II : Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D.

## Abstrak

*Sonneratia ovata* Backer, is a plant that grows in Dobo City, Aru Islands, Maluku. Compound 3 $\beta$ -acetoxy-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol (**1**) formed white crystal powder with melting point 200-201 $^{\circ}$ C was isolated from methanol extract of bark *Sonneratia ovata* Backer. Then it fractionated with silica gel column chromatography. A compound which have been obtained, then identified using IR,  $^1\text{H-NMR}$ , and  $^{13}\text{C-NMR}$ . Anti-oxidant bioactivity was tested using DPPH methods. Methanol extract showed antioxidant activity with IC<sub>50</sub> value of 4,73 on DPPH assay and fraction from compound (**1**) showed percent inhibition of 20,91  $\pm$  0,006 %.



**1**

**Keyword :** *Sonneratia ovata* Backer, Antioxidant, Isolation, Natural product, DPPH assay

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul **“Isolasi Senyawa  $3\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol dan Uji Antioksidan dari Tumbuhan Kepulauan Aru (*Sonneratia ovata* Backer)”**. Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan naskah skripsi ini yaitu:

1. Prof. Dr. Taslim Ersam, selaku dosen pembimbing I dan Kepala Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis yang telah memberikan arahan, masukan dan nasihat dalam penyusunan naskah ini serta memberikan izin menggunakan fasilitas di laboratorium.
2. Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D, selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan arahan, masukan dan nasihat dalam penyusunan naskah ini.
3. Prof. Dr. Didik Prasetyoko, M.Sc. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA ITS
4. Teman-teman Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis yang memberikan masukan yang berguna.
5. Fatati Nurmalasari sebagai partner satu tim tugas akhir saya, yang telah membantu dan bekerjasama dalam mengerjakan tugas akhir.
6. Zamzam Zukhrufi yang telah memberikan motivasi dan bantuannya dalam menyelesaikan naskah ini.
7. Semua pihak yang mendukung terselesaikannya naskah ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan naskah skripsi ini tidak lepas dari kekurangan. Oleh karena itu, penulis terbuka terhadap kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, 22 Juli 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL .....	xiv
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	2
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Tujuan .....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Spesies <i>Sonneratia ovata</i> Backer.....	5
2.2 Tinjauan Kandungan Senyawa dan Bioktivitas dari <i>Sonneratia Ovata Backer</i> .....	7
2.3 Tinjauan Senyawa Terpenoid.....	10
2.4 Tinjauan Antioksidan dan Uji DPPH (1,1-difenil-2- pikrihidrazil).....	12
2.5 Metode Pemisahan dan Pemurnian Senyawa.....	14
2.5.1 Ekstraksi .....	14
2.5.2 Kromatografi .....	15
2.5.3 Rekristalisasi .....	16
2.6 Identifikasi Senyawa .....	17
2.6.1 Spektrofotometri Inframerah .....	17
2.6.2 Spektrosfotometri <sup>1</sup> H dan <sup>13</sup> C <i>Nuclear Magnetic                 Resonance</i> (NMR).....	18
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	23
3.1 Alat dan Bahan.....	23
3.1.1 Alat.....	23
3.1.2 Bahan.....	23
3.2 Prosedur Penelitian .....	23
3.2.1 Uji Pendahuluan .....	23
3.2.2 Isolasi Senyawa dari Kulit Batang <i>Sonneratia ovata                 Backer</i> .....	24
3.2.2.1 Ekstraksi Kulit Batang <i>Sonneratia ovata Backer</i> ..	24



3.2.2.2 Pemisahan fraksi Metanol.....	24
3.2.2.3 Pemisahan Gabungan Sub fraksi F2-F4.....	25
3.2.2.4 Pemisahan Sub fraksi G5.....	25
3.2.2.5 Pemisahan Gabungan Sub fraksi H2-H3.....	25
3.2.2.6 Pemisahan Gabungan Sub fraksi I6-I7.....	26
3.2.2.7 Pemisahan Sub fraksi I5.....	26
3.2.2.8 Pemisahan Gabungan Sub fraksi I4, J2 dan K2.....	26
3.2.3 Identifikasi Struktur.....	27
3.2.3.1 Uji Titik Leleh.....	27
3.2.3.2 Uji Spektrofotometer FT-IR.....	27
3.2.3.3 Uji Spektrofotometer NMR.....	27
3.2.4 Uji Antioksidan.....	28
3.2.4.1 Metode DPPH.....	28
BAB IV.....	29
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Uji Pendahuluan.....	29
4.2 Isolasi Senyawa dari Kulit Batang <i>Sonneratia ovata</i> Backer.....	32
4.2.1 Ekstraksi Kulit Batang <i>Sonneratia ovata</i> Backer.....	32
4.2.2 Pemisahan fraksi Metanol.....	33
4.2.3 Pemisahan Gabungan Sub fraksi F2-F4.....	35
4.2.4 Pemisahan Sub fraksi G5.....	36
4.2.5 Pemisahan Sub fraksi H2-H3.....	38
4.2.6 Pemisahan Sub Fraksi I6-I7.....	40
4.2.7 Pemisahan Sub fraksi I5.....	43
4.2.8 Pemisahan Sub Fraksi I4, J2, dan K2.....	45
4.3 Identifikasi Struktur Hasil Isolasi Senyawa (1).....	48
4.4 Aktivitas Antioksidan Ekstrak <i>Sonneratia ovata</i> Backer dan fraksi L.....	54
BAB V.....	58
KESIMPULAN.....	59
5.1 Kesimpulan.....	59
5.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	65

SKEMA KERJA.....	65
BIODATA PENULIS.....	71

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Jenis-jenis bunga pada Genus <i>Sonneratia</i> : (a) <i>Sonneratia alba</i> . (b) <i>S. apetala</i> . (c) <i>S. caseolaris</i> . (d) <i>S. × gulngai</i> . (e) <i>S.griffithii</i> , spesimen dari PSU-Herbarium, Thailand (f) <i>S. × hainanensis</i> . (g) <i>S. ovata</i> . (h) <i>S. × urama</i> (Mao dan Foong, 2013).....	5
Gambar 2.2	Bagian-bagian pada tanaman <i>Sonneratia ovata</i> Backer (Goutham-Bharathi dkk., 2012).....	7
Gambar 2.3	Senyawa isoprene dan Unit isoprene (Baser dan Buchbauer, 2010).....	11
Gambar 2.4	Jalur Mevalonat untuk Pembentukan IPP (Baser dan Buchbauer, 2010).....	11
Gambar 2.5	Mekanisme Biosentesa Senyawa Terpenoid (Baser dan Buchbauer, 2010).....	12
Gambar 2.6	Mekanisme reaksi DPPH dan Antioksidan (A-H) (Molyneux, 2004).....	13
Gambar 2.7	Data Serapan pada Spektrum Inframerah (Rouessac dan Rouessac, 1994).....	20
Gambar 2.8	Pergeseran Kimia ppm <sup>13</sup> C NMR (Rouessac dan Rouessac, 1994).....	21
Gambar 2.9	Pergeseran Kimia ppm <sup>1</sup> H NMR (Rouessac dan Rouessac, 1994).....	22
Gambar 4.1	Kromatogram hasil uji pendahuluan menggunakan eluen 100% metanol.....	30
Gambar 4.2	Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak kulit batang <i>Sonneratia ovata</i> Backer dengan 4 pelarut (metanol, etil asetat, metilen klorida dan n-heksana), dengan konsentrasi 319,46 µg/mL (Asam galat sebagai kontrol positif).....	31

Gambar 4.3	Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak Metanol kulit batang <i>Sonneratia ovata</i> Backer dengan memiliki nilai $IC_{50}$ dari ekstrak metanol sebesar 4,73 $\mu\text{g/mL}$ .....	31
Gambar 4.4	Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak Etil asetat kulit batang <i>Sonneratia ovata</i> Backer dengan memiliki nilai $IC_{50}$ dari ekstrak metanol sebesar 31,89 $\mu\text{g/mL}$ .....	32
Gambar 4.5	Kromatogram hasil maserasi ekstrak metanol dengan eluen 100% metanol.....	33
Gambar 4.6	Monitoring KLT hasil KCV dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:4) v/v.....	34
Gambar 4.7	Kromatogram fraksi gabungan hasil KCV I (fraksi F) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:4) v/v.....	34
Gambar 4.8	Monitoring KLT hasil KCV ke-2 dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:4) v/v.....	35
Gambar 4.9	Kromatogram fraksi gabungan hasil KCV ke-2 (fraksi G) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:4) v/v.....	36
Gambar 4.10	Monitoring KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KCV ke-3.....	37
Gambar 4.11	Monitoring KLT hasil KCV ke-3 dengan eluen etil asetat-n-heksana (1:4) v/v.....	37
Gambar 4.12	Kromatogram fraksi gabungan hasil KCV ke-3 (fraksi H) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:4) v/v.....	38
Gambar 4.13	Monitoring KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KKG (eluen etil asetat : n-heksana (1:4)).....	39
Gambar 4.14	Monitoring KLT hasil KKG dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	39
Gambar 4.15	Kromatogram fraksi gabungan hasil KKG (fraksi I) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	40

Gambar 4.16	Kromatogram fraksi gabungan I6 dan I7 dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	41
Gambar 4.17	Monitoring KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KKG ke-2 (eluen etil asetat : n-heksana (1:19) v/v).....	41
Gambar 4.18	Monitoring KLT hasil KKG ke-2 dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	42
Gambar 4.19	Kromatogram fraksi gabungan hasil KKG ke-2 (fraksi J) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	42
Gambar 4.20	Kromatogram fraksi I5 dan J2 dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:3) v/v.....	43
Gambar 4.21	Monitoring KLT hasil KCV ke-4 dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:3) v/v.....	44
Gambar 4.22	Kromatogram fraksi gabungan hasil KCV ke-4 (fraksi K) dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:3) v/v.....	44
Gambar 4.23	Kromatogram fraksi J2, K2 dan I4 dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	44
Gambar 4.24	Monitoring KLT hasil KKG ke-3 dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:3) v/v.....	45
Gambar 4.25	Kromatogram fraksi gabungan hasil KKG ke-3 (fraksi L) dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3) v/v.....	46
Gambar 4.26	Kromatogram hasil uji 3 eluen senyawa <b>(1)</b> dengan eluen a. etil asetat : n-heksana (2:3) v/v, b. etil asetat : n-heksana (1:3) v/v, c. etil asetat : n-heksana (1:9) v/v.....	47
Gambar 4.27	Kromatogram hasil uji 2 dimensi senyawa <b>(1)</b> dengan eluen etil asetat : n-heksana (1:3 v/v) dan etil asetat : diklorometana (7 : 93 v/v).....	47
Gambar 4.28	Spektrum Infrared (IR) Senyawa <b>(1)</b> dari pellet KBr.....	49
Gambar 4.29	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR Senyawa <b>(1)</b> .....	54
Gambar 4.30	Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Senyawa <b>(1)</b> .....	55

- Gambar 4.31 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Asam galat (kontrol positif), Ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dan fraksi L dengan konsentrasi 319,46  $\mu\text{g/mL}$ .....57
- Gambar 4.32 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari asam galat (Kontrol +) dengan memiliki nilai IC50 dari ekstrak metanol sebesar 2,01  $\mu\text{g/mL}$ .....57

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa ( <b>1</b> ) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	51
Tabel 4.2	Data Perbandingan $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ Senyawa ( <b>1</b> ) dengan $3\beta\text{-acetoxy-lup-20(29)-en-2}\alpha\text{-ol}$ (Rungsimakan dan Rowan, 2014) (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	53

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam dan terdiri dari banyak pulau dari sabang sampai merauke. Pada setiap pulau terdapat kekayaan hayati yang belum banyak diketahui manfaat dan fungsinya. Eksplorasi kekayaan hayati di Indonesia bagian Timur belum dilakukan secara maksimal. Hal itu disebabkan karena kurangnya sumber daya manusia. Beberapa tumbuhan yang ada di Provinsi Maluku yaitu kakurang hijau, kakurang putih, col pante, genus *Sonneratia*, gaya baru, dan lain-lain. Salah satu tumbuhan yang ada di Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku yang memiliki banyak manfaat yaitu genus *Sonneratia*. Genus *Sonneratia* ini memiliki banyak spesies, seperti *Sonneratia ovata* Backer, *Sonneratia caseolaris*, dan sebagainya.

Salah satu spesies dari *Sonneratia* yang sudah banyak diteliti manfaat dan komponen senyawanya yaitu *Sonneratia caseolaris*. *Sonneratia caseolaris*, biasa dikenal oleh orang Indonesia dengan Pedada. *Sonneratia caseolaris* merupakan pohon kecil yang memiliki daun berbentuk elip, lebar, serta berbunga warna merah. Di negara-negara lain sudah banyak penelitian yang menjelaskan tentang manfaat dari *Sonneratia caseoralis*. Menurut Wu dkk. (2009), senyawa yang diperoleh dari buah *Sonneratia caseoralis* dan *Sonneratia ovata* yang diteliti bisa menjadi dasar kemotaksonomi spesies dari genus *Sonneratia*. Senyawa yang berhasil diisolasi dari *Sonneratia caseoralis* yaitu (-)-(R)-nyasol (**2**), (-)-(R)-4'-O-metilnyasol (**3**), 3,8-dihidroksi-6H-benzo[b,d]piran-6-on (**4**), 3-hidroksi-6H-benzo[b,d]piran-6-on (**5**), asam oleanolat (**6**), asam maslinat (**7**), luteolin (**8**), luteolin 7-O- $\beta$ -glukosida (**9**), benzil-O- $\beta$ -glukopiranosida (**10**). Senyawa (**2**), (**3**), dan (**7**) yang diisolasi memiliki aktifitas sitotoksik.



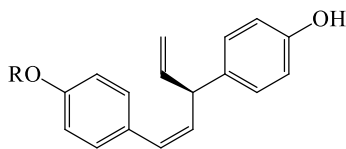
Jariyah dkk. (2014) telah melakukan *in vivo* pada tikus yang diinduksi dengan *alloxan* dan hasilnya menunjukkan bahwa buah Pedada (*Sonneratia caseolaris*) dapat menurunkan gula darah pada tikus. Sehingga dapat disimpulkan bahwa buah Pedada dapat digunakan untuk mengobati penyakit diabetes pada konsentrasi tertentu. Tiwari dkk. (2010) telah mendapatkan 3 senyawa bioaktif, yaitu  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranosida (**11**), asam oleanolat (**12**), luteolin (**13**) yang berhasil isolasi ekstrak metanol buah *Sonneratia caseolaris* dan senyawa (**12**) yang memiliki aktifitas inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dan anti hiperglisemik.

Menurut Hou dkk. (2009), senyawa asam maslinat yang berasal dari buah *Sonneratia caseolaris* memiliki aktifitas inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidase dan Sadhu dkk. (2006) menjelaskan 2 senyawa flavon (luteolin (**14**) dan luteolin 7-O- $\beta$ -glukosida (**15**)) hasil isolasi dari daun *Sonneratia caseolaris* memiliki aktifitas antioksidan.

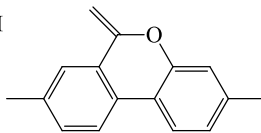
Spesies-spesies dalam satu genus memiliki afinitas kimia yang sama. Afinitas kimia ini adalah kemampuan untuk membentuk suatu senyawa kimia yang identik atau khas. Dengan banyaknya manfaat dan kandungan senyawa pada *Sonneratia caseolaris*, sehingga ada peluang bahwa *Sonneratia ovata* Backer juga memiliki kesamaan dalam hal kandungan senyawa dan aktivitasnya. Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa dari *Sonneratia ovata* Backer dan diuji aktivitas antioksidannya.

## 1.2 Permasalahan

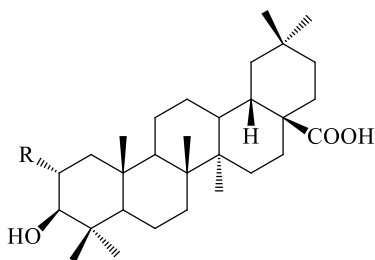
*Sonneratia caseolaris* telah banyak dilaporkan memiliki senyawa yang bersifat bioaktivitas, seperti antidiabetes dan antioksidan. Permasalahan pada penelitian ini adalah apakah pada kulit batang *Sonneratia ovata* Backer yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku terdapat senyawa metabolit sekunder dan diuji aktivitas antioksidan.



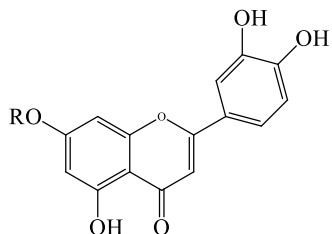
2 ; R = H  
3 ; R = Me



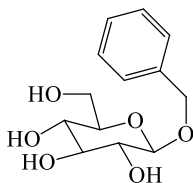
4 ; R = OH  
5 ; R = H



6 ; R = H  
7 ; R = OH



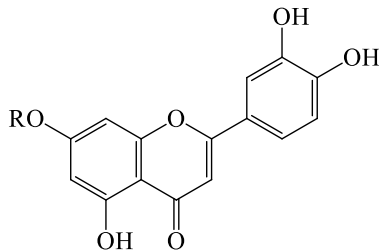
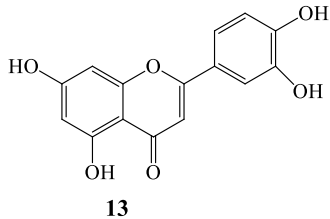
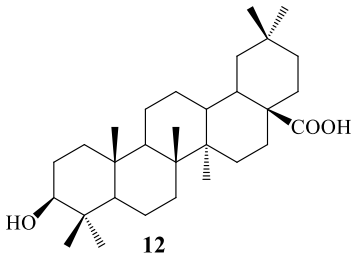
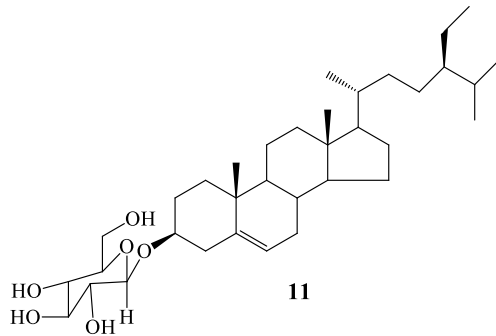
8 ; R = H  
9 ; R = Glc



10

### 1.3 Hipotesis

Senyawa-senyawa yang berasal dari spesies *Sonneratia caseolaris* telah banyak dilaporkan memiliki senyawa yang bersifat bioaktivitas, seperti antidiabetes dan antioksidan, sehingga ada peluang ditemukan senyawa metabolit sekunder yang bersifat antioksidan yang dapat diisolasi dari bagian kulit batang dari *Sonneratia ovata* Backer yang merupakan satu Genus tersebut.



14 ; R = H

15 ; R = beta-glukosa

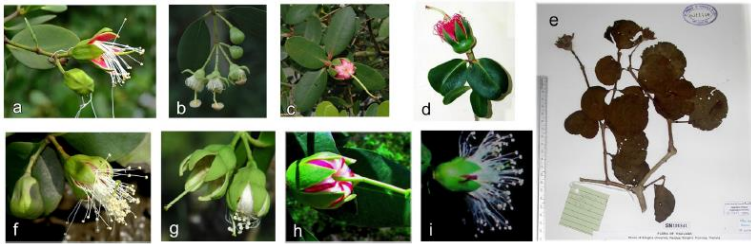
## 1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari kulit batang *Sonneratia ovata* Backer yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku dan diuji aktivitas antioksidan.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Spesies *Sonneratia ovata* Backer

Genus *Sonneratia* (*Sonneratiaceae*) tumbuh secara luas di hutan bakau dan hanya terdiri dari sembilan spesies di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia (Wang dan Chen, 2002 ; Qin dkk., 2007). Berikut jenis-jenis spesies dari Genus *Sonneratia* (Mao dan Foong, 2013) :



Gambar 2.1 Jenis-jenis bunga pada Genus *Sonneratia* : (a) *Sonneratia alba*. (b) *S. apetala*. (c) *S. caseolaris*. (d) *S. x gulngai*. (e) *S. griffithii*, spesimen dari PSU-Herbarium, Thailand (f) *S. x hainanensis*. (g) *S. ovata*. (h) *S. x urama* (Mao dan Foong, 2013)

*Sonneratia ovata* Backer berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku dan tanaman ini dikenal dengan nama Manggustang Pante. Sejak dulu, bagian buah, kulit kayu, dan daun beberapa tanaman *Sonneratia* telah digunakan sebagai obat untuk mengobati penyakit seperti asma, obat penurun panas, bisul, hepatitis, tumpukan, keseleo, dan perdarahan (Nguyen dkk., 2015).

**Klasifikasi *Sonneratia ovata* Backer** (Guebas F., 2015)

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Phylum</i>	: <i>Tracheophyta</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliopsida</i>
<i>Order</i>	: <i>Myrtales</i>
<i>Family</i>	: <i>Lythraceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Sonneratia</i>
<i>Species</i>	: <i>S. Ovata</i>

Pohon *Sonneratia ovata* Backer memiliki tinggi 7.2 m (Gambar 2.2a); dasar batang tidak ditopang dan kulit batang sedikit berbentuk serpihan (Gambar 2.2b), coklat pucat ke abu-abu; *pneumatophores* tipis, memiliki tinggi 37 cm (Gambar 2.2c). Daun berbetuk sederhana (bulat telur 5,3-9,0 cm × 4,1-8,6 cm), ujung daun tumpul, permukaan atas mengilap, permukaan bawah halus (Gambar 2.2d), tangkai daun berukuran 5,7-6,9 mm; berbentuk silinder, berwarna kemerahan (Gambar 2.2g). Tangkai bunga memiliki 1-3 kuncup (Gambar 2.2e), bunga yang masak akan membuka, berbentuk oval dan ditutupi dengan kutil kecil (Gambar 2.2f). Bunga biseksual, soliter atau terjadi dalam kelompok tiga di ujung batang. Kelopak bunga biasanya berjumlah 6, jarang berjumlah 5 (Gambar 2.2i), memiliki panjang 2,6-4,6 cm, puncak tumpul, permukaan bagian dalam sangat diwarnai dengan warna merah di bagian dasar (Gambar 2.2j); Benang sari putih dan banyak yang rontok dengan cepat dalam beberapa jam saat bunga mekar (Gambar 2.2h). Multilocular ovarium (Gambar 2.2l). Berry bulat, 4-6 cm dengan lebar 3,5-4,5 cm (Gambar 2.2k), biji banyak, bulat dan tidak teratur (Goutham-Bharathi dkk., 2012).

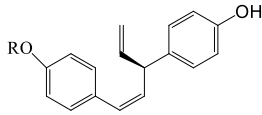


Gambar 2.2 Bagian-bagian pada tanaman *Sonneratia ovata* Backer (Goutham-Bharathi dkk., 2012)

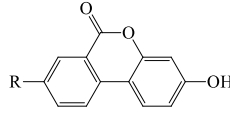
## 2.2 Tinjauan Kandungan Senyawa dan Bioktivitas dari *Sonneratia Ovata* Backer

Berbeda dengan *Sonneratia caseolaris*, *Sonneratia ovata* Backer belum banyak dilakukan penelitian. Wu dkk. (2009) menjelaskan bahwa telah diisolasi 7 senyawa baru dari buah *Sonneratia Ovata* Backer dan diidentifikasi menggunakan MS dan NMR. Tujuh senyawa tersebut adalah (-)-(R)-nyasol (**2**), (-)-(R)-4'-O-metilnyasol (**3**), 3,8-dihidroksi-6H-benzo[b,d]piran-6-on (**4**), 3-hidroksi-6H-benzo[b,d]piran-6-on (**5**), asam oleanolat (**6**), asam

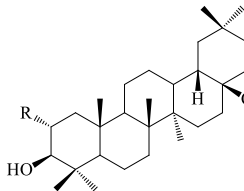
maslinat (7). Berikut struktur senyawa pada buah *Sonneratia ovata* Backer :



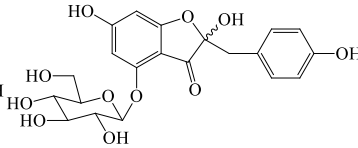
2 ; R = H  
3 ; R = Me



4 ; R = OH  
5 ; R = H



6 ; R = H  
7 ; R = OH

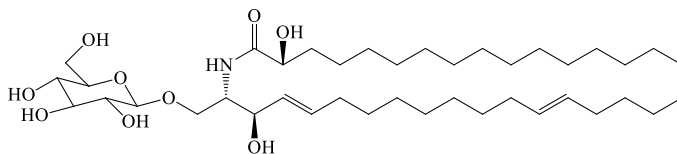


16

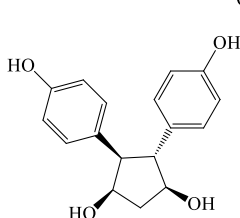
Dari senyawa-senyawa berikut dilakukan *bioassay* dan hanya pada senyawa (2), (3), dan (7) yang menunjukkan aktifitas sitotoksisitas (Wu dkk., 2009)

Menurut Nguyen dkk. (2015), senyawa-senyawa yang terkandung pada daun *Sonneratia ovata* Backer yaitu 3 senyawa fenolat (*sonnerphenolics A* (17), *sonnerphenolic B* (18), dan *sonnerphenolic C* (39)), senyawa *cerebroside* baru (*sonnercerebroside* (19)), 9 senyawa lognans (21-29), 2 senyawa steroid (30,31), 2 senyawa triterpen (32,33), 3 senyawa turunan asam gallat (34-36), 2 senyawa turunan fenolat (20,38), dan 1-O-benzil-b-D-glukopiranosida (37). Pada *in vitro*, dilakukan uji pada senyawa sebagai inhibitor *acetylcholinesterase* (AChE) dan aktifitas sitotoksisitas terhadap HeLa (*human epithelial carcinoma*), NCI-H460 (*human lung cancer*), MCF-7 (*human breast cancer*) *cancer cell lines* dan PHF (*primary human fibroblast*) *cell*. Hasilnya, senyawa (5,6,23) memiliki sitotoksisitas terhadap MCF-7 *cell line* dan senyawa (S)-rhodolouchol (22)

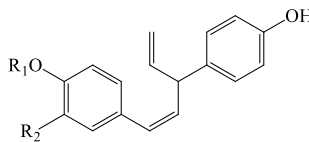
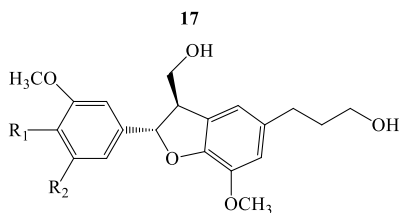
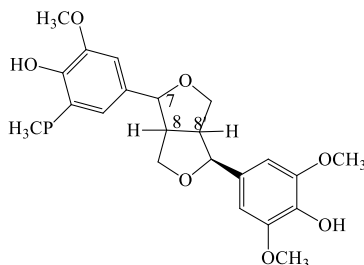
memiliki aktifitas inhibitor terhadap AchE. Berikut nama dan struktur senyawa pada daun *Sonneratia ovata* Backer : (-)-(R)-nyasol (**20**), (7S,8R)-dehidrokoniferil alkohol (**21**), (7S,8R)-5-metoksihidrokoniferil alkohol (**22**), (7S,8R)-urolignosida (**23**), lingueresinol (**24**), (+)-isolariciresinol (**25**), (+)-isolariciresinol 9'-O-β-D-glukopiranosida (**26**), (-)-isolariciresinol 9'-O-β-D-glukopiranosida (**26**), (-)-episyningaresinol (**28**), (+)-syningaresinol (**29**), β-sitosterol (**30**), 3-O-palmitoyl-β-sitosterol (**31**), *corosolic acid* (**32**), asam 3-O-acetilursolat (**33**), 6-O-galloyl-D-glukopiranosida (**34**), asam galat 3-O-β-D-glukopiranosida (**35**), 1-O-benzil-6-O-galloyl-β-D-glukopiranosida (**36**), dan (-)-rhodolouchol (**38**),



19



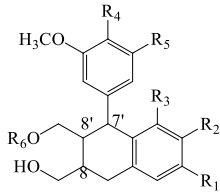
17

18 ; R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = OH20 ; R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = H21 ; R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H22 ; R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>23 ; R<sub>1</sub> = beta-D-Glc R<sub>2</sub> = H

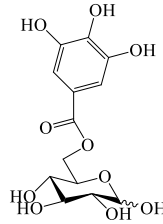
28; H7beta, H8alfa, H8'alfa

29; H7alfa, H8beta, H8'beta

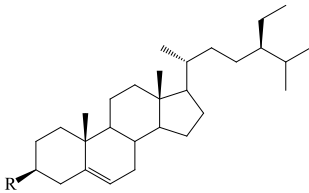




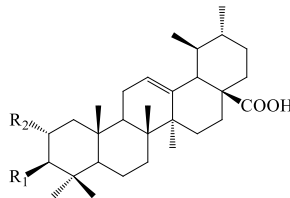
- $H_8$   $H_{7'}$   $H_{8'}$   $R_1$   $R_2$   $R_3$   $R_4$   $R_5$   $R_6$   
**24** ; beta alfa beta OCH<sub>3</sub> OH OH OCH<sub>3</sub> OCH<sub>3</sub> H  
**25** ; alfa alfa beta OCH<sub>3</sub> OH H OH H H  
**26** ; alfa alfa beta OCH<sub>3</sub> OH H OH H beta-D-Glc  
**27** ; beta beta alfa OCH<sub>3</sub> OH H OH H beta-D-Glc



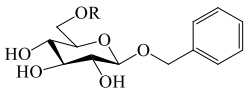
34



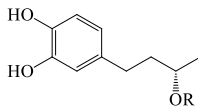
- 30** ; R = OH  
**31** ; R = OCOCH<sub>15</sub>H<sub>31</sub>



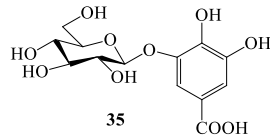
- 32** ; R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = OH  
**33** ; R<sub>1</sub> = OCOCH<sub>3</sub> R<sub>2</sub> = H



- 36** ; R = galloyl  
**37** ; R = H



- 38** ; R = H  
**39** ; R = beta-D-glc

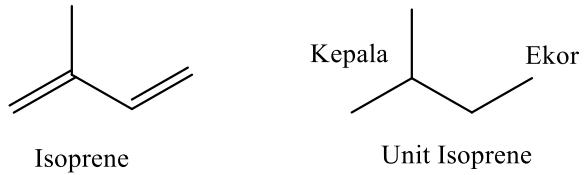


35

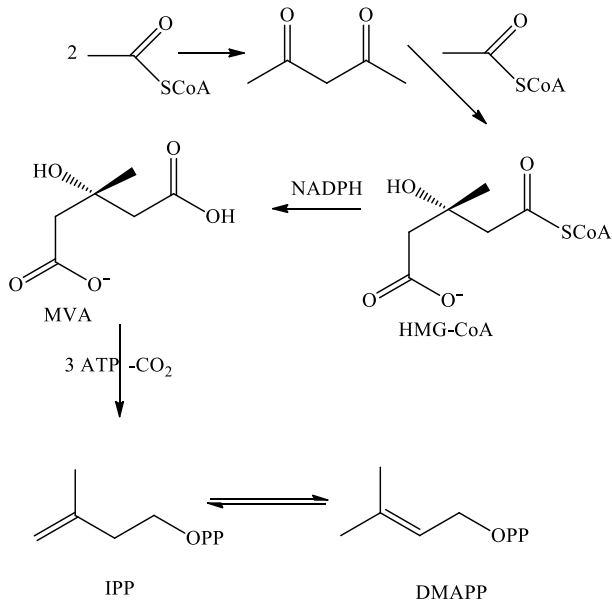
### 2.3 Tinjauan Senyawa Terpenoid

Terpenoid adalah kelompok senyawa metabolit sekunder terbesar, yang dapat dilihat dari jumlah senyawa maupun dari dasar kerangka strukturnya. Senyawa terpenoid merupakan salah satu kelompok dalam senyawa bahan alam yang memiliki keteraturan struktur khas yaitu tersusun dari unit satuan karbon dengan kelipatan lima yang disebut *isoprene* (Gambar 2.3). Terpenoid diperoleh secara biosintesis (Gambar 2.5) dari molekul isoprene yang memang terdapat dalam bahan alam, akan tetapi senyawa tersebut bukanlah senyawa sebenarnya. Senyawa yang terlibat adalah isopentenil pirofosfat (IPP) yang terbentuk dari asetat melalui dua jalur, yaitu jalur mevalonat (Gambar 2.4) dan jalur non

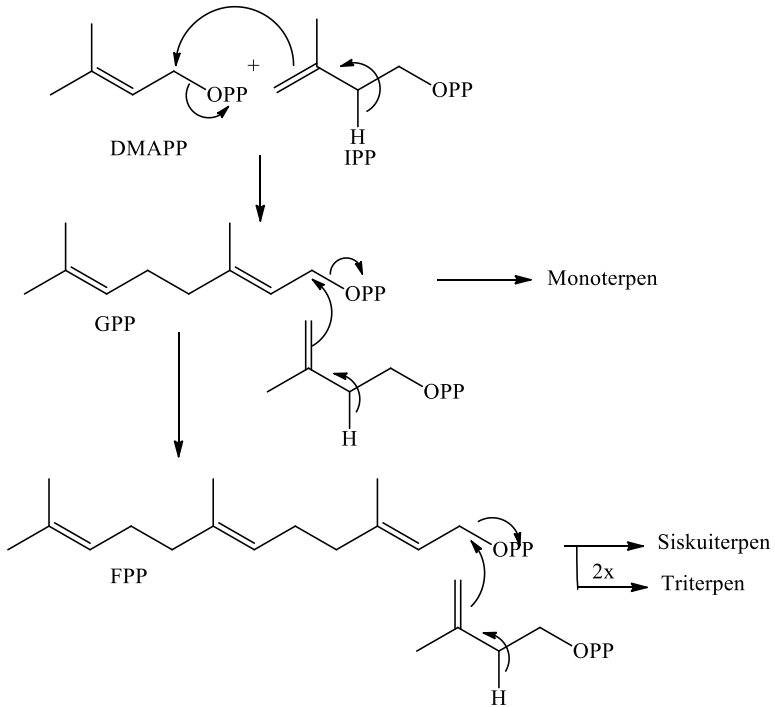
mevalonat. IPP terdapat di dalam sel hidup dan berkesetimbangan dengan isomernya, yaitu dimetilalil pirofosfat (DMAPP). Biosintesis IPP melalui jalur mevanolat (Harbone, 1987). Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprene. Secara kimia, triterpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat di dalam sitoplasma (Manitto, 1992).



Gambar 2.3 Senyawa *isoprene* dan Unit *isoprene* (Baser dan Buchbauer, 2010)



Gambar 2.4 Jalur Mevalonat untuk Pembentukan IPP (Baser dan Buchbauer, 2010)



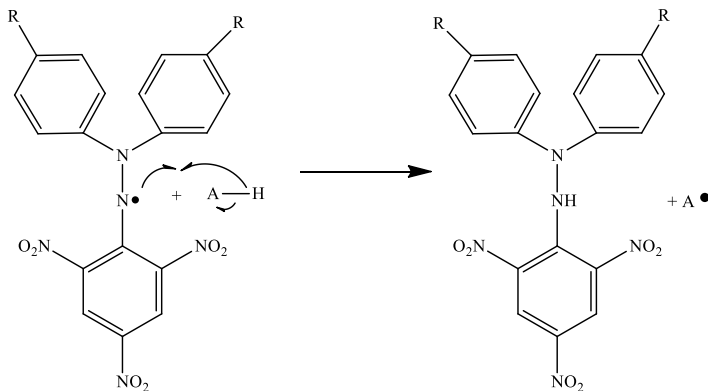
Gambar 2.5 Mekanisme Biosintesa Senyawa Terpenoid (Baser dan Buchbauer, 2010)

#### 2.4 Tinjauan Antioksidan dan Uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil)

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif sehingga dapat menyerang elektron pada molekul lain. Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Aktivitas radikal bebas yang tidak ditangani dapat menyebabkan kerusakan sel dan

memicu terjadinya penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, kanker dan diabetes (Abheri dkk., 2010).

Terdapat dua metode uji antioksidan yang dapat dilakukan yaitu metode uji DPPH (1,1-diphenil-2-picrilhidrazil) dan uji metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*). DPPH radikal merupakan senyawa radikal yang memiliki kestabilan tinggi pada suhu kamar dan sering digunakan untuk analisis antioksidan pada bahan alam. Pada metode DPPH senyawa ini akan bereaksi dengan antioksidan yang akan mendonorkan satu elektronnya sehingga membentuk senyawa DPPH lebih stabil (Gambar 2.6). Tingginya kestabilan radikal pada DPPH disebabkan karena adanya elektron bebas yang terdelokalisasi di seluruh bagian molekul dan tidak mudah mengalami dimerisasi (Molyneux, 2004).



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi DPPH dan Antioksidan (A-H) (Molyneux, 2004)

Donasi proton menyebabkan radikal bebas DPPH (berwarna ungu) menjadi senyawa non radikal (berwarna kuning). Prinsip Uji DPPH adalah perubahan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang menjangkau radikal DPPH dengan memantau absorbansi pada panjang gelombang 515 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kelebihan metode DPPH yaitu memiliki teknis yang sederhana dan pengerjaannya relatif lebih cepat

sedangkan kelemahannya DPPH hanya larut dalam pelarut organik terutama alkohol sehingga tidak dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan hidrofilik (Bendra, 2012).

## **2.5 Metode Pemisahan dan Pemurnian Senyawa**

### **2.5.1 Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kelarutan komponen zat terlarut dalam suatu pelarut berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran (*like or dislike*). Ekstraksi dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan bentuk campurannya, yaitu ekstraksi cair-cair dan padat-cair. Pada ekstraksi padat-cair terdapat beberapa metode ekstraksi antara lain dengan menggunakan cara dingin yaitu maserasi dan perkolasi, sedangkan dengan menggunakan cara panas yaitu sokletasi.

Maserasi adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dengan melakukan proses perendaman sampel yang sudah halus dengan menggunakan pelarut yang sesuai dalam kurun waktu tertentu dan pada suhu kamar dengan keadaan ditutup rapat, supaya zat-zat dalam sampel dapat larut sempurna. Prinsipnya pelarut akan masuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Setelah itu zat aktif tersebut akan larut, sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara yang di dalam dan di luar sel. Hal tersebut menyebabkan larutan yang pekat (konsentrasinya tinggi) didesak keluar. Maserasi dilakukan secara berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Goeswin, 2007). Perkolasi adalah metode ekstraksi padat-cair dengan cara mengalirkan pelarut secara perlahan-lahan ke dalam suatu kolom yang berisi sampel. Sokletasi adalah teknik ekstraksi padat-cair dengan menggunakan alat soklet pada suhu titik didih pelarut yang digunakan (Pavia dan Knitz, 1990).

### 2.5.2 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan berdasarkan pada perbedaan distribusi dari komponen campuran antara dua fasa yaitu fase diam (stasioner) dan fase gerak (*mobile*). Fase diam adalah fasa yang menahan komponen campuran yang memiliki sifat yang sama dengan fasa diamnya, sedangkan fasa gerak adalah fasa yang melarutkan (membawa) komponen yang memiliki sifat yang hampir sama dengan fasa gerak (Ernst, 2004).

**Kromatografi Lapis Tipis (KLT)** yaitu kromatografi yang memiliki prinsip adsorpsi. Fasa diam KLT yaitu menggunakan lempeng gelas atau alumunium yang dilapisi dengan lapisan tipis alumina, silika gel, atau bahan serbuk lainnya. Fasa geraknya yaitu menggunakan eluen yang sesuai (campuran pelarut organik). Pada KLT, komponen yang kepolarannya kurang akan terelusi terlebih dahulu daripada komponen yang lebih polar karena komponen tersebut akan terikat lebih kuat pada silika karena silika memiliki afinitas lebih kuat dengan komponen yang lebih polar. Setiap senyawa memiliki nilai *Retardation Factor* (Rf) yang berbeda-beda. *Retardation Factor* (Rf) adalah perbandingan jarak perpindahan senyawa dengan jarak perpindahan pelarut dalam waktu satu waktu (Kristanti dkk, 2008).

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik awal}}$$

Kromatografi Kolom adalah kromatografi yang menggunakan kolom sebagai alat untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran. Pemisahan kromatografi kolom adsorpsi didasarkan pada adsorpsi komponen-komponen campuran dengan afinitas berbeda-beda terhadap permukaan fase diam. Kromatografi kolom terdiri atas dua macam diantaranya kromatografi cair vakum dan kromatografi kolom gravitasi.

**Kromatografi Cair Vakum** adalah teknik pemisahan dengan bantuan tekanan (vakum). Fasa geraknya adalah pelarut yang sesuai dengan bantuan pompa vakum dan fasa diamnya berupa silika gel atau aluminium oksida. Sampel sebelum

dimasukkan kedalam kolom harus dilarutkan dengan sedikit pelarut, kemudian diimpregnasi dengan menggunakan silika. Pemisahan senyawa menggunakan KCV didasari dengan kelarutan senyawa yang akan dipisahkan. Kolom diisi dengan campuran pelarut yang sesuai dengan meningkatkan kepolaran (fasa gerak) sampai semua senyawa turun. Hasil yang diperoleh merupakan pemisahan komponen dalam fraksi yang berbeda-beda berdasarkan tingkat kepolaran. Komponen yang kepolarannya kurang akan lebih dahulu keluar, sedangkan yang memiliki kepolaran lebih tinggi akan tertahan pada fasa diam. Ketika tingkat kepolaran pelarut ditingkatkan maka komponen yang memiliki tingkat kepolaran yang hampir sama akan ikut keluar dan seterusnya. (Hardjosudirdjo, 1991).

**Kromatografi Kolom Gravitasi** adalah teknik pemisahan tanpa adanya bantuan dari luar, melainkan karena adanya gaya gravitasi. Fasa gerak dan diamnya sama dengan KCV. Laju aliran kolom dapat disesuaikan dengan mengubah kran pada kolom. Selama turunnya fasa gerak, zat yang terlarut akan mengalami proses adsorpsi dan pemisahan secara berulang. Komponen akan terpisah dan terbentuk fraksi-fraksi yang berbeda disebabkan karena perbedaan kepolaran maka komponen dalam senyawa akan bermigrasi melalui kolom dengan kecepatan yang berbeda-beda (David, 2000).

### 2.5.3 Rekrystalisasi

Rekrystalisasi biasanya digunakan untuk proses pemurnian hasil isolasi yang masih belum murni. Rekrystalisasi adalah proses pembentukan kembali kristal secara berulang. Prinsip rekrystalisasi adalah perbedaan kelarutan antara zat yang akan dimurnikan dengan zat pencampurnya. Rekrystalisasi ada dua macam yaitu dengan menggunakan satu pelarut dan dua pelarut. Rekrystalisasi dengan menggunakan dua pelarut terdiri dari beberapa tahap, pertama melarutkan bahan yang akan direkrystalisasi dengan pelarut yang sesuai yang bisa melarutkan sempurna, dapat juga dengan bantuan pemanasan. Kemudian, didinginkan dan ditambahkan

dengan pelarut yang tidak melarutkan supaya dapat membentuk kristal kembali dan sudah terpisah dengan pengotornya. Hal tersebut diulangi hingga didapatkan senyawa murni dan dilakukan penyaringan untuk memisahkan senyawa murni (Ricard, 1998). Sedangkan untuk rekristalisasi dengan satu pelarut yaitu dengan cara melarutkan senyawa yang akan dimurnikan dengan pelarut dalam keadaan panas bahkan mendidih hingga larut sempurna, kemudian didinginkan agar terbentuk kristal dan dipisahkan dengan menggunakan penyaringan. Syarat pelarut yang dapat digunakan dalam proses rekristalisasi dengan satu pelarut :

1. Pelarut tidak mengalami reaksi dengan padatan yang akan dimurnikan.
2. Kelarutan padatan harus tinggi saat keadaan panas dan harus rendah saat keadaan dingin.
3. Pengotor organik harus bisa larut dalam pelarut dalam keadaan dingin sehingga saat terbentuk kristal, pengotor tetap tinggal dalam pelarut.
4. Pengotor anorganik tidak larut dalam pelarut dalam keadaan panas, sehingga dapat dipisahkan dengan menyaring larutan dalam keadaan panas.
5. Titik didih pelarut harus lebih rendah daripada titik didih padatan.
6. Dipilih pelarut yang tidak toksik dan tidak mudah terbakar (Kristanti dkk, 2008).

## **2.6 Identifikasi Senyawa**

### **2.6.1 Spektrofotometri Inframerah**

Spektrofotometer inframerah merupakan alat untuk mengidentifikasi suatu gugus fungsional beserta jenis ikatan dalam suatu molekul (Underwood, 1986). Prinsip kerja dari spektrofotometer IR adalah ikatan kovalen pada molekul organik memiliki gerakan vibrasi yang khas pada tiap molekul. Ketika radiasi sinar inframerah ditembakkan dengan frekuensi tertentu, maka terjadi penyerapan sinar oleh suatu molekul dan diubah menjadi energi vibrasi molekul. Penyerapan tersebut hanya



menaikkan energi vibrasi tanpa mengubah frekuensi di daerah inframerah pada bilangan gelombang 600-4000  $\text{cm}^{-1}$ , sehingga terjadi perbedaan tingkat energi vibrasi pada molekul tersebut. Setiap ikatan yang berbeda pada suatu molekul memiliki frekuensi yang berbeda juga, sehingga setiap ikatan dalam suatu molekul akan memiliki pita-pita serapan yang spesifik dalam spektrum inframerah. Banyaknya yang diserap bermacam-macam dari ikatan ke ikatan. Hal tersebut disebabkan sebagian oleh perubahan momen dipol ( $\mu \neq 0$ ) pada saat energi diserap (Supratman, 2010).

Cara analisisnya yaitu sampel kristal yang telah murni dibebaskan dari air kemudian digerus bersama-sama dengan halida anorganik, KBr. Gerusan kristal murni dengan KBr dibentuk menjadi pelet tipis dengan bantuan alat penekan. Kemudian pelet tersebut diukur puncak serapannya. Informasi spektroskopi inframerah menunjukkan tipe-tipe dari adanya gugus fungsi dalam suatu molekul Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorbansi yang terbentuk pada spektrum inframerah dengan tabel korelasi dan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui (Gambar 2.) (Pavia dan Knitz, 1990).

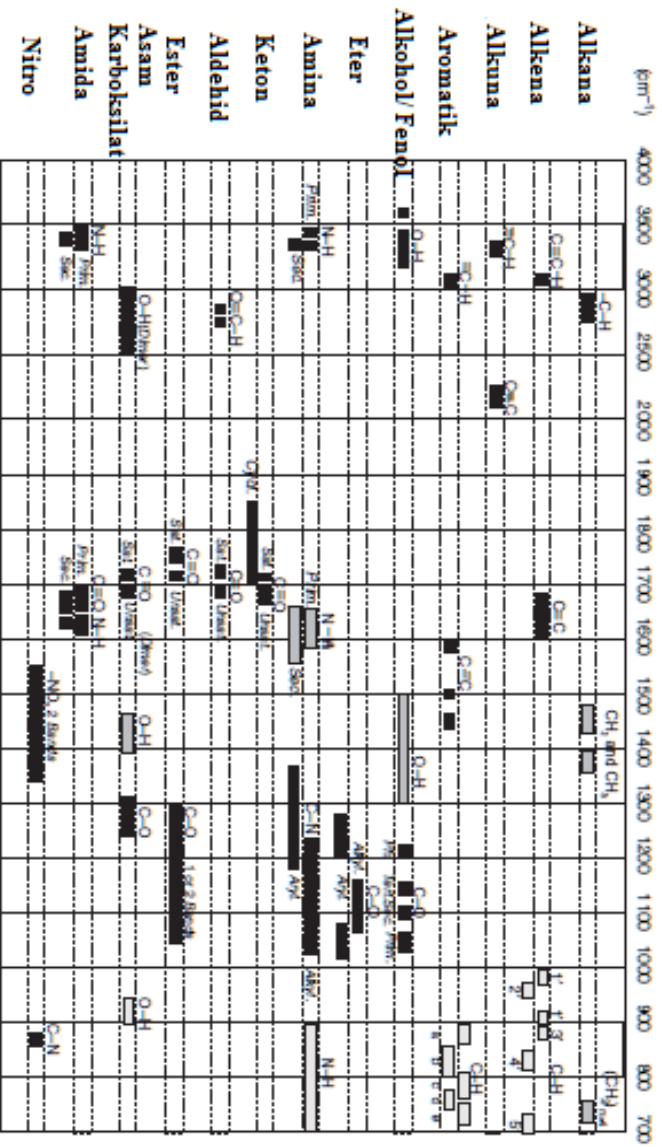
### **2.6.2 Spektrosfotometri $^1\text{H}$ dan $^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)**

Spektrosfotometer resonansi magnet inti atau NMR adalah suatu alat penentuan struktur senyawa organik berdasarkan absorpsi radiasi elektromagnetik dengan panjang gelombang frekuensi radio (4-900 MHz) oleh inti atom yang berada dalam medan magnetik (Oxtoby, 2003). Inti proton ( $^1\text{H}$ ) dan karbon ( $^{13}\text{C}$ ) mempunyai sifat-sifat magnet. Bila suatu senyawa yang mengandung hidrogen atau karbon diletakkan dalam bidang magnet dan diradiasi elektromagnetik, maka senyawa tersebut akan menyerap energi (resonansi magnetik).

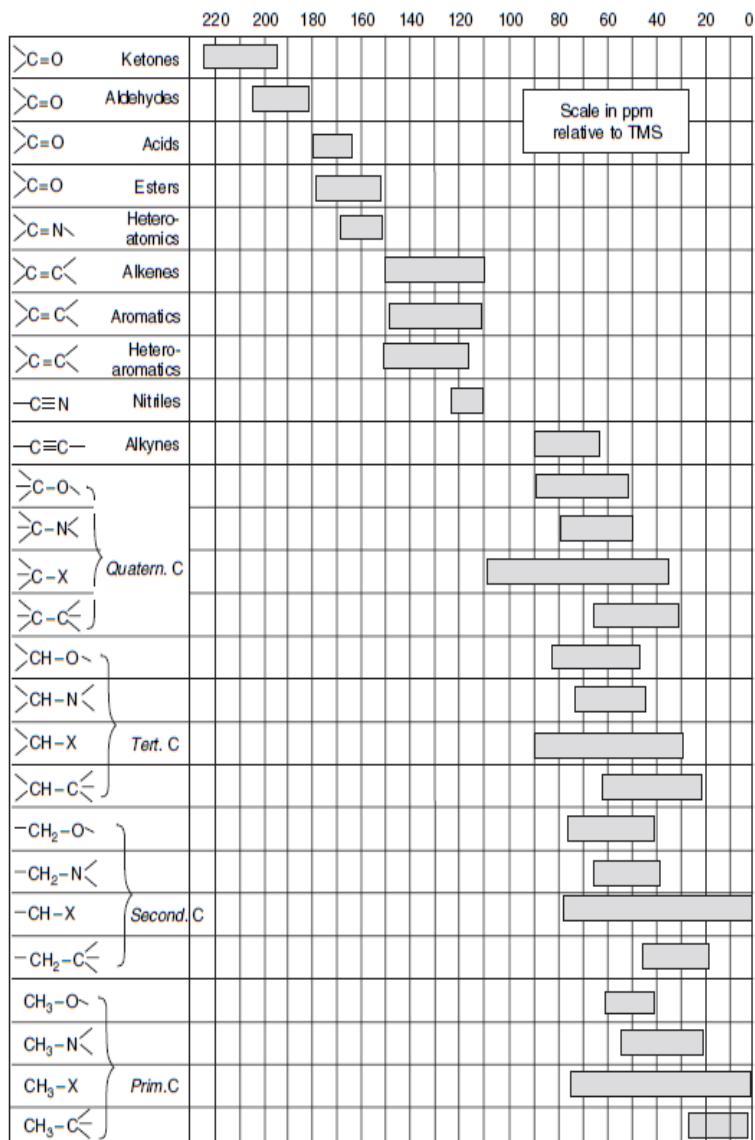
Analisis spektroskopi NMR akan memberikan informasi tentang jumlah, sifat, dan lingkungan hidrogen atau karbon dalam molekul. Spektrum NMR adalah grafik antara banyaknya energi

yang diserap dengan kuat medan magnet. Jika kedua magnet berlawanan arah ( $B_0$  dan  $B_{\text{eff}}$ ) maka dibutuhkan  $B_0$  yang lebih besar untuk inti beresonansi, sehingga dikatakan proton atau karbon bersifat terlindungi (*shielded*) dan serapannya terletak di daerah *upfield* (mendekati TMS). Sebaliknya, jika kedua magnet searah maka dibutuhkan  $B_0$  yang lebih rendah untuk inti beresonansi, sehingga dikatakan proton atau karbon bersifat tidak terlindungi (*deshielded*) dan serapannya terletak di daerah *downfield* (menjauhi TMS) (Supratman, 2010).

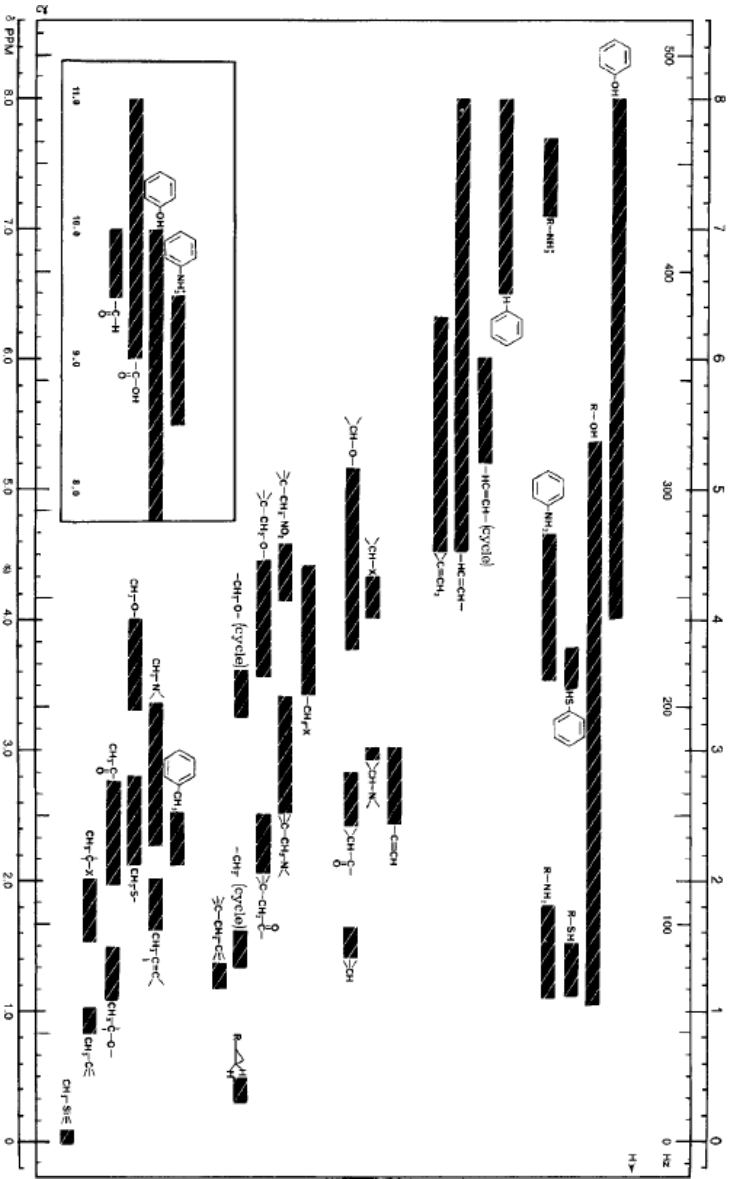
Spektrum NMR berupa plot antara intensitas sinyal NMR dengan pergeseran kimia. Pergeseran kimia menyatakan perbedaan frekuensi resonansi inti dengan senyawa standar pada spektrometer NMR. Pergeseran kimia  $^1\text{H}$  NMR senyawa organik terjadi pada daerah 0-15 ppm. Spektroskopi  $^{13}\text{C}$  NMR juga memberikan spektrum posisi absorpsi karbon berdasarkan jenis ikatan yang menyusun senyawa tersebut, sehingga akan memberikan sinyal yang berbeda. Pergeseran kimia untuk  $^{13}\text{C}$ -NMR berada di daerah 0-200 ppm (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005). Senyawa standar yang sering digunakan pada NMR adalah trimetilsilan (TMS) (Zhang, 2007). TMS dipilih karena proton-proton dari gugus metilnya lebih terlindungi dari pada proton senyawa yang akan diidentifikasi. Ada beberapa larutan yang dapat digunakan untuk analisa spektrum NMR. Jika akan menganalisa proton dari senyawa, maka digunakan pelarut yang tidak mengandung proton karena dapat mengganggu, seperti  $\text{CDCl}_3$  (Sastrohamidjojo, 1994).



Gambar 2.7 Data Serapan pada Spektrum Inframerah (Rouessac dan Rouessac, 1994)



Gambar 2.8 Pergeseran Kimia ppm  $^{13}C$  NMR (Rouessac dan Rouessac, 1994)



Gambar 2.9 Pergeseran kimia ppm 1H NMR (Rouessac dan Rouessac, 1994)

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Alat dan Bahan

#### 3.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, erlenmeyer, neraca analitik, kertas saring, *chamber*, kaca arloji, pinset, pipa kapiler, pipet tetes, botol vial, spatula, plat kromatografi lapis tipis (KLT), seperangkat alat kromatografi cair vakum (KCV), seperangkat alat kromatografi kolom gravitasi (KKG), *rotary evaporator* Buchi R-11, sinar UV, alat uji titik leleh Melting Point Apparatus *Fischer John*, spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-1100, spektrofotometer FTIR dalam KBr Shimadzu, dan spektrometer  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$ -NMR Agilent 500 MHz.

#### 3.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit batang tumbuhan *Sonneratia ovata* Backer yang diperoleh dari Pulau Dobo (Kepulauan Aru), Metanol (MeOH), etil asetat (EtOAc), metilen klorida (MC) teknis, n-heksana, aquades ( $\text{H}_2\text{O}$ ), pelarut Pro Analitik yang digunakan yaitu n-heksana, metilen klorida, etil asetat, metanol, kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), larutan penampak noda 1,5 % serum sulfat dalam  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N, aluminium foil, DPPH, ABTS, kertas *Whatman* 42, silika gel 60, dan plat silika gel F<sub>254</sub>.

### 3.2 Prosedur Penelitian

#### 3.2.1 Uji Pendahuluan

Serbuk kayu batang *Sonneratia ovata* Backer masing-masing sebanyak 25 gram dimasukkan ke dalam 4 vial (300ml), kemudian dimaserasi dengan pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda-beda (n-heksana, metilen klorida, etil asetat, dan metanol) masing-masing 200 ml selama 1 x 24 jam. Hasil maserasi disaring dan filtratnya dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Setelah itu, dilakukan

monitoring semua hasil ekstrak pada 1 plat KLT menggunakan eluen 100% metanol. Pada 4 ekstrak tersebut dilakukan uji antioksidan dengan metode DPPH. Berdasarkan hasil kromatogram pada KLT, maserasi menggunakan metanol menunjukkan banyaknya senyawa yang terdapat pada ekstrak metanol dan hasil uji antioksidan dengan metode DPPH pada ekstrak metanol diperoleh nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,73  $\mu\text{g/mL}$ , sehingga maserasi sampel selanjutnya menggunakan pelarut metanol.

### **3.2.2 Isolasi Senyawa dari Kulit Batang *Sonneratia ovata* Backer**

#### **3.2.2.1 Ekstraksi Kulit Batang *Sonneratia ovata* Backer**

Kulit batang dari tumbuhan *Sonneratia ovata* Backer dikeringkan pada suhu ruang, kemudian dihaluskan menggunakan alat giling hingga diperoleh serbuk kering. Serbuk kering dari kulit batang (1,5 kg) tersebut dimaserasi dengan 7 liter metanol selama 3x 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu dilakukan penyaringan sehingga diperoleh ekstrak cair dan residu. Setiap 1 x 24 jam, hasil ekstrak cair dilakukan monitoring KLT untuk memastikan bahwa semua senyawa sudah terekstrak. Kemudian hasil maserasi dipisahkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol pekat (153 gram). Ekstrak pekat metanol hasil maserasi dimonitoring dengan KLT untuk mencari eluen fraksinasi yang tepat untuk dapat memisahkan komponen-komponennya dengan baik.

#### **3.2.2.2 Pemisahan fraksi Metanol**

Fraksi metanol difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dengan 2 kali pengulangan masing-masing sebanyak 35 gram menggunakan eluen yang ditingkatkan kepolarannya di mulai dari 100% n-heksana, 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil KCV dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:4) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki  $R_f$  (*Retardation factor*) yang sama digabungkan dan dipisahkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (F1-F5). Karena

fraksi F2-F4 memiliki Rf yang relatif sama, maka ketiga fraksi tersebut digabung untuk difraksinasi lebih lanjut.

#### **3.2.2.3 Pemisahan Gabungan Sub fraksi F2-F4**

Fraksi gabungan F2-F4 (3,6 gram) difraksinasi dengan KCV ke-2 menggunakan eluen 100% n-heksana, metilen klorida : n-heksana (1:49, 1:19, 7:93, 3:17, 7:13) v/v, dan 100% etil asetat. Hasil KCV dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:4) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (G1-G5). Selanjutnya dilakukan fraksinasi kembali untuk fraksi G5.

#### **3.2.2.4 Pemisahan Sub fraksi G5**

Fraksi G5 (1,6 gram) difraksinasi dengan KCV ke-3 menggunakan eluen 100% n-heksana, etil asetat : n-heksana (1:19, 1:9, 3:17, 7:13) v/v dan 100% etil asetat. Hasil KCV dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:4) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (H1-H5). Karena fraksi H2-H3 memiliki Rf yang relatif sama, maka kedua fraksi tersebut digabung untuk difraksinasi lebih lanjut.

#### **3.2.2.5 Pemisahan Gabungan Sub fraksi H2-H3**

Fraksi gabungan H2-H3 (600 mg) difraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan eluen 100% n-heksana, etil asetat : n-heksana (1:19, 1:9, 3:17, 1:4, 1:3) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil KKG dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 11 fraksi (I1-I11). Karena



fraksi I6-I7 memiliki Rf yang relatif sama, maka kedua fraksi tersebut digabung untuk difraksinasi lebih lanjut.

#### **3.2.2.6 Pemisahan Gabungan Sub fraksi I6-I7**

Fraksi gabungan I6-I7 (173 mg) difraksinasi dengan KKG ke-2 menggunakan eluen 100% n-heksana, etil asetat : n-heksana (1:19, 7:93, 1:9, 3:17, 1:4) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil KKG dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 6 fraksi (J1-J6).

#### **3.2.1.7 Pemisahan Sub fraksi I5**

Fraksi gabungan I5 (166 mg) difraksinasi dengan KCV ke-4 menggunakan eluen 100% n-heksana, etil asetat : n-heksana (1:99, 3: 97, 4:96, 1:19, 7:93, 1:9, 11:89, 13:87, 1:4, 2:3) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil KCV dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 6 fraksi (K1-K6). Karena fraksi I4, J2, dan K2 memiliki Rf yang relatif sama, maka ketiga fraksi tersebut digabung untuk difraksinasi lebih lanjut.

#### **3.2.2.8 Pemisahan Gabungan Sub fraksi I4, J2 dan K2**

Fraksi gabungan I4, J2 dan K2 (247 mg) difraksinasi dengan KKG ke-3 menggunakan eluen 100% n-heksana, etil asetat : n-heksana (3:97, 1:19, 7:93, 1:9, 1:3) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Hasil KKG dimonitoring dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3) v/v. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 4 fraksi (L1-L4). Fraksi L2 berupa gel berwarna putih bening (156 mg), kemudian dilarutkan

dalam metanol membentuk endapan putih dan disaring menghasilkan endapan berupa serbuk putih sebanyak 35 mg. Selanjutnya dilakukan KLT fraksi L2 yang menunjukkan noda tunggal dengan adanya pengotor (*tailing*) di bagian bawah noda, sehingga dilakukan rekristalisasi. Rekristalisasi padatan dengan menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksana.

### **3.2.3 Identifikasi Struktur**

#### **3.2.3.1 Uji Titik Leleh**

Kristal senyawa yang sudah murni diambil sedikit dan diletakan di atas *object glass* yang diletakan pada plat titik leleh *Fisher john*. Kemudian, suhu dinaikan secara bertahap sambil terus diamati perubahan yang terjadi pada kristal. Titik leleh diperoleh saat kristal mulai meleleh sampai meleleh sempurna dengan rentang suhu  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Pengukuran dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Mahmiah, 2011).

#### **3.2.3.2 Uji Spektrofotometer FT-IR**

Kristal yang telah diperoleh diambil sedikit dan digerus bersama KBr di dalam mortar hingga homogen. Campuran tersebut dicetak membentuk pelet, kemudian diletakan dalam sampel *holder* dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer FT-IR. Setelah itu diukur serapannya pada bilangan gelombang 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Data yang didapatkan adalah puncak-puncak khas pada bilangan gelombang tertentu yang menjelaskan tentang gugus fungsi yang ada pada senyawa kristal tersebut (Mahmiah, 2011).

#### **3.2.3.3 Uji Spektrofotometer NMR**

Kristal yang diperoleh sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 0,5 mL pelarut bebas proton (kloroform) yang dapat melarutkan sempurna. Larutan sampel dimasukan dalam tabung injeksi, kemudian diletakan dalam alat NMR Agilent untuk mengukur  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$ . Data yang diperoleh adalah spektra yang menjelaskan tentang jumlah proton, jenis proton dan lingkungan proton (Mahmiah, 2011)

### 3.2.4 Uji Antioksidan

#### 3.2.1.1 Metode DPPH

Larutan sampel dibuat dengan cara 10 mg sampel yang akan diuji dilarutkan ke dalam 1 mL MeOH. Larutan sampel sebanyak 33  $\mu$ L dimasukan ke dalam *tube* yang terlindungi oleh cahaya dan ditambah dengan 1 mL larutan DPPH. Pada campuran dilakukan *vortex mixer* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Aktivitas antioksidan bisa diamati dengan adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning dan dapat diukur absorbansinya pada  $\lambda$  517 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara 1 mL DPPH dilarutkan ke dalam 33  $\mu$ L MeOH. Perhitungan persen penghambatan dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{Ab - As}{As} \times 100\%$$

Ab = Absorbansi blanko

As = Absorbansi sampel

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui pelarut yang baik untuk mengekstrak sampel kulit batang dari *Sonneratia ovata* Backer. Pertama-tama dilakukan maserasi masing-masing 25 gram dalam 4 vial (300 ml) dengan menggunakan pelarut yang berbeda-beda (*n*-heksana, metilen klorida, etil asetat, dan metanol masing-masing 200 ml) selama 1x24 jam. Tujuan digunakan 4 macam pelarut yaitu untuk mengetahui pelarut yang dapat mengekstrak banyak senyawa-senyawa yang ada di dalam sampel. Setelah itu, dilakukan penyaringan agar filtrat terpisahkan dari sisa sampelnya. Filtrat kemudian di pekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Semua hasil ekstraksi dimonitoring dalam 1 plat KLT dengan menggunakan eluen 100% metanol, untuk melihat profil noda pada senyawa dilakukan dengan menyemprotkan serum sulfat ke noda lalu dipanaskan dalam oven.. Pada kromatogram hasil KLT pada Gambar 4.1 dapat dilihat bahwa pada ekstrak *n*-heksana, metilen klorida dan etil asetat terlihat hanya ada noda di bagian atas (bersifat lebih non polar) sedangkan pada ekstrak metanol terlihat noda di bagian atas dan bawah yang tebal pada noda.

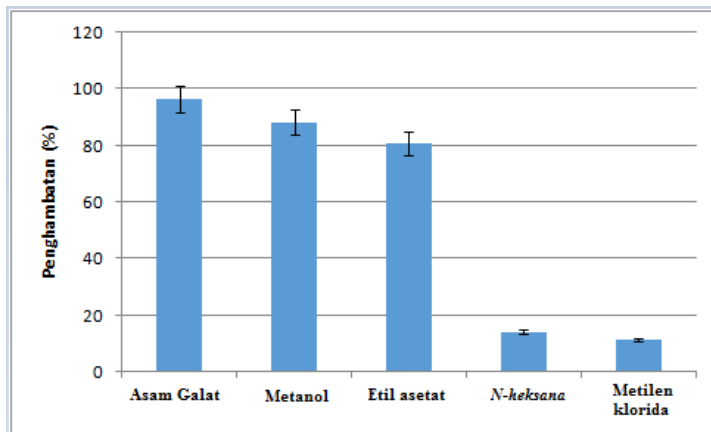
Pemilihan pelarut untuk mengekstrak *Sonneratia ovata* Backer juga ditentukan berdasarkan hasil aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Keempat ekstrak (*n*-heksana, metilen klorida, etil asetat dan metanol) diuji aktivitas antioksidan menggunakan radikal DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dengan 4 pelarut, dapat dilihat pada Gambar 4.2. Dari hasil tersebut, dapat dilihat bahwa yang memiliki prosentase penghambatan diatas 50% ada dua yaitu ekstrak metanol sebesar  $88,35 \pm 0,002$  % dan etil asetat sebesar  $80,69 \pm 0,012$  % dibandingkan dengan yang lain, dimana ekstrak *n*-heksana sebesar  $14,04 \pm 0,028$  % dan metilen klorida sebesar  $11,44 \pm 0,009$  %. Pada ekstrak metanol dan etil asetat

dilakukan perhitungan nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  yaitu konsentrasi minimum sampel untuk bisa menghambat radikal DPPH sebanyak 50 %. Nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak metanol sebesar 4,73  $\mu\text{g/mL}$  dan ekstrak etil asetat sebesar 31,89  $\mu\text{g/mL}$ .

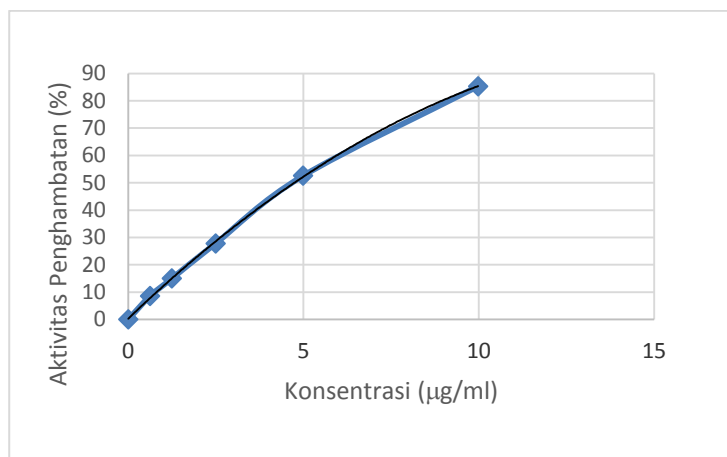
Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa-senyawa pada sampel terekstrak dengan baik dalam metanol (yang bersifat polar dan yang non polar), karena pelarut metanol merupakan pelarut universal yang dapat mengekstrak semua golongan senyawa metabolit sekunder. Serta, ekstrak metanol menunjukkan bahwa memiliki nilai  $IC_{50}$  yang baik sebagai antioksidan dibandingkan menggunakan pelarut yang lain. Sehingga metanol digunakan sebagai pelarut maserasi selanjutnya untuk mendapatkan senyawa yang aktif sebagai antioksidan.



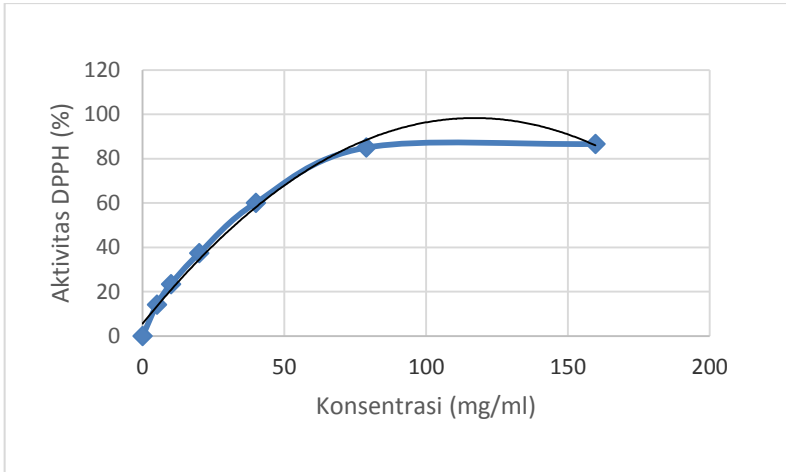
Gambar 4.1 Kromatogram KLT hasil uji pendahuluan menggunakan eluen 100% metanol.



Gambar 4.2 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dengan 4 pelarut (metanol, etil asetat, metilen klorida dan n-heksana), dengan konsentrasi 319,46  $\mu\text{g/mL}$  (Asam galat sebagai kontrol positif)



Gambar 4.3 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak Metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dengan memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  dari ekstrak metanol sebesar 4,73  $\mu\text{g/mL}$



Gambar 4.4 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Ekstrak Etil asetat kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dengan memiliki nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak metanol sebesar  $31,89 \mu\text{g/mL}$

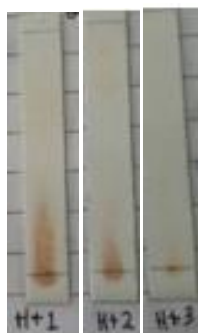
## 4.2 Isolasi Senyawa dari Kulit Batang *Sonneratia ovata* Backer

Penelitian ini menggunakan sampel kulit batang dari ekstrak metanol *Sonneratia ovata* Backer yang berasal dari Pulau Dobo, Kepulauan Aru. Proses isolasi sampel kulit batang meliputi : ekstraksi, fraksinasi, pemurnian, identifikasi dan uji antioksidan.

### 4.2.1 Ekstraksi Kulit Batang *Sonneratia ovata* Backer

Kulit batang *Sonneratia ovata* Backer mula-mula dikeringkan pada suhu ruang yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel. Kemudian sampel dihaluskan dengan menggunakan alat giling sehingga berbentuk serbuk, hal tersebut agar luas permukaan sampel menjadi lebih besar dan diperoleh serbuk kering sebanyak 1,5 kg. Sampel kering (1,5 kg) dimaserasi dengan 7 liter metanol selama  $3 \times 24$  jam dalam suhu ruang. Setiap  $1 \times 24$  jam, dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara serbuk dengan hasil ekstraksi cair. Pada hasil ekstraksi cair yang diperoleh setiap  $1 \times 24$  jam dimonitoring dengan KLT untuk

mengetahui semua senyawa sudah terekstrak atau belum (Gambar 4.5). Kemudian, hasil maserasi dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat berbentuk pasta berwarna coklat tua sebanyak 153 gram. Metode Maserasi dipilih dalam penelitian ini karena memiliki kelebihan yaitu praktis, waktu yang diperlukan lebih singkat, tidak menggunakan proses pemanasan sehingga tidak menyebabkan senyawa terdekomposisi dan digunakan untuk sampel dalam jumlah banyak.



**H+1** : Hasil maserasi hari pertama  
(1 x 24 jam)

**H+2** : Hasil maserasi hari pertama  
(1 x 24 jam)

**H+3** : Hasil maserasi hari pertama  
(1 x 24 jam)

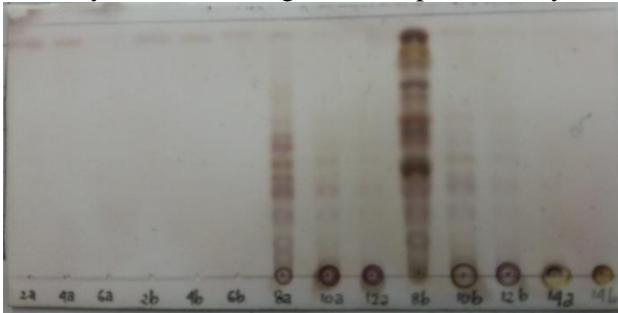
Gambar 4.5 Kromatogram hasil maserasi ekstrak metanol dengan eluen 100% metanol

#### 4.2.2 Pemisahan fraksi Metanol

Ekstrak pekat metanol dilakukan fraksinasi pertama dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan 2 kali pengulangan dengan masing-masing ekstrak sebanyak 35 gram menggunakan eluen secara berurutan mulai dari 100% *n*-heksana, 100% etil asetat dan 100% metanol. Tujuan dilakukan 2 kali pengulangan agar waktu yang dibutuhkan lebih efektif dan silika kolom yang digunakan lebih efisien. Metode KCV dipilih karena jumlah sampel yang banyak dan masih banyaknya noda pada sampel. Hasil KCV I diperoleh vial sebanyak 29 vial (@300 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.6). Fungsi monitoring KLT yaitu untuk mengetahui pola noda pada hasil KCV agar dapat digabungkan sesuai dengan  $R_f$  yang relatif sama.

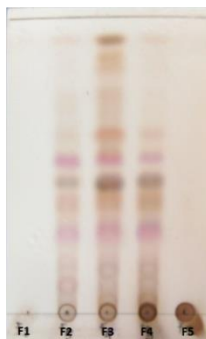


Tujuan menggunakan eluen diatas untuk melakukan proses pemisahan senyawa sesuai dengan sifat kepolaran senyawanya.



Gambar 4.6 Kromatogram KLT hasil KCV dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v

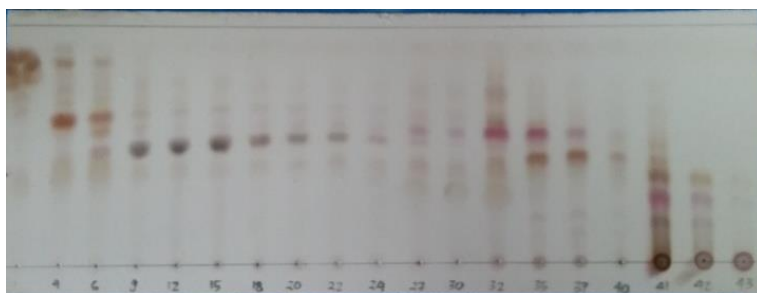
Pada kromatogram KLT yang memiliki  $R_f$  relatif sama digabungkan menjadi satu fraksi. Penggabungan fraksi menjadi 5 fraksi, yaitu fraksi F1 (385,2 mg), F2 (448 mg), F3 (1,7939 gram), F4 (1,4124 gram), dan F5 (4,9648 gram). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.7. Fraksi F2-F4 menunjukkan pola noda yang hampir sama dan masih banyak noda sehingga ketiga fraksi tersebut digabungkan untuk dilakukan fraksinasi lanjutan.



Gambar 4.7 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KCV (fraksi F) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v

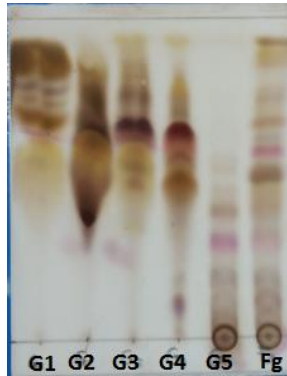
### 4.2.3 Pemisahan Gabungan Sub fraksi F2-F4

Fraksi gabungan F2-F4 (3,6 gram) difraksinasi lebih lanjut dengan metode KCV ke-2 dengan eluen 100% *n*-heksana, metilen klorida : *n*-heksana (1:49, 1:19, 7:93, 3:17, 7:13) v/v, dan 100% etil asetat. Metode KCV ini dipilih karena masih banyak terdapat noda. Hasil KCV ke-2 diperoleh sebanyak 44 vial (@100 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.8). Variasi eluen dengan peningkatan kepolaran dari eluen non polar sampai polar agar hasil pemisahannya antar noda baik sesuai dengan sifat kepolaran senyawa yang ada pada sampel.



Gambar 4.8 Kromatogram KLT hasil KCV ke-2 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v

Pada kromatogram KLT hasil KCV ke-2 yang memiliki  $R_f$  relatif sama digabungkan menjadi 5 fraksi, yaitu G1 (751,4 mg), G2 (401 mg), G3 (122 mg), G4 (301,1 mg), dan G5 (1,641 gram). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.9. Fraksi G5 menunjukkan pola noda yang lebih sederhana karena jumlah nodanya yang tidak terlalu banyak, sehingga fraksi G5 dipilih untuk proses fraksinasi selanjutnya.

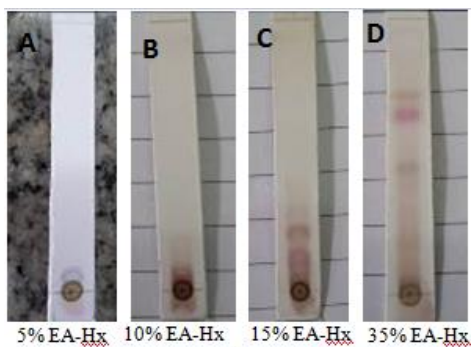


Gambar 4.9 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KCV ke-2 (fraksi G) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v

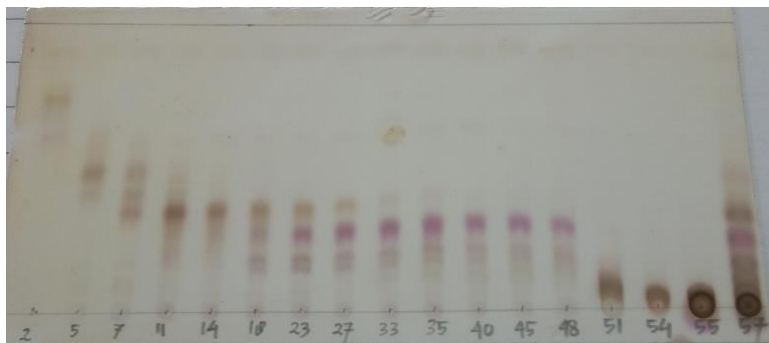
#### 4.2.4 Pemisahan Sub fraksi G5

Fraksi G5 (1,641 gram) dilakukan fraksinasi lanjutan dengan metode KCV ke-3 dengan eluen 100% *n*-heksana, etil asetat : *n*-heksana (1:19, 1:9, 3:17, 7:13) v/v dan 100% etil asetat. Metode KCV ini dipilih karena masih banyaknya noda. Hasil KCV III diperoleh vial sebanyak 57 vial (@100 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.11). Variasi eluen dipilih melalui monitoring KLT dan diamati pada konsentrasi etil asetat : *n*-heksana (1:19 v/v) mulai muncul noda pada KLT sehingga dipilih sebagai eluen awal dalam proses fraksinasi (Gambar 4.10a).

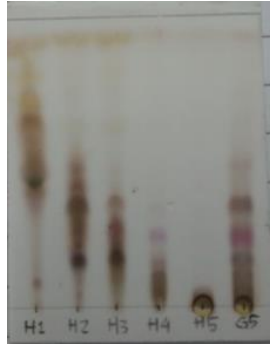
Pada kromatogram KLT hasil KCV ke-3 yang memiliki Rf relatif sama digabungkan menjadi 5 fraksi, yaitu H1 (132 mg), H2 (371,4 mg), H3 (261,5 mg), H4 (326,8 mg), dan H5 (594,3 mg). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.12. Pada hasil KLT gabungan menunjukkan bahwa fraksi H2 dan H3 memiliki pola noda yang hampir sama sehingga kedua fraksi itu digabung untuk dilakukan fraksinasi selanjutnya.



Gambar 4.10 Kromatogram KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KCV ke-3



Gambar 4.11 Kromatogram KLT hasil KCV ke-3 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v



Gambar 4.12 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KCV ke-3 (fraksi H) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v

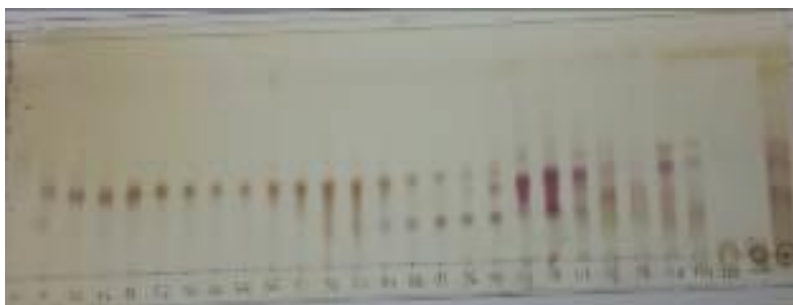
#### 4.2.5 Pemisahan Sub fraksi H2-H3

Fraksi gabungan H2-H3 (632,9 mg) dilakukan fraksinasi selanjutnya dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) ke-1 dengan eluen 100% *n*-heksana, etil asetat : *n*-heksana (1:19, 1:9, 3:17, 1:4, 1:3) v/v, 100% etil asetat, dan 100% metanol. Metode KKG ini dipilih karena jumlah noda yang tidak terlalu banyak dan jarak antar noda yang berdekatan. Hasil KKG I diperoleh sebanyak 126 vial (@50 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.14). Variasi eluen dipilih melalui monitoring KLT dan diamati pada konsentrasi etil asetat : *n*-heksana (1:19 v/v) mulai muncul noda pada KLT sehingga dipilih sebagai eluen awal dalam proses fraksinasi (Gambar 4.13).

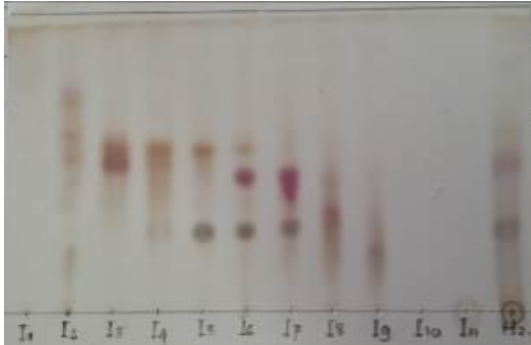
Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-1 yang memiliki  $R_f$  relatif sama digabungkan menjadi 11 fraksi, yaitu I1 (227,4 mg), I2 (65,5 mgr), I3 (163,7 mg), I4 (109,3 mg), I5 (166,8 mg), I6 & I7 (173,7 mg), I8 (50,7 mg), I9 (57,1 mg), I10 (66,2 mg), dan I11 (114,7 mg). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.15. Pada hasil KLT gabungan menunjukkan bahwa fraksi I6 dan I7 memiliki pola noda yang hampir sama sehingga kedua fraksi itu digabung untuk dilakukan fraksinasi lanjutan.



Gambar 4.13 Kromatogram KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KKG ke-1 (eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4))



Gambar 4.14 Kromatogram KLT hasil KKG dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v



Gambar 4.15 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KKG (fraksi I) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v

#### 4.2.6 Pemisahan Sub Fraksi I6-I7

Fraksi gabungan I6-I7 (173 mg) (Gambar 4.16) dilakukan fraksinasi lanjutan dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) ke-2 dengan eluen 100% *n*-heksana, etil asetat : *n*-heksana (1:19, 7:93, 1:9, 3:17, 1:4) v/v, 100% etil asetat, dan 100% metanol. Metode KKG ini dipilih karena jumlah noda hanya 3 dan jarak antar noda yang berdekatan. Hasil KKG ke-2 diperoleh sebanyak 74 vial (@ 25 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.18). Variasi eluen dipilih melalui monitoring KLT dan diamati pada konsentrasi etil asetat : *n*-heksana (1:19 v/v) mulai muncul noda pada KLT sehingga dipilih sebagai eluen awal dalam proses fraksinasi (Gambar 4.17) dan selalu diawali dengan eluen 100% *n*-heksana agar senyawa yang bersifat non polar ikut bersama eluen tersebut.

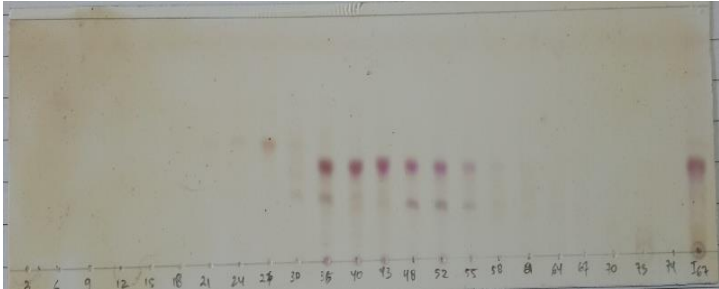


Gambar 4.16 Kromatogram KLT fraksi gabungan I6 dan I7 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v



Gambar 4.17 Kromatogram KLT untuk mencari eluen yang sesuai untuk KKG ke-2 (eluen etil asetat : *n*-heksana (1:19) v/v)





Gambar 4.18 Kromatogram KLT hasil KKG ke-2 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v

Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-2 yang memiliki  $R_f$  relatif sama digabungkan menjadi 6 fraksi, yaitu J1 (61,4 mg), J2 (18,6 mg), J3 (64 mg), J4 (57 mg), J5 (16,6 mg), dan I6 (53,9 mg). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.19. Fraksi J2 menunjukkan noda tunggal tapi masih berekor dan jumlahnya yang sangat sedikit. Oleh karena itu, dilakukan fraksinasi kembali pada fraksi I5 karena memiliki noda yang sama dengan J2 dibuktikan dengan KLT (Gambar 4.20).



Gambar 4.19 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KKG ke-2 (fraksi J) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v

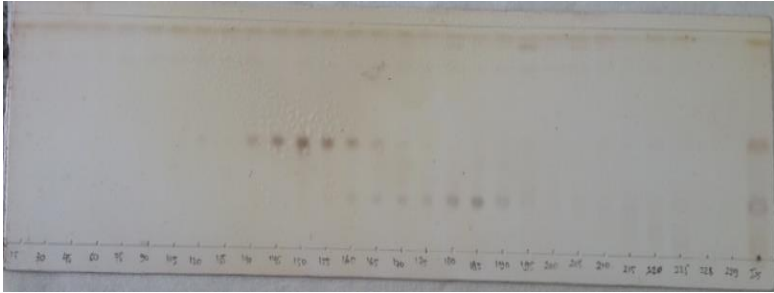


Gambar 4.20 Kromatogram KLT fraksi I5 dan J2 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (2:3) v/v

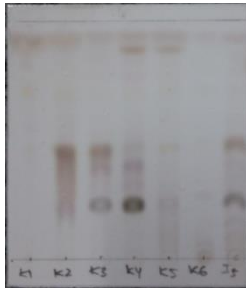
#### 4.2.7 Pemisahan Sub fraksi I5

Untuk memisahkannya noda yang sama seperti J2, maka fraksi I5 (166 mg) dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) ke-4 dengan eluen 100% *n*-heksana, etil asetat : *n*-heksana (1:99, 3: 97, 4:96, 1:19, 7:93, 1:9, 11:89, 13:87, 1:4, 2:3) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Metode KCV ini dipilih karena jarak antar noda yang berjauhan. Hasil KCV ke-4 diperoleh sebanyak 229 vial (@50 mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.21). Variasi eluen dipilih dengan jarak konsentrasi sangat dekat supaya pemisahan antar nodanya bisa lebih baik (tidak bercampur antara 1 noda dengan noda yang lain).

Pada kromatogram KLT hasil KCV ke-4 yang memiliki Rf relatif sama digabungkan menjadi 6 fraksi, yaitu K1 (204,5 mg), K2 (119,1 mgr), K3 (13,5 mg), K4 (43,9 mg), K5 (0,0809 gram), dan K6 (53,5 mg). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.22. Fraksi K2 menunjukkan noda tunggal yang memiliki ekor yang cukup panjang. Fraksi I4, J2 dan K2 memiliki noda yang sama dan dibuktikan dengan dilakukan KLT pada Gambar 4.23.



Gambar 4.21 Kromatogram KLT hasil KCV ke-4 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (2:3) v/v



Gambar 4.22 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KCV ke-4 (fraksi K) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (2:3) v/v

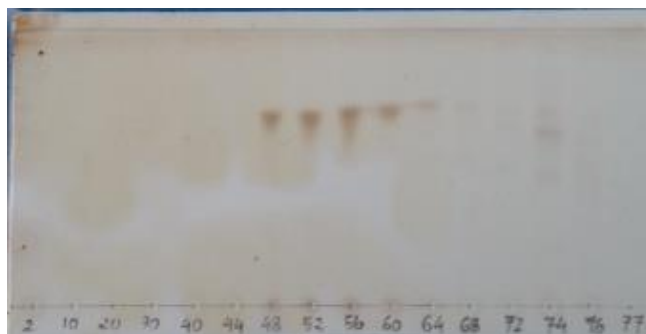


Gambar 4.23 Kromatogram KLT fraksi J2, K2 dan I4 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v

#### 4.2.8 Pemisahan Sub Fraksi I4, J2, dan K2

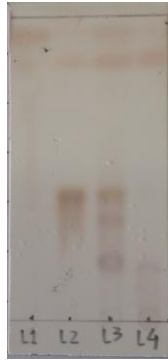
Pada Gambar 4.23, dapat dibuktikan bahwa ketiganya memiliki noda yang sama tetapi masih memiliki ekor. Sehingga ketiga fraksi tersebut digabung dan dilakukan fraksinasi lanjutan. Fraksi I4, J2, dan K2 (247 mg) dilakukan fraksinasi dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) ke-3 dengan eluen 100% *n*-heksana, etil asetat : *n*-heksana (3:97, 1:19, 7:93, 1:9, 1:3) v/v, 100% etil asetat dan 100% metanol. Metode KKG ini dipilih karena jarak antar noda dengan ekor yang sangat berdekatan. Hasil KKG ke-3 diperoleh sebanyak 76 vial (@ 25mL) dan selanjutnya dimonitoring dengan KLT (Gambar 4.24).

Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-3 yang memiliki  $R_f$  relatif sama digabungkan menjadi 4 fraksi, yaitu L1 (248,5 mg), L2 (156,2 mg), L3 (31,9 mg), dan L4 (34 mg). Hasil fraksi gabungan dimonitoring dengan KLT dan diperoleh kromatogram seperti Gambar 4.25.



Gambar 4.24 Kromatogram KLT hasil KKG ke-3 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (2:3) v/v

Pada hasil kromatogram KLT, fraksi L2 menunjukkan noda tunggal yang masih berekor. Hal itu menunjukkan bahwa senyawa yang ada pada fraksi L2 belum murni, sehingga tahap selanjutnya dilakukan rekristalisasi. Sebelum kristalisasi, dilakukan uji kelarutan pada fraksi L2 menggunakan beberapa pelarut. Hasilnya, fraksi L2 tidak larut dalam metanol dan *n*-heksana, larut sebagian dalam etil asetat dan larut sempurna dalam kloroform dan etil asetat panas.



Gambar 4.25 Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KKG ke-3 (fraksi L) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v

Sesuai dengan prinsip rekristalisasi, yaitu pelarut yang digunakan adalah pelarut yang tidak melarutkan sempurna pada suhu ruang dan dapat melarutkan sempurna pada suhu tinggi. Oleh karena itu, rekristalisasi fraksi L2 menggunakan 2 pelarut yaitu etil asetat panas (yang dapat melarutkan sempurna) dan *n*-heksana dingin (tidak melarutkan). Kristal yang terbentuk disaring vakum dan dicuci dengan *n*-heksana. Fungsi pencucian dengan *n*-heksana yaitu untuk melarutkan pengotor yang masih terjebak dalam kristal.

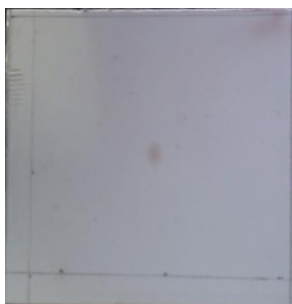
Kristal L2 yang diperoleh kristal berwarna putih dengan massa sebanyak 17 mg. Uji kemurnian dengan dilakukan uji tiga eluen, uji KLT dua dimensi dan uji titik leleh. Uji tiga eluen dilakukan dengan menggunakan eluen yang berbeda sehingga didapatkan 3 posisi yang berbeda yaitu noda diatas, ditengah dan dibawah. Hal tersebut untuk membuktikan bahwa senyawa telah murni karena pada posisi yang berbeda tetapi noda yang muncul tetap noda tunggal seperti pada Gambar 4.26. Selanjutnya, uji KLT dua dimensi dilakukan pada plat KLT ukuran 5x5cm dengan menggunakan dua macam eluen yang berbeda yang masing-masing eluen dapat membawa noda diposisi tengah. Pada hal ini, eluen yang digunakan 1:3 etil asetat : *n*-heksana dan 7 : 93 etil asetat : metilen klorida. Eluen tersebut digunakan supaya hasil

KLT mendapatkan noda yang tepat ada di tengah untuk mengetahui kemurnian dari senyawa tersebut, apakah masih ada noda lain disekitarnya. Hasil uji KLT dua dimensi dapat dilihat pada Gambar 4.27, menunjukkan bahwa kristal L2 sudah murni karena sudah tidak adanya noda lain selain noda kristal L2. Uji titik leleh menggunakan alat ukur *Fisher John Melting* dan diperoleh titik leleh dari kristal L2 sebesar 200-201°C. Kristal L2 menunjukkan senyawa murni karena senyawa dikatakan murni jika rentang titik lelehnya  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Kristal L2 disebut dengan senyawa (1)



- a. etil asetat : *n*-heksan (2:3) v/v,
- b. etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v,
- c. etil asetat : *n*-heksana (1:9) v/v

Gambar 4.26 Kromatogram hasil uji 3 eluen senyawa (1)



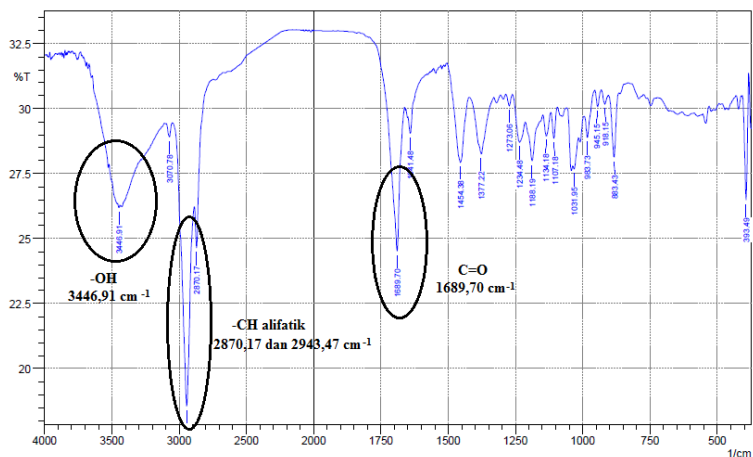
Gambar 4.27 Kromatogram hasil uji 2 dimensi senyawa (1) dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3 v/v) dan etil asetat : metilen klorida (7 : 93 v/v)

### 4.3 Identifikasi Struktur Hasil Isolasi Senyawa (1)

Senyawa (1) berupa serbuk putih sebanyak 17 mg dengan titik leleh 200-201°C. Analisa selanjutnya menggunakan spektrofotometer FTIR. Gambar 4.28 merupakan hasil spektrum Inframerah (IR) dari senyawa (1), dimana pada spektrum tersebut menunjukkan serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi. Pada bilangan gelombang 3446,91  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus hidroksi (O-H). Sedangkan gugus CH alifatik ( $\text{sp}^3$ ) ditunjukkan dengan adanya serapan bilangan gelombang 2870,17 dan 2943,47  $\text{cm}^{-1}$ . Pada bilangan gelombang 1689,70  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O) (Rouessac dan Rouessac, 1994). Pada hasil spektrum IR tidak terdapat beberapa serapan pada bilangan gelombang antara 1370-1600  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya C=C aromatik. Oleh karena itu, senyawa (1) diperkirakan antara kerangka triterpen dan steroid, didukung dengan afinitas kimia dari *Sonneratia ovata* Backer yang menghasilkan senyawa-senyawa tersebut. Hal tersebut diperkuat dengan membandingkan serapan bilangan gelombang dari salah satu senyawa triterpen yaitu senyawa asam betulinat (42) dengan senyawa (1). Serapan bilangan gelombang senyawa asam betulinat (42) yaitu pada bilangan gelombang 3446  $\text{cm}^{-1}$  (-OH), 1685  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 2924 dan 2862  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$  alifatik) (Shahlaei dkk., 2013). Setelah dibandingkan, terdapat kesamaan pola pada serapan bilangan gelombang antara senyawa (1) dengan senyawa triterpen. Selanjutnya, dilakukan uji  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  untuk menentukan struktur senyawa (1).

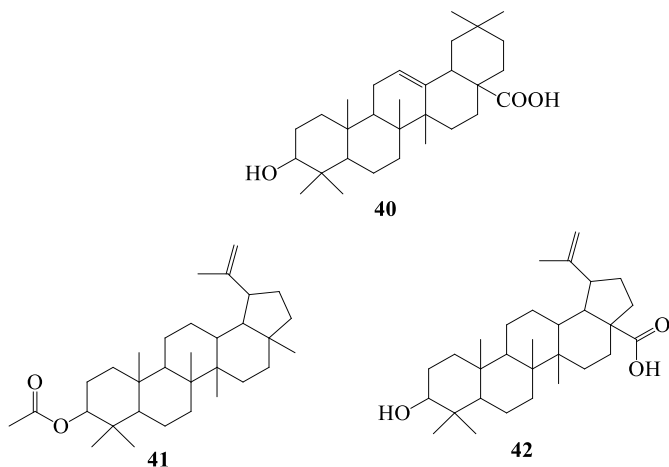
Penentuan struktur selanjutnya menggunakan data spektrum  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  dengan menggunakan pelarut  $\text{CDCl}_3$ . Pada data pergeseran kimia proton ( $^1\text{H-NMR}$ ) diperoleh informasi tentang lingkungan kimia, jumlah dan jenis proton, sedangkan pada pergeseran kimia karbon ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) hanya memperoleh informasi tentang jumlah dan jenis karbon. Data  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa (1) (Tabel 4.1) menunjukkan bahwa senyawa (1) memiliki minimal 32 atom karbon. Pada pergeseran kimia 68,6 dan 79,1 ppm menunjukkan adanya 2 atom karbon yang berikatan tunggal dengan atom oksigen (C-O). Adanya gugus karbonil (C=O) ditunjukkan dengan adanya pergeseran kimia pada 179,8

ppm yang diperkuat dengan serapan bilangan gelombang 1689,70  $\text{cm}^{-1}$  pada spektrum IR. Pada pergeseran kimia 109,4 dan 150,8 ppm memperlihatkan adanya 2 atom karbon yang berikatan rangkap (C=C). Terdapat delapan gugus metil yang ditunjukkan dengan adanya sinyal karbon pada pergeseran kimia pada 14,8; 15,4; 16,1; 16,2; 18,4; 19,5; 20,9; dan 29,8 ppm. Pada sinyal karbon pada pergeseran kimia 18,4; 25,64; 27,5; 28,1; 30,6; 32,2; 34,4; 38,8; dan 49,4 ppm menunjukkan adanya gugus metilen (Rouessac dan Rouessac, 1994). Berdasarkan dari jumlah karbon  $^{13}\text{C}$ -NMR dan hasil IR maka dapat diperkirakan senyawa (1) memiliki kerangka triterpen dengan memiliki gugus karbonil dan gugus hidroksi. Beberapa contoh senyawa triterpen yang memiliki gugus tersebut yaitu asam olenolat (6), asam maslinat (7) *corosolic acid* (32), asam 3-O-acetilursolat (33), asam ursolat (40), asam betulinat (41), dan lupenil asetat (42). Senyawa (6), (7), (41), dan (42) merupakan senyawa hasil isolasi dari *Sonneratia ovata* Backer (Wu dkk., 2009 ; Nguyen dkk.,2015), sehingga data  $^1\text{H}$ -NMR digunakan untuk menentukan struktur senyawa (1) secara keseluruhan.



Gambar 4.28 Spektrum Infrared (IR) Senyawa (1) dari pellet KBr



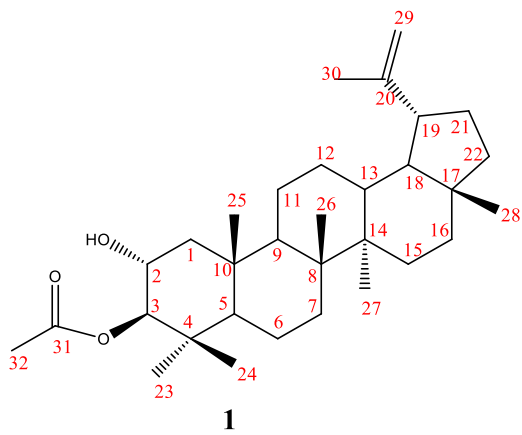


Data  $^1\text{H-NMR}$  senyawa (**1**) (Tabel 4.1) pada pergeseran kimia 0,82 (6H,*s*), 0,75 (6H,*s*), 0,93 (6H,*s*), dan 1,68 (3H,*s*) menunjukkan adanya tujuh metil *singlet*. Adanya proton pada karbon yang berikatan rangkap (C=C) ditunjukkan dengan adanya pergeseran kimia 4,73 ppm (2H, *s*). Juga terdapat proton pada karbon yang berikatan dengan atom oksigen ditunjukkan dengan adanya pergeseran kimia 3,18 ppm (dd, 5; 4,7 Hz). Selain itu, terdapat sinyal proton khas untuk gugus hidroksi pada pergeseran kimia 2,62 (1H,*s*) (Rouessac & Rouessac, 1994).

Berdasarkan analisis data IR,  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  di atas maka dapat disimpulkan bahwa senyawa (**1**) memiliki kesamaan struktur dengan senyawa 3 $\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol (Rungsimakan dan Rowan, 2014) yang ditunjukkan pada Tabel 4.2. Berdasarkan data tersebut, terdapat dua pergeseran kimia ( $\delta_{\text{C}}$ ) yang sedikit berbeda antara senyawa (**1**) dengan 3 $\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol yaitu pada C-3 (79,1 dengan 85 ppm) dan C-31 (179,8 dengan 172,4 ppm), tetapi secara keseluruhan data pergeseran kimia senyawa (**1**) memiliki kemiripan dengan data senyawa 3 $\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol, sehingga dapat disarankan bahwa senyawa (**1**) adalah 3 $\beta$ -asetoksi-lup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol.

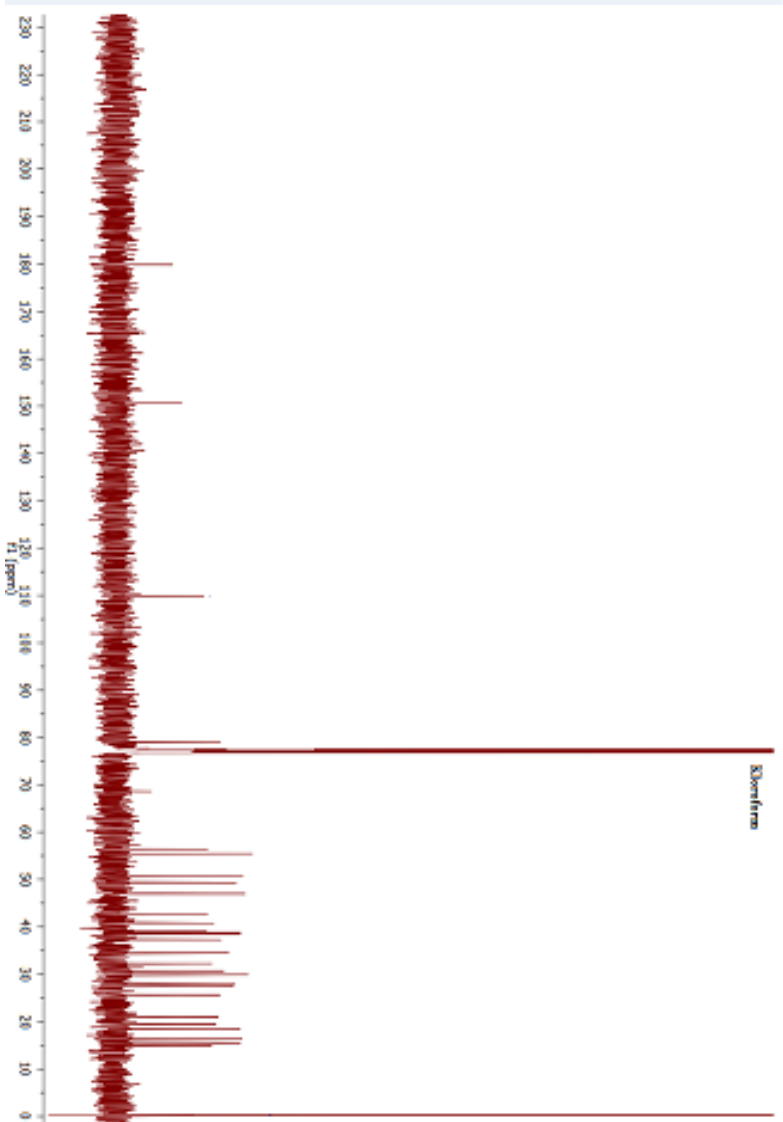
Tabel 4.1 Data  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  Senyawa (**1**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Posisi Karbon	Senyawa L2	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1	0,9 ; 2,02	49,4
2	3,18 (dd, 5; 4,7 Hz)	68,6
3	4,60 (1H, s)	79,1
4	-	38,5
5	0,88	56,4
6	1,52 ; 1,54	18,4
7	1,48	32,2
8	-	39
9	1,38	55,4
10	-	37,3
11	1,25 ; 1,57	25,64
12	1,11 ; 1,66	27,5
13	1,66	37,1
14	-	40,8
15	1,02 ; 1,63	28,1
16	1,39 ; 1,47	34,4
17	-	42,5
18	1,38	50,6
19	2,27 (d, 12,9 Hz)	47
20	-	150,5
21	1,27 ; 1,94	30,6
22	1,21 ; 1,42	38,8
23	0,82 (3H, s)	29,8
24	0,82 (3H,s)	16,2
25	0,75 (3H, s)	16,1
26	0,93 (3H, s)	15,4
27	0,93 (3H, s)	14,8
28	0,75 (3H, s)	18,4
29	4,73 (2H, s)	109,8
30	1,68 (3H,s)	19,5
31	-	179,8
32	2,19 (ddd, 9,35, 2,9 , 3,5 Hz)	20,9

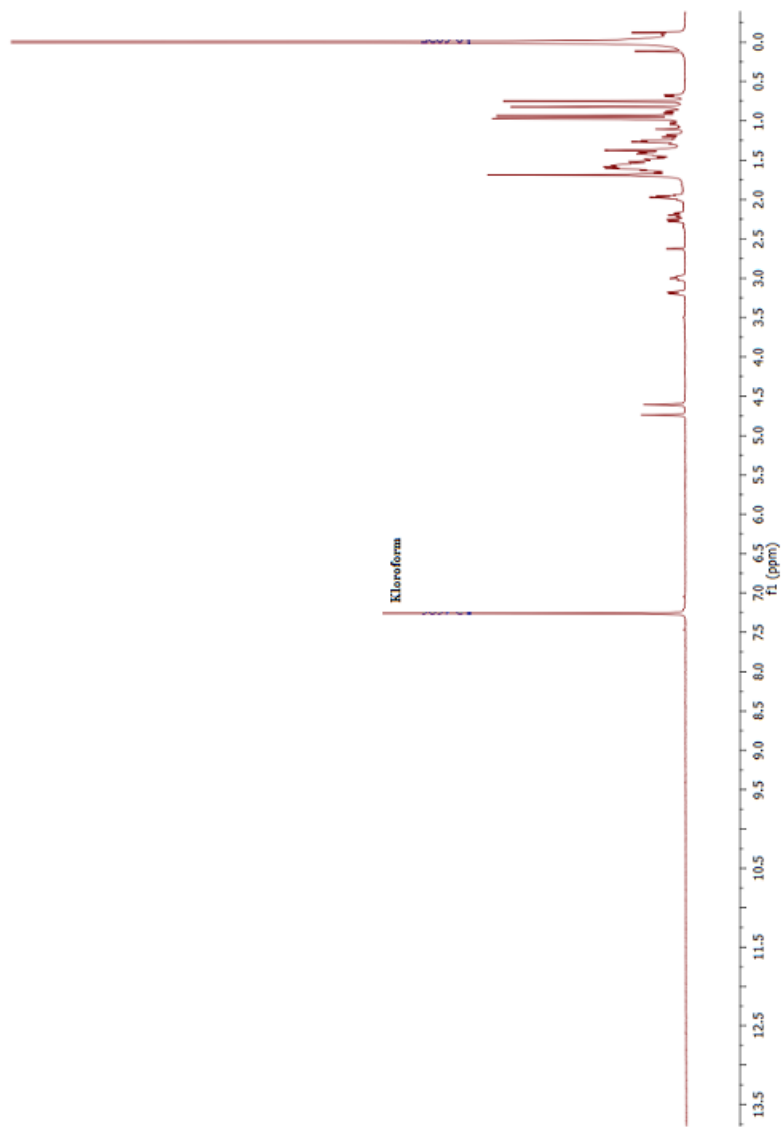


Tabel 4.2 Data Perbandingan  $^1\text{H-NMR}$  dan  $^{13}\text{C-NMR}$  Senyawa (1) dengan  $3\beta\text{-acetoxy-lup-20(29)-en-2}\alpha\text{-ol}$  (Rungsimakan dan Rowan, 2014) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Posisi Karbon	Senyawa L2		$3\beta\text{-acetoxy-lup-20(29)-en-2}\alpha\text{-ol}$	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$
1	0,9 ; 2,02	49,4	0,9 ; 2,09	48,1
2	3,18 ( <i>dd</i> , 5; 4,7 Hz)	68,6	3,77 ( <i>ddd</i> , 10,10, 5 Hz)	67,8
3	4,60 (1H, <i>s</i> )	79,1	4,46 ( <i>d</i> ,10 Hz)	85
4	-	38,5	-	39,3
5	0,88	56,4	0,88	55,3
6	1,52 ; 1,54	18,4	1,40 ; 1,50	18,3
7	1,48	32,2	1,4 (2H)	34,1
8	-	39	-	40,9
9	1,38	55,4	1,34	50,3
10	-z	37,3	-	38,4
11	1,25 ; 1,57	25,64	1,26 ; 1,43	21,1
12	1,11 ; 1,66	27,5	1,08 ; 1,68	25
13	1,66	37,1	1,65	37,9
14	-	40,8	-	42,9
15	1,02 ; 1,63	28,1	0,98 ; 1,68	27,4
16	1,39 ; 1,47	34,4	1,38 ; 1,46	35,5
17	-	42,5	-	43
18	1,38	50,6	1,36	48,2
19	2,27 ( <i>d</i> , 12,9 Hz)	47	2,37 ( <i>ddd</i> , 11, 11, 6 Hz)	48
20	-	150,5	-	150,8
21	1,27 ; 1,94	30,6	1,32 ; 1,90 ( <i>m</i> )	29,8
22	1,21 ; 1,42	38,8	1,20 ; 1,40	40
23	0,82 (3H, <i>s</i> )	29,8	0,87 (3H, <i>s</i> )	28,4
24	0,82 (3H, <i>s</i> )	16,2	0,85 (3H, <i>s</i> )	17,4
25	0,75 (3H, <i>s</i> )	16,1	0,91 (3H, <i>s</i> )	17,3
26	0,93 (3H, <i>s</i> )	15,4	1,02 (3H, <i>s</i> )	16
27	0,93 (3H, <i>s</i> )	14,8	0,94 (3H, <i>s</i> )	14,5
28	0,75 (3H, <i>s</i> )	18,4	0,78 (3H, <i>s</i> )	18
29	4,73 (2H, <i>s</i> )	109,8	4,57 ( <i>d</i> , 2,5 Hz) ; 4,68	109,4
30	1,68 (3H, <i>s</i> )	19,5	1,68 (3H, <i>s</i> )	19,3
31	-	179,8	-	172,4
32	2,19 ( <i>ddd</i> , 9,35, 2,9, 3,5 Hz)	20,9	2,13 (3H, <i>s</i> )	21



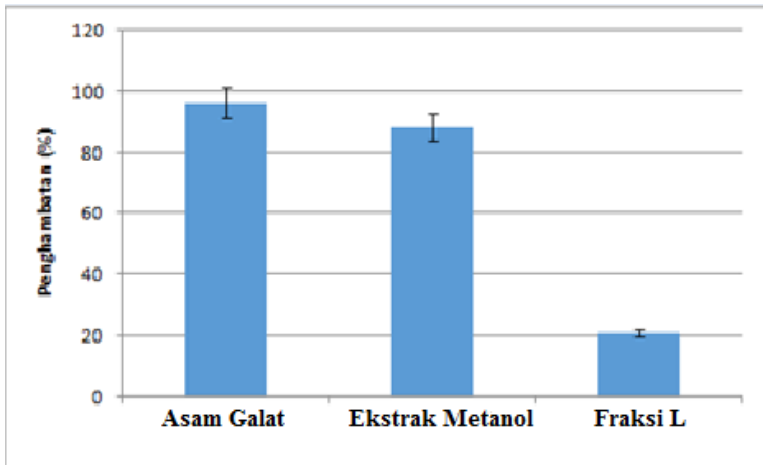
Gambar 4.29 Spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$  Senyawa (**1**)

Gambar 4.30 Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  Senyawa (**1**)

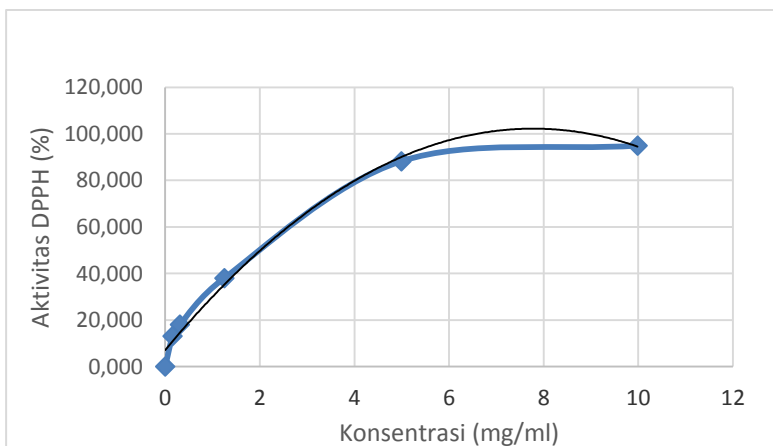
#### 4.4 Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Sonneratia ovata* Backer dan fraksi L

Asam galat (Asam 3,4,5-trihidroksibenzoat) digunakan sebagai kontrol positif, dimana senyawa ini ditemukan pada daun ek dan anggur yang memiliki aktivitas antioksidan. Uji DPPH ini dilakukan dengan menambah 33  $\mu\text{L}$  ekstrak dengan 1 mL larutan DPPH yang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selama reaksi antara DPPH dengan antioksidan, larutan DPPH yang awalnya berwarna ungu akan berubah menjadi berwarna kuning. Hal tersebut karena terjadinya donor radikal hidrogen dari senyawa antioksidan ke DPPH. Reaksi tersebut menyebabkan adanya delokalisasi elektron pada DPPH sehingga terjadi penurunan absorbansi larutan yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  515 nm.

Hasil prosentase penghambatan radikal DPPH pada ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer yaitu sebesar  $88,35 \pm 0,002$  dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  dari ekstrak metanol sebesar  $4,73 \mu\text{g/mL}$ .  $\text{IC}_{50}$  yaitu konsentrasi minimum sampel untuk bisa menghambat radikal DPPH sebanyak 50 %. Jika dibandingkan dengan kontrol positif, dimana prosentase penghambatan asam galat sebesar 96,41% dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar  $2,01 \mu\text{g/mL}$  (Gambar 4.30). oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol dari kulit batang *Sonneratia ovata* Backer memiliki bioaktivitas antioksidan yang cukup tinggi karena nilai  $\text{IC}_{50}$ nya tidak berbeda jauh dengan kontrol positif. Setelah dilakukan isolasi senyawa (**1**) dari fraksi L, maka dilakukan uji aktivitas antioksidan pada fraksi L, yang memungkinkan memiliki senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Hasil fraksi L2 memiliki prosentase penghambatan sebesar  $20,91 \pm 0,006\%$ . Hal itu menunjukkan bahwa fraksi L dan senyawa L2 aktivitas antioksidannya kurang aktif, sehingga tidak memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  (Gambar 4.29).



Gambar 4.31 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Asam galat (kontrol positif), Ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer dan fraksi L dengan konsentrasi 319,46  $\mu\text{g/mL}$



Gambar 4.32 Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari asam galat (Kontrol +) dengan memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  dari ekstrak metanol sebesar 2,01  $\mu\text{g/mL}$

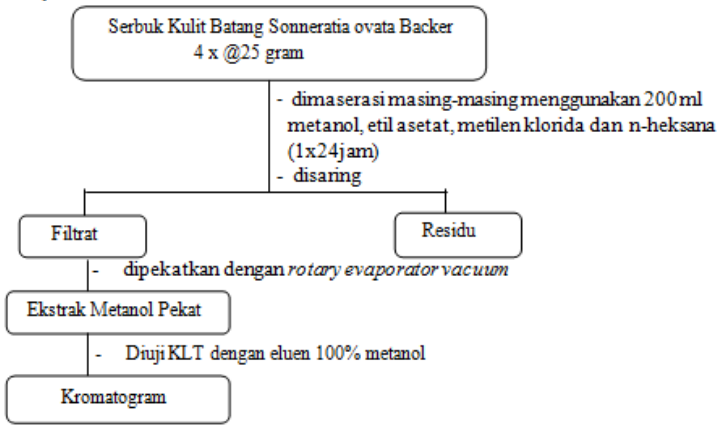


“Halaman ini sengaja dikosongkan”

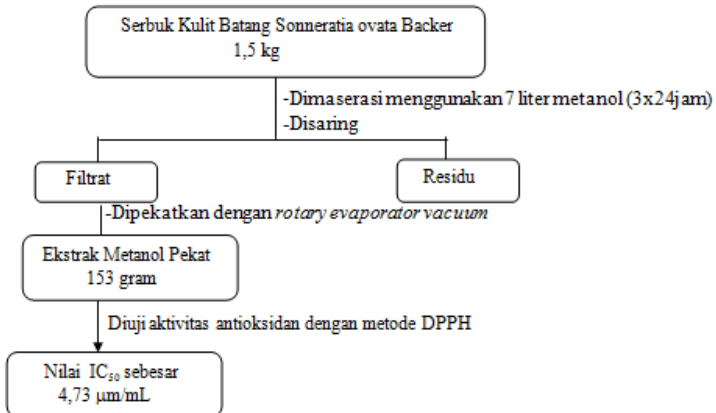
## LAMPIRAN

### SKEMA KERJA

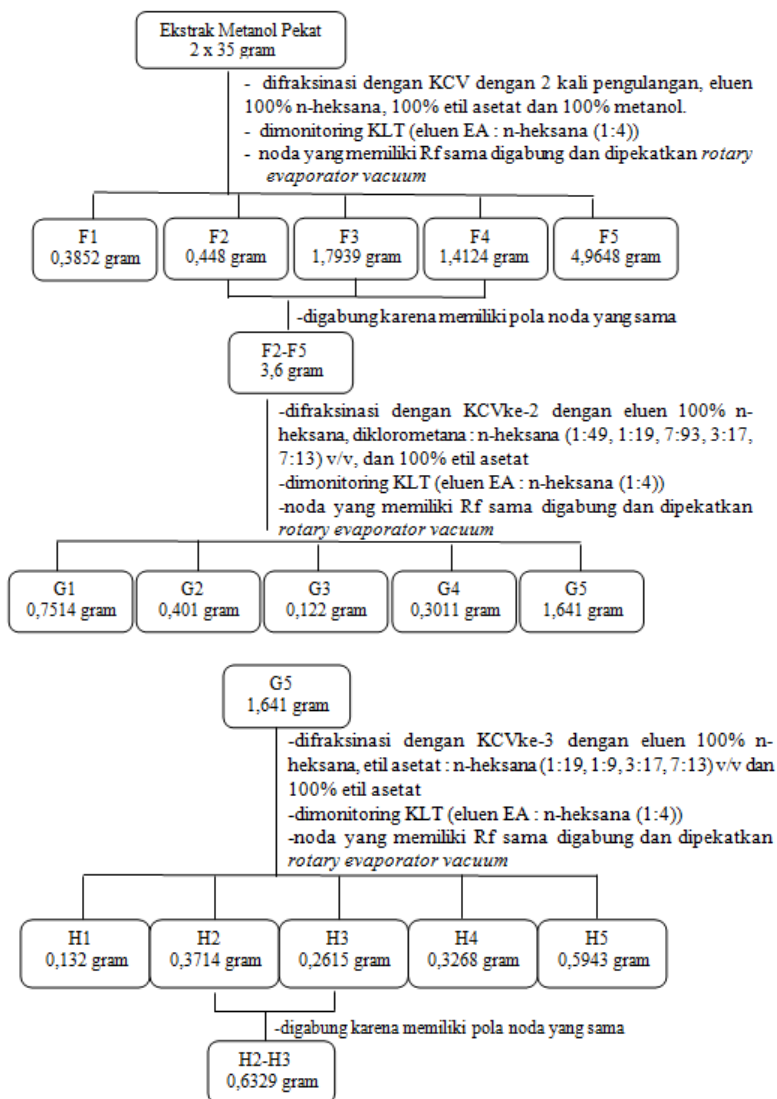
#### 1. Uji Pendahuluan

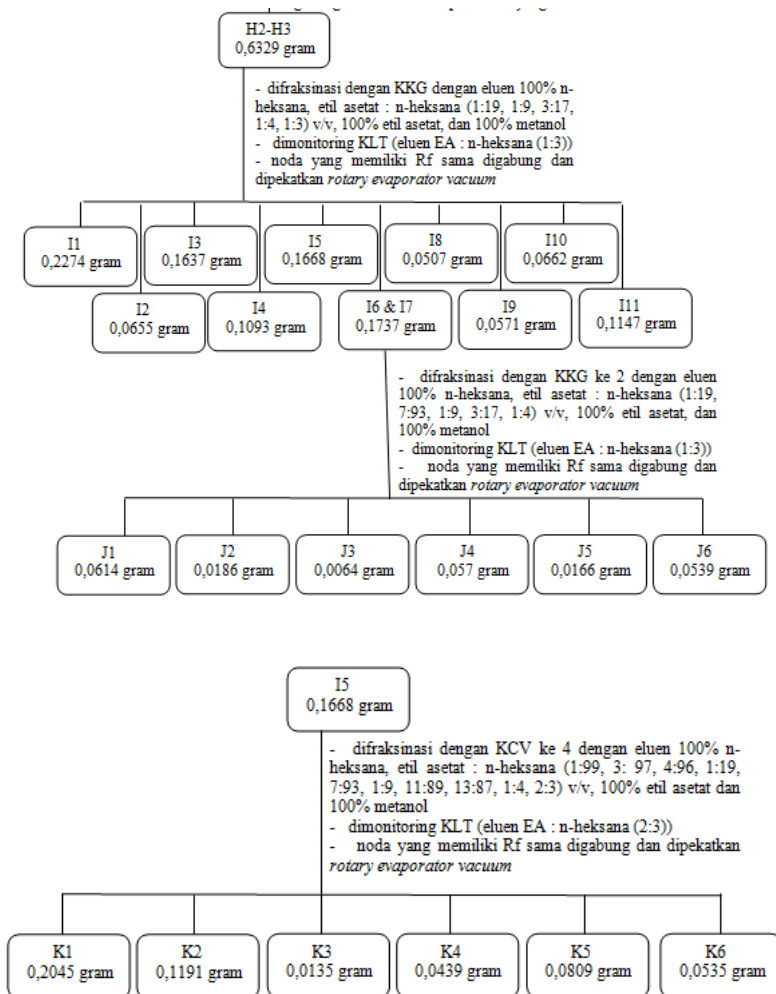


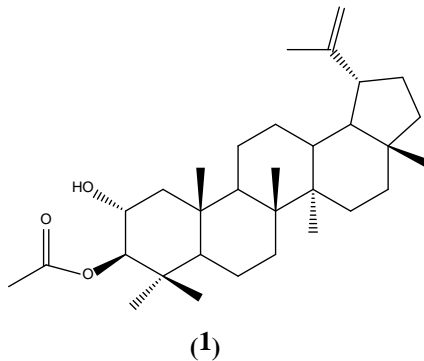
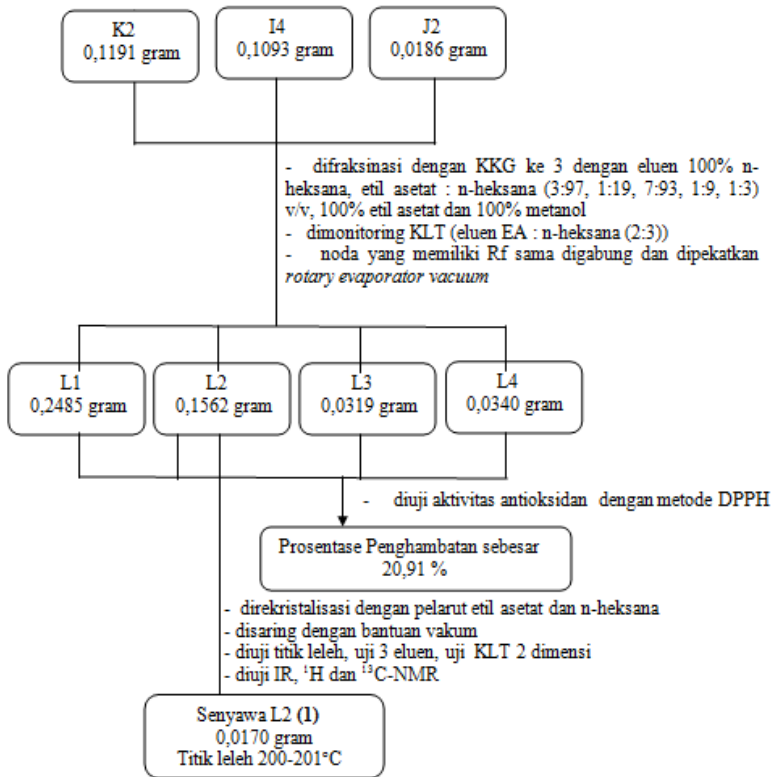
#### 2. Ekstrak Kulit Batang *Sonneratia ovata* Bacter



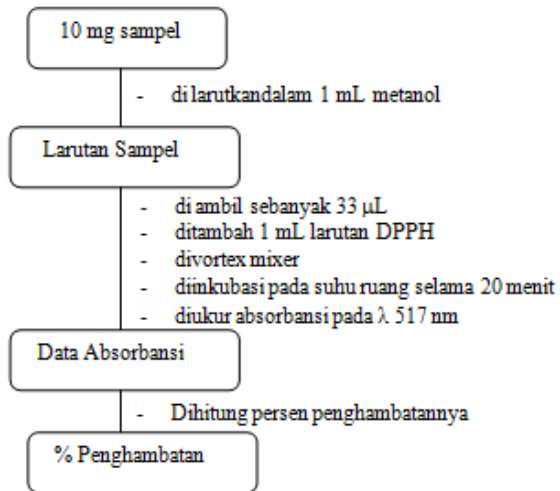
### 3. Isolasi Senyawa dari Kulit Batang *Sonneratia ovata* Backer







## 4. Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH



- ❖ Larutan Blanko : 33 µL metanol + 1 mL larutan DPPH
- ❖ Kontrol Positif : Asam Galat

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## BAB V

### KESIMPULAN

#### 5.1 Kesimpulan

Senyawa metabolit sekunder triterpenoid yaitu 3 $\beta$ -asetoksilup-20(29)-en-2 $\alpha$ -ol (**1**) berhasil diisolasi dari ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku. Senyawa (**1**) berupa serbuk warna putih dengan titik leleh 200-201°C. Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dari ekstrak metanol memiliki IC<sub>50</sub> sebesar 4,73  $\mu$ g/mL, sedangkan fraksi dari senyawa (**1**) hanya memiliki prosentase penghambatan 20,91  $\pm$  0,006 %, sehingga dapat disimpulkan senyawa (**1**) hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang kurang aktif.

#### 5.2 Saran

Penelitian dilakukan lebih lanjut untuk isolasi senyawa yang aktif sebagai antioksidan karena ekstrak metanol dari *Sonneratia ovata* Backer memiliki bioaktivitas antioksidan yang tinggi berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>. Oleh karena itu, masih ada peluang ditemukannya senyawa lain yang aktif sebagai antioksidan.



“Halaman ini sengaja dikosongkan”

## DAFTAR PUSTAKA

- Abheri, D., Mallick, A., Ghos, A. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: A overview. *International Journal of Pharma Science and Research* , 1(3), 185-192.
- Baser, K. H., Buchbauer, G. (2010). *Handbook Of ESSENTIAL OILS Science, Technology, and Applications*. New York: CRC Press.
- Bendra, A. (2012). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Premna oblongata Miq. dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif. *Prosiding Tugas Akhir* .
- David, H. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. United State : The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Ernst, K. (2004). *Introduction to Chromatography*. Vienna: Institute for Analytical Chemistry, University of Vienna.
- Goeswin, A. (2007). *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Goutham-Bharathi, M., Kaliyamoorthy, M., Dam Roy, S., Krishnan, P., George, G., Murugan, C. (2012). *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae)—A New Distributional Record for India from Andaman and Nicobar Islands. *Taiwania*, 57(4), 406-409.
- Guebas F., D. (2015). WoRMS (World Register of Marine Species). *Sonneratia ovata* Backer , <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=235111>.

- Harbone, J. (1987). *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua*. Bandung: ITB Press.
- Hardjosudirdjo, W. (1991). *Kimia Organik Untuk Universitas*. Yogyakarta: FMIPA UGM.
- Hou, W., Li, Y., Zhang, Q., Wei, X., Peng, A., Chen, L., Wei, Y. (2009). Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. *Phytotherapy Research*, 23(5), 614-618.
- Jariyah, Widjanarko, S. B., Yunianta, Estiasih, T. (2014). Hypoglycemic effect of Pedada (*Sonneratia caseolaris*) Fruit. *International Journal of Pharm Tech Research*, 7(1), 31-40.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., Kurniadi, B. (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Manitto. (1992). *Biosintesis Produk Alami*. Semarang: Semarang Press.
- Mao, L., & Foong, S. Y. (2013). Tracing ancestral biogeography of *Sonneratia* based on fossil pollen and their probable modern analogues. *Palaeoworld*, 22, 133-143.
- Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable free radical diphenylpicryl-hidrazyl (DPPH) for Estimating antioxidant activity. *Journal Science Technology*, 26, 211-219.
- Nguyen, T.-H.-T., Pham, H.-V.-T., Pham, N.-K.-T., Quach, N.-D.-P., Pudhom, K., Hansen, P. E., Nguyen, K.-P.-P. (2015). Chemical constituents from *Sonneratia ovata* Backer and their. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 2366-2371.

- Oxtoby. (2003). *Prinsip-Prinsip Kimia Modern Edisi Keempat Jilid 2*. Jakarta: Erlangga.
- Pavia, D., dan Knitz, J. (1990). *Introduction to Organic Laboratory Techniques, a Contemporary Approach* (Edisi Kedua). New Year: Saunders College Publishing.
- Qin, H., Graham, S., dan Gilbert, M. (2007). Saint Louis: Science Press, Beijing and Missouri Garden Press.
- Ricard, J. C. (1998). *Natural Products Isolation*. New Jersey: Humana Press.
- Rouessac, F., Rouessac, A. (1994). *Chemical Analysis "Modern Instrumentation Methods and Techniques"* Second Edition. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Rungsimakan, S., Rowan, M. G. (2014). Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*, 108, 177-188.
- Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ohtsuki, T., Ishibashi, M. (2006). Flavonoids from *Sonneratia caseolaris*. *Journal Natural Medicine*, 60, 264-265.
- Sastrohamidjojo, H. (1994). *Spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (NMR)*. Yogyakarta: Liberty.
- Schaich, K. M., Tian, X., Xie, J. (2015). Hurdles and Pitfalls in measuring Antioxidant Efficacy : A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Fuctional Foods* , 14, 111-125.
- Shahlaei, M., Ghanadian, S. M., Ayatollahi, A. M., MESAİK, A. M., Abdalla, O. M., Afsharypour, S., Rabbani, Mohammed. (2013). Molecular modeling, structure activity relationship and immunomodulatory properties of some lupeol derivatives. *Medicinal Chemistry Research* , 22, 1795-1803.

- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th ed.* USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Supratman, U. (2010). *Elucidasi Struktur Senyawa Organik.* Bandung: Widya Padjadjaran.
- Tiwari, A. K., Viswanadh, V., Gowri, P. M., Ali, A. Z., Radhakrishnan, S., Agawane, S. B., Madhusudana, K., Rao, Janaswamy M. (2010). Oleanolic acid - an a-Glucosidase inhibitory and antihyperglycemic active compound from the fruits of *Sonneratia caseolaris*. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 1(1), 19-23.
- Underwood, A. (1986). *Analisa Kimia Kuantitatif Edisi Kelima.* Jakarta: Erlangga.
- Wu, S.-B., Wen, Y., Li, X.-W., Zhao, Y., Hu, J.-F. (2009). Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 1-5.
- Zhang, C. (2007). *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Surabaya, 25 Mei 1994 dengan nama lengkap Fatmawati Inneke Putri sebagai anak kedua dari pasangan Bapak Sulhan Syah Sulaiman dan Ibu Soelikhah dengan satu orang kakak yaitu Pertiwi Putri Sulaiman. Pendidikan formal yang telah ditempuh oleh penulis, yaitu di TK DARUSSALAM Sepanjang, SD DAPENA Surabaya, SMP DAPENA 1 Surabaya dan SMA TRIMURTI Surabaya. Setelah lulus dari SMA TRIMURTI Surabaya, penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Kimia, FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya melalui jalur SNMPTN Tulis pada tahun 2012 dengan NRP 1412100089. Selama menempuh pendidikan di ITS, penulis aktif dalam organisasi dan kegiatan tingkat jurusan, fakultas dan institut. Penulis pernah menjabat sebagai Staff DAGRI Himpunan Mahasiswa Kimia 2013/2014 dan Bendahara Umum Himpunan Mahasiswa Kimia 2014/2015. Penulis pernah menempuh kerja praktik di MSD (Merck Sharp Dohme) Pharma Tbk. Pandaan periode Juli-Agustus 2015. Penulis menyelesaikan studi di Jurusan Kimia FMIPA ITS dengan mengambil Tugas Akhir di bidang Kimia Bahan Alam dan Sintesis dengan judul “Isolasi Senyawa Antioksidan dari Tumbuhan Maluku (*Sonneratia ovata* Backer” dengan dosen pembimbing Prof. Dr. Taslim Ersam dan Sri Fatmawati, M.Sc., Ph.D. Penulis dapat dihubungi melalui email: [fatmawati.inneke@yahoo.com](mailto:fatmawati.inneke@yahoo.com).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”