IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Senyawa Fenolik

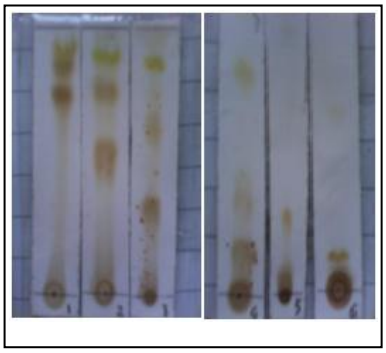
Dari penelitian ini telah berhasil diisolasi senyawa flavonoid murni dari kayu akar tumbuhan kenangkan yang diperoleh dari Desa Keputran Sukoharjo Kabupaten Tanggamus.

Kayu akar tumbuhan kenangkan yang diambil dibersihkan, kemudian dicacah dan dikeringkan. Kayu akar tersebut kemudian dihaluskan dan setelah itu sebanyak 3065 gram serbuk halus kulit batang tersebut dimaserasi. Maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi atau pemisahan senyawa yang dilakukan dengan cara merendam sampel menggunakan suatu pelarut tertentu yang sesuai. Pada penelitian ini dari 3065 gram sampel dibagi ke dalam 300 gram untuk satu tahap maserasi, sehingga ada 10 tahap maserasi. Perendaman untuk satu tahap maserasi selama 24 jam dengan tiga kali pengulangan. Maserasi menggunakan pelarut metanol, pemilihan pelarut ini dikarenakan senyawa fenolik merupakan senyawa polar, sehingga untuk mengekstrak senyawa polar diperlukan pelarut yang juga polar. Kemudian menyaring dan menguapkan hasil ekstraksi menggunakan penguap putar vakum pada suhu 45-50˚C dengan laju putaran 120-150 rpm.

Dari proses penguapan dengan alat penguap putar vakum ini menghasilkan ekstrak metanol sebanyak 143 gram. Kemudian ekstrak kasar ini dilihat pola pemisahan komponene-komponen senyawanya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan empat kali dengan eluen yang berbeda , eluen yang digunakan untuk KLT ini adalah diklorometan, *n*-heksana, metanol dan etilasetat dengan fasa diam Silika Gel Merck 60 GF254 0,25mm.

Gambar 7. Kromatogam KLT dengan eluen (a) *n*-heksana, (b) etilastat, (c) metanol, (d) diklorometan.

Melihat dari pola pemisahan KLT menggunakan eluen murni tersebut, maka dilakukan penggabungan eluen untuk mendapatkan pola pemisahan yang baik, yaitu gabungan antara *n*-heksana/etiasetat.

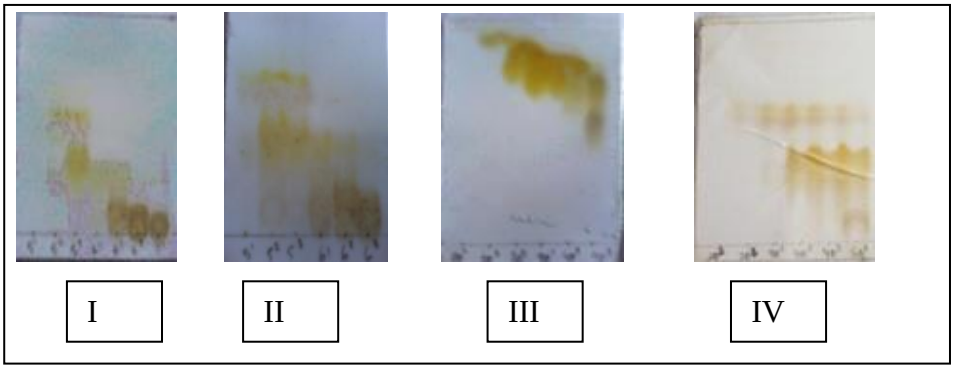


Gambar 8. Kromatogram KLT dengan eluen (1) etilasetat/*n*-heksana 90%, (2) etilasetat/ *n*-heksana 70%, (3) etilasetat/ *n*-heksana 60%, (4), etilasetat/ *n*-heksana 50%, (5) etilasetat/*n*-heksana 30%, (6) etilaseta/*n*-heksana 10%

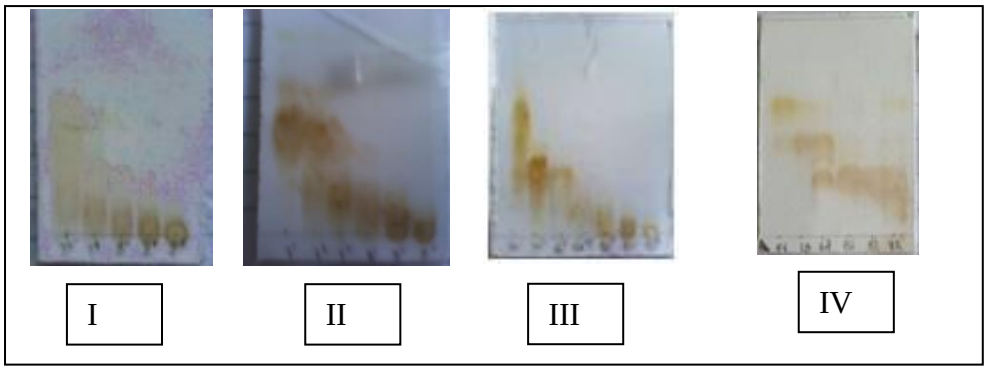
Selanjutnya, untuk pemisahan senyawa-senyawa ini digunakan teknik kromatografi cair vakum (KCV). Sebanyak 143 gram ekstrak kasar metanol kemudian difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dengan cara membagi menjadi 4 tahap, dikarenakan keterbatasan alat KCV yang tidak dapat menampung keseluruhan sampel. Pada tiap tahapan tersebut sampel dijerapkan pada silika gel Merck (35-70 Mesh), setelah itu difraksinasi menggunkan KCV dengan eluen etilasetat/ *n*-heksana (0-100%).

KCV tahap pertama menggunakan 30 gram ekstrak kasar kering, KCV tahap kedua 22 gram, KCV tahap ketiga menggunakan 34 gram dan KCV tahap keempat menggunakan 57 gram. Proses KCV pada tahap I dihasilkan 12 fraksi yang disederhanakan menjadi 3 fraksi utama yaitu A1 non polar (5.2- 6.2), B1 (6.3-7.2), C1 (7.3- 8.3). Proses KCV pada tahap II dihasilkan 12 fraksi yang selanjutnya disederhanakan menjadi 3 fraksi utama yaitu A2 non polar (5.2- 6.2), B2 (6.3- 7.2), C2 (7.3- 8.3) . Untuk tahap III dihasilkan 13 fraksi yang disederhanakan menjadi 3 fraksi utama yaitu A3 non polar (20.1- 40.3), B3 (60.1-

60.3), C3 (60.4- 80.3). Untuk KCV tahap IV diperole 12 fraksi yang kemudian disederhanakan menjadi 3 fraksi utama yaitu A4 non polar (20.3- 60.3), B4 (80.1-80.3) dan C4 (80.4). Setelah fraksinasi, selanjutnya adalah mengidentifikasi hasil fraksinasi dengan KLT menggunakan eluen etil asetat/*n*-heksana. Kromatogram hasil KCV tahap I –IV (Gambar 9 dan Gambar 10)



Gambar 9. Kromatogram KLT dari KCV tahap I-IV dengan eluen etilasetat/ *n*-heksana 30%



Gambar 10. Kromatogram KLT dari KCV tahap I-IV dengan eluen etilasetat/*n*-heksana 60%

Kemudian berdasarkan hasil KLT dari KCV tahap I-IV fraksi-fraksi polar yang memiliki nilai Rf sama digabungkan yang menghasilkan 2 fraksi utama yaitu D (gabungan fraksi B1, B2, B3 dan B4) dan P(gabungan fraksi C1, C2, C3 dan C4).

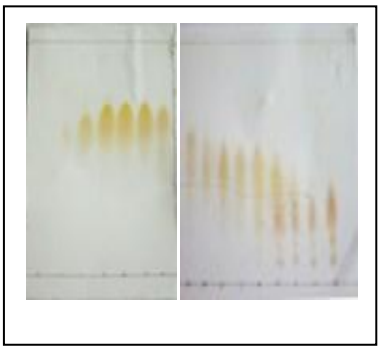
Tahap pemisahan selanjutnya lebih diutamakan pada fraksi yang lebih polar yaitu fraksi utama P sebanyak 6,6 gram. Setelah dilakukan sebanyak 3 kali tahap fraksinasi terhadap fraksi utama ini menggunakan eluen etil asetat/diklorometana (0% - 100%), etil asetat/diklorometana (0%-100%), etil asetat/diklorometana (0%-25%), dan dianalisis KLT,hasil analisis KLT memperlihatkan noda komponen senyawa yang masih banyak tetapi persedian sampel tinggal sedikit, sehingga fraksi utama P tidak difraksinasi lebih lanjut. Pencarian senyawa fenolat selanjutnya dikerjakan terhadap fraksi utama D.

Fraksi D sebanyak 14,13 gram dilakukan fraksinasi menggunakan KCV dengan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-40%), yang menghasilkan 7 fraksi (Gambar 11), dari hasil kromatogram KLT mengasilkan 2 fraksi utama yaitu D1 (7-9) dan fraksi D2 (10-12)

Gambar 11. Kromatogram KLT dari KCV fraksi D, menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana 50%

Selanjutnya pemurnian dilakukan pada fraksi utama D2 sebanyak 0,88 gram, teknik pemisaha digunakan KKG dengan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-30%), yang menghasilkan 15 fraksi (Gambar 12) berdasarkan kromatogram KLT

menghasilkan 3 fraksi utama yaitu fraksi D2.1(D2-D7), D2.2(D8-D12), D2.3(D13-D16)



Gambar 12. Kromatogram KLT dari KKG fraksi utama D2 menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana 50%.

Pemurnian selanjutnya dilakukan pada fraksi D2.3 yaitu sebanyak 0,26 gram. Setelah dilakukan sebanyak 3 kali tahap fraksinasi terhadap fraksi utama ini menggunakan eluen etil asetat/*n*-heksana (0% - 60%), etil asetat *n*-heksana (0%-60%), etil asetat/*n*-heksana (0%-30%), dan dianalisis KLT,hasil analisis KLT memperlihatkan noda komponen tidak Nampak pada UV maupun dengan penampak bercak dan persedian sampel tinggal sedikit, sehingga fraksi utama D2.3 tidak difraksinasi lebih lanjut. Pencarian senyawa fenolat selanjutnya dikerjakan terhadap fraksi utama D2.1.

Proses pemurnian selanjutnya dilakukan terhadap fraksi D 2.1 yaitu sebanyak 0.254 gram, dan dilakukan KKG menggunakan eluen etilasetat/heksana (0-30%) yang menghasilkan 11fraksi, berdasarkan KLT dari 11 fraksi tersebut memiliki nilai Rf sama sehingga digabungkan (D 2.1.1) dan di lakukan KKG kembali yaitu sebanyak 0,25 gram menggunakan eluen etilasetat/heksana (0-30%) berdasarkan KLT menghasilkan 6 fraksi (Gambar 13) kemudian fraksi tersebut digabungkan

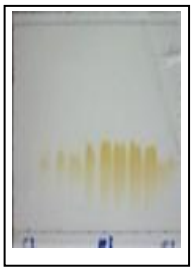
(D 2.1.1.1) karena memiliki pola KLT yang sama, dan proses pemurnian dihentikan karena jumlahnya tinggal sedikit, pemurnian selanjutnya dilakukan terhadap fraksi D 1.

Gambar 13. Kromatogram dari KLT D 2.1.1 menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana 30%

Pemurnian selanjutnya dilakukan terhadap fraksi D 1 yaitu sebanyak 0,43 gram, dan dilakukuan KKG menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-30%) yang menghasilkan 8 fraksi dari fraksi 3 menghasilkan kristal jarum kemudian kristal didekantasi dan ditimbang diperoleh kristal yang belum murni dengan berat 0,25 gram. Filtrat hasil dekantasi kemudian dilakukan pemurnian lebih lanjut yaitu sebanyak 0,36 gram sampel dilakukan 2 kali KKG yaitu menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-30%),etilasetat/*n*-heksana (0-20%) kemudian dianalisis menggunakan KLT dan menghasilkan 3 fraksi (Gambar 14) yang memiliki pola KLT sama sehingga ketiga fraksi tersebut digabungkan, pemurnian selajutnya dilakukan terhadap kristal jarum (KI)

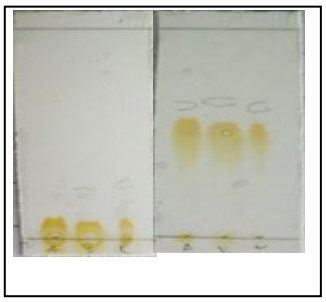
Gambar 14. Kromatogram dari KLT fraksi D 1.1.2 menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana 30%

Pemurnian selajutnya dilakukan terhadap fraksi KI sebanyak 0,25 gram dilakukan 2 kali KKG menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-25%),etilasetat/*n*-heksana (0-20%) kemudian dianalisis menggunakan KLT diperoleh 9 fraksi (gambar 13) kemudian digabungkan karena memiliki pola KLT yang sama.



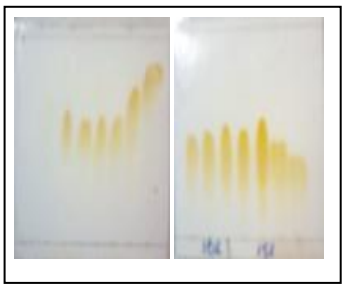
Gambar 15. Kromatogram dari KLT fraksi KI menggunakan eluen etilasetat/heksana 25%.

Selanjutnya pemurnian dilakukan terhadap fraksi gabungan antara fraksi KI, D1.1.2, dan D 2.1.1 karena berdasarkan analisis KLT menggunakan beberapa eluen berbeda memiliki pola KLT yang sama (Gambar 16).



Gambar 16. Kromatogram dari fraksi gabungan menggunakan 2 eluen yang berbeda (A) eluen etilasetat/benzena 70%, (B) eluen etilasetat/*n*-heksana 25%

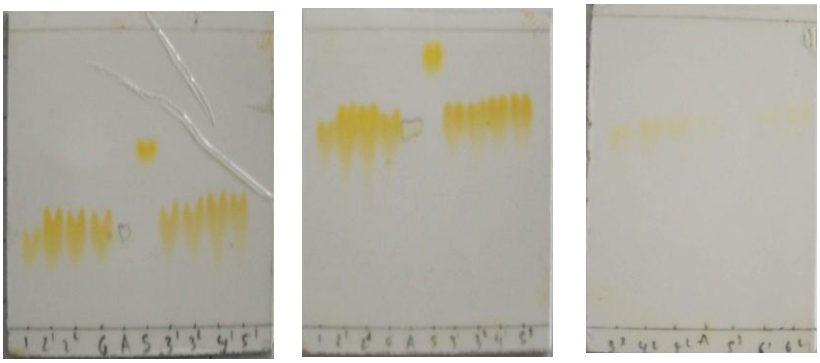
Selanjutnya fraksinasi dilakukan terhadap fraksi gabungan (G1) yaitu sebanyak 0,375 gram dilakukan KKG menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana (0-20%) yang menghasilkan 13 fraksi (Gambar 17) dimana pada fraksi 7dan 8 menghasilkan Kristal berbentuk jarum (G2), kemudian didekantasi dan dipeoleh kristal sebanyak 0,029 gram.



Gambar 17. Kromatogram dari KLT fraksi G1 menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana 30%

Selanjutnya pemurnian dilakukan terhadap G2 yang digabungkan dengan Kristal dari fraksi nonpolar karena memiliki pola KLT sama yaitu sebanya 0,3749 gram Dilakukan KKG menggunakan eluen etilasetat/*n*-heksana (5-30%) menghasilkan 11 fraksi dimana pada fraksi 1-6 menghasilkan Kristal berwarana kuning pucat

yang dianggap murni karena dari analisis KLT menunjukan satu spot (Gambar 18), Kristal yang dihasilkan seberat 0,167 gram (167 mgram).



a b c

Gambar 18. Kromatogram KLT dari standar artokarpin,standar sikloartokarpin dan kristal G 3.1 sampai G 3.6 dengan eluen (a) etilasetat/*n*-heksana 30%, (b) eluen etil asetat/diklorometana 20% (c) etilasetat/diklorometana 20%

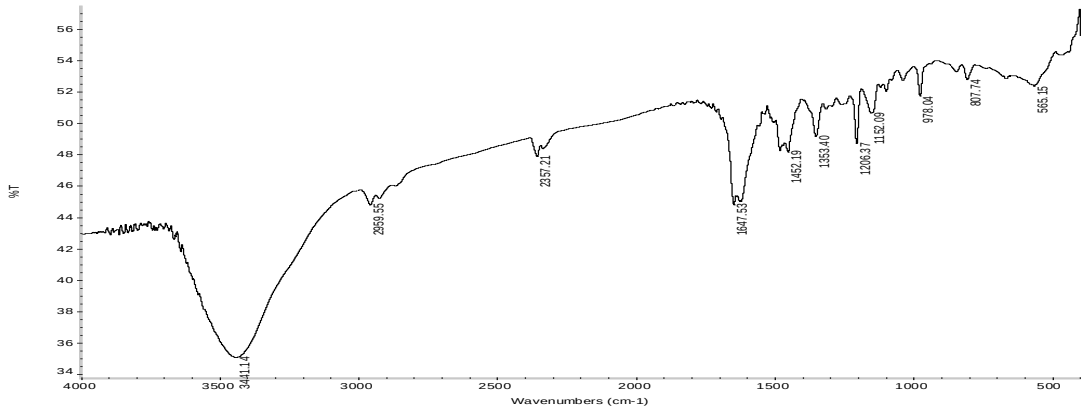
B. Penentuan Titik Leleh

Setelah dilakukan tahap pemurnian dan dari analisis KLT diketahui bahwa senyawa padatan yang diperoleh sama untuk setiap fraksi gabungan (G 3.1 sampai G 3.6) yaitu sebanyak 0,167 gram, selanjutnya dilakukan penentuan sifat fisik senyawa hasil isolasi. Sifat fisik yang ditentukan adalah titik leleh senyawa, dari hasil pengukuran menggunakan pengukur titik leleh Fisher-Johns yang tidak dikoreksi diketahui bahwa padatan yang diperoleh memiliki titik leleh 205ºC-206,6 ºC.

C. Analisis Spektrometri

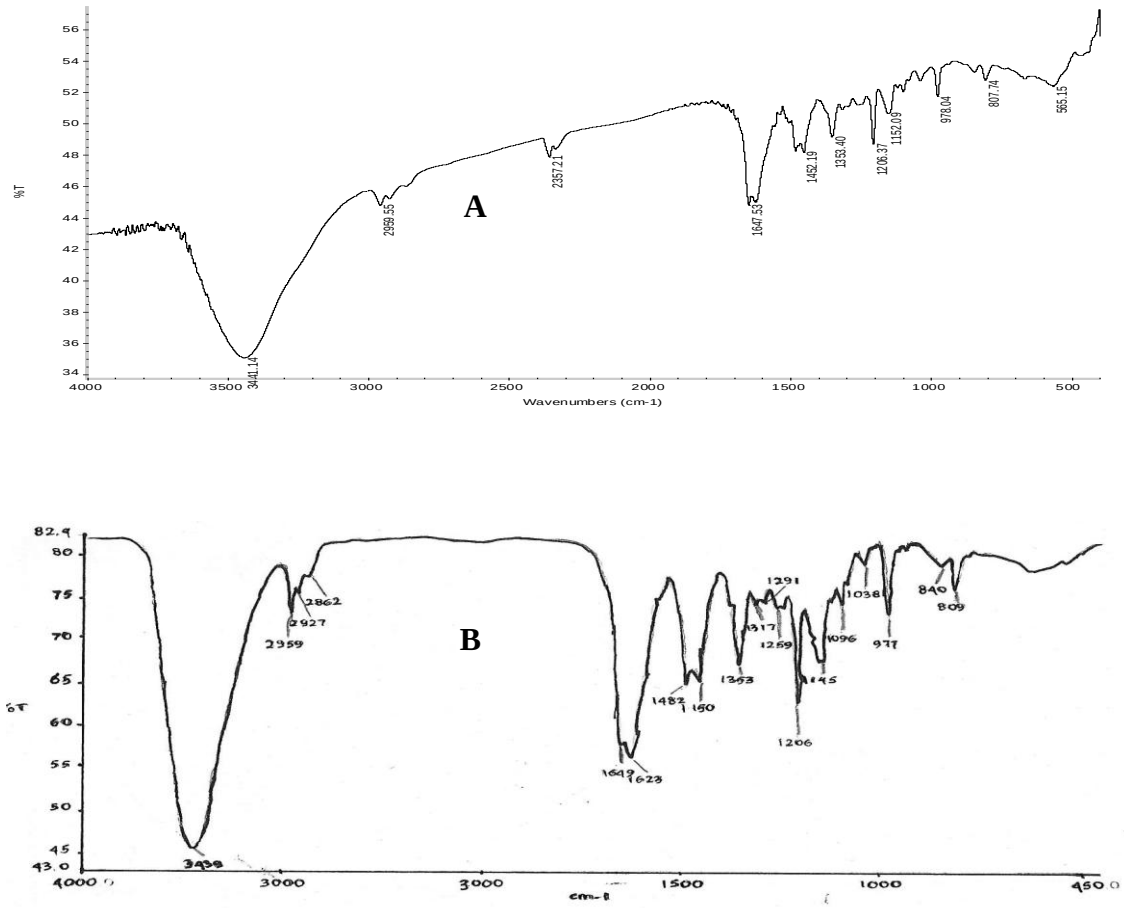
1. Analisis Spektrometri Infrared (IR)

Data hasil analisis spektrometri infrared senyawa hasil isolasi menunjukkan ada pita lebar pada bilangan gelombang 3200-3500 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen. Asumsi ini didukung dengan munculnya puncak serapan pada bilangan gelombang 1209, 1175 dan 1148 cm^{-1} yang menunjukkan uluran ikatan C-OH, munculnya puncak serapan pada bilangan gelombang 1355 dan 1298 cm^{-1} menunjukan uluran ikatan C-O-C. Puncak serapan pada bilangan gelombang 1487 cm^{-1}, dan 1450 cm^{-1} menunjukkan uluran C=C aromatik, hal ini diperkuat dengan adanya serapan C-H aromatik pada bilangan gelombang 850-449 cm^{-1}. Jika diperhatikan pada spektrum, terdapat serapan pada 1626 dan 1582 cm^{-1} yang merupakan serapan C=C alkena. Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi.

Spektrum IR senyawa hasil isolasi dari kayu akar tumbuhan kenangkan menunjukkan adanya kemiripan dengan spektrum senyawa artokarpin standar. Perbandingan spektrum IR senyawa hasil isolasi dengan standar dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Perbandingan spektrum IR (A) senyawa hasil isolasi, (B) senyawa artokarpin standar

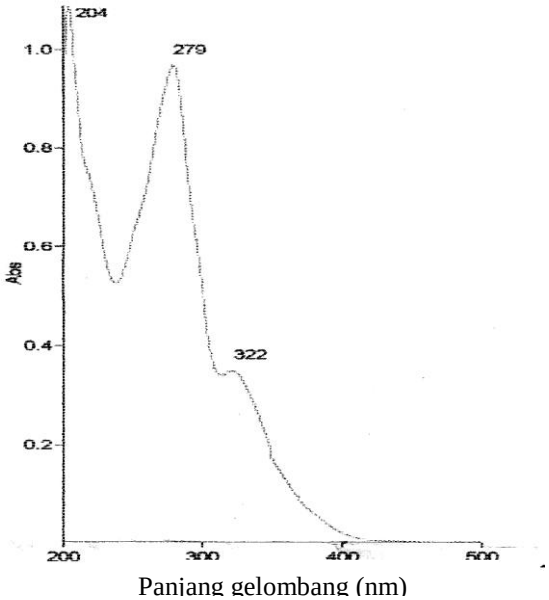
2. Analisis Spektrometri Ultraviolet-Tampak

Senyawa flavonoid mempunyai sistem karbonil yang berkonjugasi dengan cincin aromatik, sehingga senyawa ini menyerap sinar pada panjang gelombang tertentu di daerah ultraungu.Senyawa flavon mempunyai serapan di daerah UV pada dua panjang gelombang, yaitu sekitar 310-350 nm pada pita I dan sekitar 250-280 nm

pada pita II (Markham, 1988). Struktur dasar kerangka flavon dapat dilihat pada Gambar 21.

Gambar 21. Kerangka dasar flavon

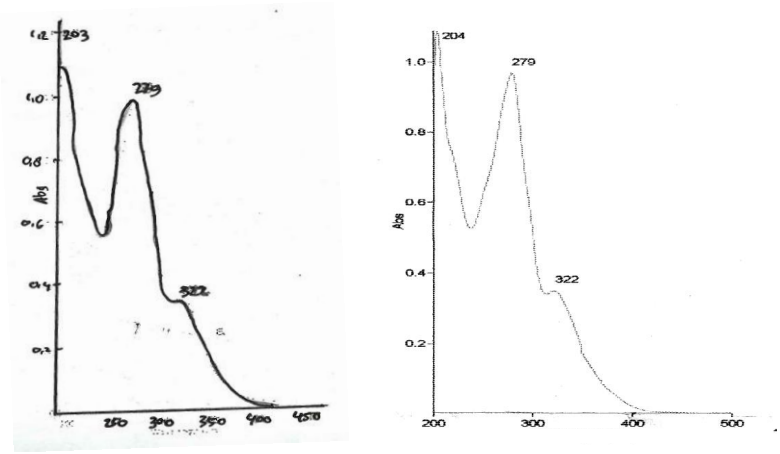
Analisis UV dari kristal kristal G 3 hasil isolasi dari kayu akar *A. rigida* yang dilakukan dilaboratorium kimia Institut Teknologi Bandung (ITB) memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 208 nm, λ_{maks} 280 nm, dan λ_{maks} 322 nm dalam pelarut metanol (MeOH) (Gambar 22).



Gambar 22**.** Spektrum UV senyawa hasil isolasi G 3 dalam MeOH

Spektrum UV senyawa fenolik hasil isolasi dari kayu akar tumbuhan kenangkan menunjukkan adanya kemiripan dengan spektrum senyawa artokarpin standar.

Perbandingan spektrum UV senyawa fenolik tersebut dapat dilihat pada Gambar 23.

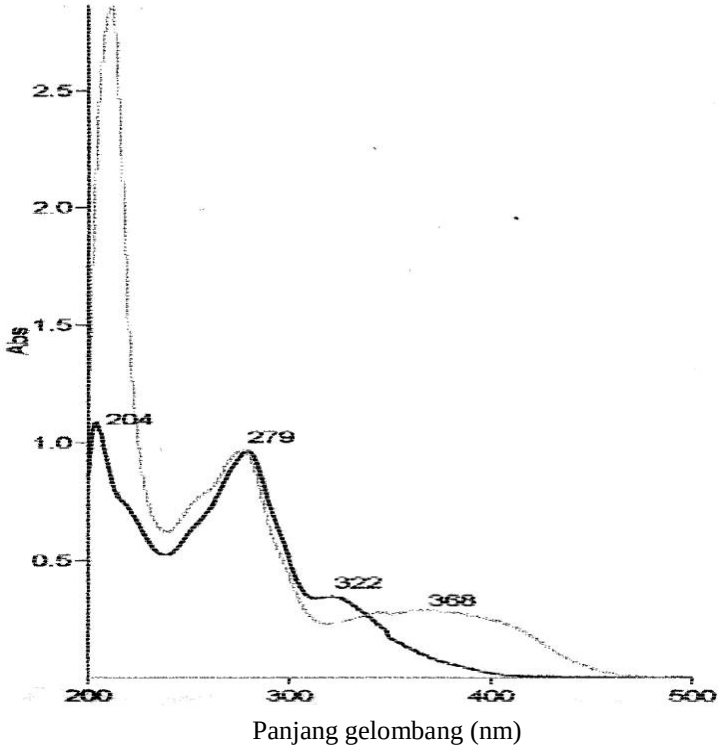


A B

Gambar 23. Perbandingan spektrum UV (A) standar artokarpin dan (B) senyawa hasil isolasi

Penambahan pereaksi geser dapat digunakan untuk menentukan posisi gugus hidroksil fenol dengan cara mengamati pergeseran puncak pada spektrum UV. Pereaksi geser Natrium hidroksida (NaOH) digunakan untuk mendeteksi adanya kerangka fenolat. Adanya pergeseran batokromik pada pita I menunjukkan adanya gugus hidroksil pada posisi $C_{4'}$, atau gugus hidroksil tersubstitusi orto-hidroksi pada cincin A (Markham dan Andersen, 2006).

Data UV setelah penambahan pereaksi geser natrium hidroksida (NaOH) terjadi pergeseran puncak serapan pada pita I sebesar 46 nm, disertai dengan penurunan intensitas (Gambar 24). Adanya pergeseran batokromik pada pita I memberikan petunjuk adanya gugus hidroksil pada posisi $C_{4'}$, dan C_7.



Gambar 24. Spektrum UV senyawa hasil isolasi G 3 dalam MeOH dan dalam MeOH + NaOH

Tabel 2. Data UV senyawa artokarpin dan kristal G 3

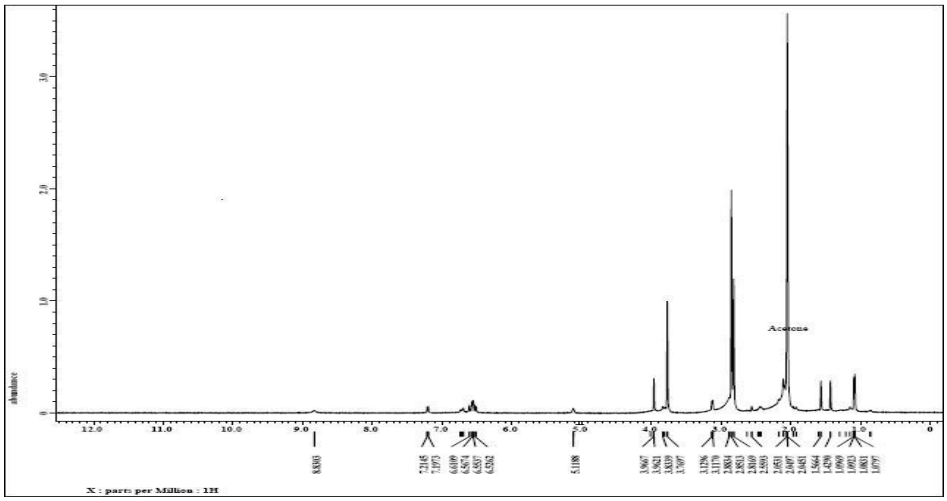
Senyawa artokarpin		kristal G 3	
λ maks	log €	λ maks	log €
316	4,12	322	4,19
279	4,66	279	4,61
-	-	204	4,66

Sumber: Cunha *et al.* (1994)

3. Analisis Spektrometri Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Dari data spektrum ^{1}H-RMI diketahui adanya adanya proton C sp² cincin aromatik pada geseran kimia (δ) 6,51 ppm, 1H, s ; δ 6,60 ppm, 1H, s; δ 6,56 ppm, 1H, d, *J*

= 6,8 Hz; δ 7,2 ppm, 1H, d, *J* = 8,6 Hz. Pada δ 7,2 ppm mengkopling 1 proton pada δ 6,56 ppm sehingga pada spektrum muncul 2 puncak (doblet, d,), sedangkan proton pada δ 6,52 tidak mengkopling sehingga muncul satu puncak singlet. Selain proton C sp^2 aromatik terdapat pula proton C sp^2 rantai alkena pada δ 6,71 ppm, 1H, d,d *J* = 6,85;7,45 Hz munculnya puncak doubet-doublet karena proton ini mengkopling 2 proton pada 2,45 dan 6,52 ppm, 1H, d, *J* = 6,8 Hz, proton ini mengkopling proton pada δ 6,71 sehingga muncul puncak doblet pada spektrumnya. Pada geseran kimia (δ) 5,11ppm, 1H,s, mengindikasikan bahwa proton ini tidak mengkopling proton. Selain proton C sp^2 terdapat pula proton C sp^3; δ1,58, 3 H, s; δ 1,4 ppm, 3H, s kedua proton ini singlet karena tidak mengkopling proton lain; δ1,08 ppm, 3H, d, *J*= 2,3 dan δ1,09 ppm, 3H, d, *J*= 2,2 proton ini mengkopling proton pada δ 2,45 ppm sehingga muncul puncak doblet pada spektrumnya dan δ 3,96 ppm proton ini tidak mengkopling proton lain sehingga muncul satu puncak singlet. ^{1}H-RMI senyawa hasil isolasi ditunjukkan oleh Gambar 25.



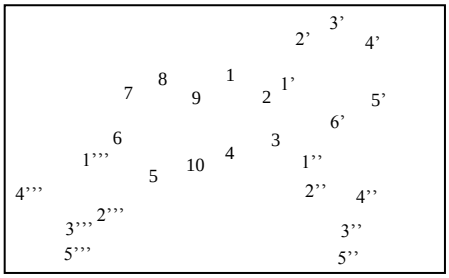
Gambar 25. Spektrum $_1$H-RMI senyawa hasil isolasi.

Tabel 3. Data ^{1}H-RMI senyawa artokarpin dan kristal G 3

Posisi proton pada karbon	artokarpin	Kristal G 3
5^{111}	1,11 (d, *J* = 6,8 Hz)	1,09 (d, *J* = 2,3 Hz)
4^{111}	1,11 (d, *J* = 6,8 Hz)	1,08 (d, *J* = 2,2 Hz)
4^{11}	1,46 (s)	1,40 (s)
5^{11}	1,61 (s)	1,58 (s)
3^{111}	2,48 (m)	2,45 (m)
OCH_3	3,88 (s)	3,96 (s)
2^{11}	5,15 (d, *J* = 6,6 Hz)	5,11 (s)
1^{11}	3,13 (d, *J* = 6,6 Hz)	3,12 (d, *J* = 6,4 Hz)
3^{1}	6,57 (s)	6,60 (s)
1^{111}	6,54 (d, *J* = 16,8 Hz)	6,52 (d)
5^{1}	6,52 (d, *J* =8,5 Hz)	6,56 (dd, *J* = 6,8; 6,3 Hz)
8	6,53 (s)	6,51 (s)
2^{111}	6,7 (dd, *J* = 6,8; 16,8 Hz)	6,71 (dd, *J* = 6,85; 7,45 Hz)
6^{1}	7,59 (d, *J* = 8,6 Hz)	7,2(d, *J* = 8,6 Hz)

Sumber: Cunha *et al.* (1994)

Setelah dilakukan analisis terhadap senyawa hasil isolasi yang meliputi analisis KLT, titik leleh, penafsiran spektrometri inframerah, spektrum spektrometri ultraungu-tampak, spektrometri ^{1}H RMI dan membandingkan dengan senyawa artokarpin standar dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi yang diperoleh dari kayu akar tumbuhan kenangkan (*Artocarpus rigida*) merupakan senyawa fenolik golongan flavonoid yaitu artokarpin. Struktur senyawa artokarpin dapat dilihat pada Gambar 26.



Gambar 26. Struktur molekul senyawa artokarpin