

Isolasi Senyawa 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol dan Uji Antioksidan dari Tumbuhan Kepulauan Aru (*Sonneratia ovata* Backer)

Fatmawati Inneke Putri, Taslim Ersam dan Sri Fatmawati
Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: paktichem@gmail.com

Abstrak—*Sonneratia ovata* Backer merupakan salah satu tanaman yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru. Senyawa 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol (1) berupa serbuk putih dengan titik leleh 200-201°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. Fraksi dari senyawa (1) menunjukkan prosentase penghambatan sebesar $20,91 \pm 0,006 \%$.

Kata Kunci—*Sonneratia ovata* Backer; Antioksidan; Isolasi; Bahan alam; DPPH radikal.

I. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam dan juga terdiri dari banyak pulau dari sabang sampai merauke. Pada setiap pulau terdapat kekayaan hayati yang belum banyak diketahui manfaat dan fungsinya. Eksplorasi kekayaan hayati belum secara maksimal di Indonesia bagian Timur. Disana terdapat banyak tumbuhan yang memiliki banyak manfaat tetapi kurangnya sumber daya manusia menyebabkan manfaatnya kurang tereksplorasi. Beberapa macam 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 salah satunya yaitu genus *Sonneratia*. Genus *Sonneratia* ini memiliki banyak 8 spesies [1].

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 caseolaris*. Menurut Wu, dkk (2009), senyawa yang diperoleh dari buah *Sonneratia caseolaris* dan *Sonneratia ovata* yang diteliti bisa menjadi dasar kemotaksonomi spesies dari genus *Sonneratia* dan beberapa senyawanya aktifitas sitotoksik [2].

Telah dilakukan *in vivo* pada tikus yang diinduksi dengan *alloxan* dan hasilnya menunjukkan bahwa buah Pedada (*Sonneratia caseolaris*) dapat digunakan untuk mengobati penyakit diabetes pada konsentrasi tertentu

[3]. Tiwari, dkk (2010) telah mendapatkan 3 senyawa bioaktif, yaitu β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranosida, asam oleanolat, dan luteolin yang berhasil isolasi ekstrak metanol buah *Sonneratia caseolaris*, yang memiliki aktifitas inhibitor enzim α -glukosidase dan anti hiperglisemik [4]. Dari penelitian sebelumnya, senyawa asam maslinat yang berasal dari buah *Sonneratia caseolaris* memiliki aktifitas inhibitor enzim α -glukosidase [5] dan dua senyawa flavon hasil isolasi dari daun *Sonneratia caseolaris* yaitu luteolin dan luteolin 7-O- β -glukosida yang memiliki aktifitas antioksidan [6].

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 metabolit sekunder dari *Sonneratia ovata* Backer dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku dan diuji aktivitas antioksidannya.

II. METODOLOGI PENELITIAN

A. 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.

B. Ekstraksi

Serbuk kering dari kulit batang (1,5 kg) tersebut dimaserasi dengan 7 L metanol selama 3 x 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 dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak metanol pekat (153 gram).

C. Fraksinasi dan Pemurnian

Prosedur Penelitian yang digunakan adalah prosedur standar isolasi bahan alam dengan variasi kenaikan kepolaran pelarut. Fraksi metanol difraksinasi menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dengan 2 kali pengulangan masing-masing sebanyak 35 gram menggunakan eluen 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 yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (F1-F5). 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 KLT menggunakan eluen EA : n-heksana (1:4). Fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (G1-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 KLT menggunakan eluen EA : n-heksana (1:4). Fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 5 fraksi (H1-H5). 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 KLT menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3). Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 11 fraksi (I1-I11). 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 KLT menggunakan eluen EA : n-heksana (1:3) v/v. Fraksi yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 6 fraksi (J1-J6). 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 yang memiliki Rf yang sama digabungkan dan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga menjadi 6 fraksi (K1-K6). 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 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. Fraksi L2 dilakukan Fraksi L2 direkristalisasi dengan menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksana. Hasil rekristalisasi dinamakan Senyawa (1), uji kemurnian dilakukan uji KLT tiga eluen, uji KLT dua dimensi dan uji titik leleh.

D. Pengujian Spektrofotometer IR

Senyawa (1) yang berhasil diisolasi diambil 1 mg. Ditambahkan KBr dan digerus sampai sampai homogen. Campuran ini dibuat pelet dengan ketebalan ± 1 mm. Pelet berisi sampel ini kemudian diukur serapannya pada bilangan gelombang 400-4000 cm^{-1} . Spektrum yang terbentuk menunjukkan serapan bilangan gelombang terhadap transmisi (%T). Spektrofotometer IR yang digunakan adalah spektrofotometer IR *Shimadzu*.

E. Pengujian Spektrometer NMR

Analisis spektrometer NMR dilakukan menggunakan peralatan spektrometer NMR AGILENT 500 MHz. Sampel sebanyak 10 mg dilarutkan dalam pelarut kloroform (CDCl_3). Larutan sampel kemudian diinjeksikan ke dalam tabung injection dan dianalisis untuk mengetahui spektra $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) dan $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz).

F. Pengujian Antioksidan dengan Metode DPPH

Larutan sampel dibuat dengan cara 10 mg sampel yang akan diuji dilarutkan ke dalam 1 mL MeOH. Larutan sampel sebanyak 33 μL dimasukkan 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 λ 517 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara 1 mL DPPH dilarutkan ke dalam 33 μL MeOH.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui pelarut yang baik untuk mengekstrak sampel kulit batang dari *Sonneratia ovata* Backer. 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 dipekatkan 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 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.

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.

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 L metanol selama 3 x 24 jam dalam suhu ruang. Setiap 1 x 24 jam, dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara serbuk dengan filtrat. Pada hasil filtrat yang diperoleh setiap 1 x 24 jam dimonitoring dengan KLT untuk mengetahui semua senyawa sudah terekstrak atau belum. 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.

B. Fraksinasi dan Pemurnian

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 diperoleh vial sebanyak 29 vial (@300 mL) dan selanjutnya dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v. Fungsi monitoring KLT yaitu untuk mengetahui pola noda pada hasil KCV agar dapat digabungkan sesuai dengan Rf yang relatif sama. Tujuan menggunakan eluen diatas untuk melakukan proses pemisahan senyawa sesuai dengan sifat kepolaran senyawanya. Pada kromatogram KLT yang memiliki Rf 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). Fraksi F2-F4 menunjukkan pola noda yang hampir sama sehingga digabung. Fraksi gabungan F2-F4 (3,6 gram) difraksinasi 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 KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v. 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. Pada kromatogram KLT hasil KCV ke-2 yang memiliki Rf

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). Fraksi G5 menunjukkan pola noda yang lebih sederhana karena jumlah nodanya yang tidak terlalu banyak, sehingga fraksi G5 dipilih untuk proses fraksinasi selanjutnya. Fraksi G5 (1,641 gram) dilakukan fraksinasi 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. Hasil KCV ke-3 diperoleh vial sebanyak 57 vial (@100 mL) dan dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:4) v/v. 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). Pada hasil KLT gabungan menunjukkan bahwa fraksi H2 dan H3 memiliki pola noda yang hampir sama sehingga kedua fraksi itu digabung. Fraksi gabungan H2-H3 (632,9 mg) dilakukan fraksinasi selanjutnya dengan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG) 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 KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v. Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-1 yang memiliki Rf 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). Pada hasil KLT gabungan menunjukkan bahwa fraksi I6 dan I7 memiliki pola noda yang hampir sama sehingga kedua fraksi itu digabung. Fraksi gabungan I6-I7 (173 mg) dilakukan fraksinasi dengan 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 KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v. Diawali dengan eluen 100% *n*-heksana agar senyawa yang bersifat non polar ikut bersama eluen tersebut. Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-2 yang memiliki Rf 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). 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. 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 dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v. 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). 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. Fraksi I4, J2, dan K2 (247 mg) dilakukan fraksinasi dengan 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 dimonitoring KLT dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v. Pada kromatogram KLT hasil KKG ke-3 yang memiliki Rf relatif sama digabungkan menjadi 4 fraksi, yaitu L1 (248,5 mg), L2 (156,2 mg), L3 (31,9 mg), dan L4 (34 mg).

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 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.

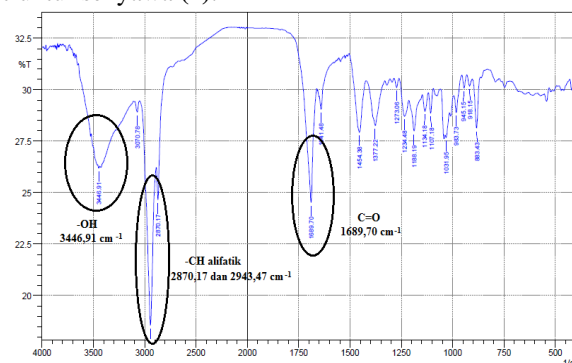
Sesuai dengan prinsip rekristalisasi, yaitu pelarut yang digunakan adalah pelarut yang tidak melarutkan sempurna pada suhu ruang dan dapat melarutkan sempurna pada suhu tinggi. Oleh karena itu, rekristalisasi fraksi L2 menggunakan 2 pelarut yaitu etil asetat panas (yang dapat melarutkan sempurna) dan *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 dengan eluen etil asetat : *n*-heksana (2:3) v/v, etil asetat : *n*-heksana (1:3) v/v, etil asetat : *n*-heksana (1:9) v/v. Hal tersebut untuk membuktikan bahwa senyawa telah murni karena pada posisi yang berbeda tetapi noda yang muncul tetap noda tunggal. 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 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. Fraksi L2 disebut senyawa (1). Senyawa (1) menunjukkan senyawa murni karena senyawa dikatakan murni jika rentang titik lelehnya $\pm 1^\circ\text{C}$.

C. Penentuan Struktur

Senyawa (1) berupa serbuk putih sebanyak 17 mg dengan titik leleh 200-201°C. Analisa selanjutnya menggunakan spektrofotometer FTIR. Pada hasil spektrum Inframerah (IR) dari senyawa (1) (Gambar 1).

menunjukkan serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi. Pada bilangan gelombang 3446,91 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus hidroksi (O-H). Sedangkan gugus CH alifatik (sp^3) ditunjukkan dengan adanya serapan bilangan gelombang 2870,17 dan 2943,47 cm^{-1} . Pada bilangan gelombang 1689,70 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O) [7]. Pada hasil spektrum IR tidak terdapat beberapa serapan pada bilangan gelombang antara 1370-1600 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 cm^{-1} (-OH), 1685 cm^{-1} (C=O), 2924 dan 2862 cm^{-1} (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).



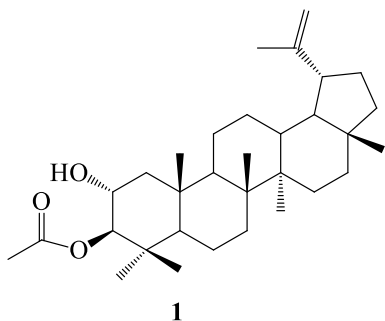
Gambar 1. Spektrum IR senyawa (1)

Penentuan struktur selanjutnya menggunakan data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ dengan menggunakan pelarut 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 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 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 [7]. 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 (**41**), asam betulinat (**42**), dan lupenil asetat (**43**). Data $^1\text{H-NMR}$ digunakan untuk menentukan struktur senyawa (**1**) secara keseluruhan.

Data $^1\text{H-NMR}$ senyawa (**1**) (Tabel 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)[7].

Berdasarkan analisis data IR, ^1H dan $^{13}\text{C-NMR}$ di atas maka dapat disimpulkan bahwa senyawa L2 (**1**) memiliki kesamaan struktur dengan senyawa 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol [9] yang ditunjukkan pada Tabel 1. Berdasarkan data tersebut, terdapat dua pergeseran kimia (δ_c) yang sedikit berbeda antara senyawa (**1**) dengan 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -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 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol, sehingga dapat disarankan bahwa senyawa (**1**) adalah 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol.

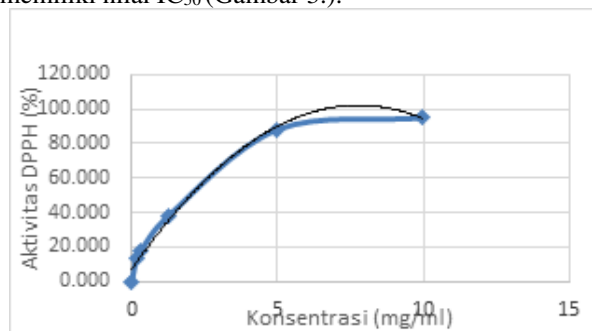


D. Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Sonneratia ovata* Backer dan fraksi L

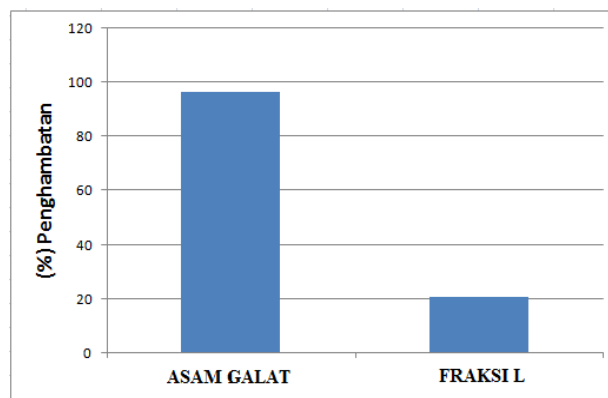
Asam galat (Asam 3,4,5-trihidroksibenzoat) digunakan sebagai kontrol positif. Uji DPPH ini dilakukan dengan menambah 33 μL ekstrak dengan 1 mL larutan DPPH yang kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selama reaksi antara DPPH dengan antioksidan, larutan DPPH yang awalnya berwarna ungu akan 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 λ 517 nm.

Presentase penghambatan asam galat sebesar 96,41% dengan nilai IC_{50} sebesar 2,01 $\mu\text{g/mL}$ (Gambar 2.). IC_{50} yaitu konsentrasi minimum sampel untuk bisa menghambat radikal DPPH sebanyak 50 %. Setelah dilakukan isolasi senyawa (**1**) dari fraksi L, maka dilakukan uji aktivitas antioksidan pada fraksi L, yang memungkinkan terdapat senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan yang aktif. Hasil fraksi L2 memiliki presentase penghambatan sebesar $20,91 \pm 0,006\%$. Hal itu menunjukkan bahwa fraksi L dan senyawa (**1**)

aktivitas antioksidannya kurang aktif, sehingga tidak memiliki nilai IC_{50} (Gambar 3.).



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



Gambar 3. Aktivitas Penghambatan radikal DPPH dari Asam galat (kontrol positif) dan fraksi L dengan konsentrasi 319,46 $\mu\text{g/mL}$

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dihasilkan senyawa triterpenoid yaitu 3β -asetoksi-lup-20(29)-en-2 α -ol (**1**) berupa serbuk warna putih dengan titik leleh 200-201 $^{\circ}\text{C}$ dari ekstrak metanol kulit batang *Sonneratia ovata* Backer yang berasal dari Kota Dobo, Kepulauan Aru, Provinsi Maluku. Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan fraksi dari senyawa (**1**) hanya memiliki prosentase penghambatan $20,91 \pm 0,006\%$, sehingga dapat disimpulkan senyawa (**1**) memiliki aktivitas antioksidan yang kurang aktif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterima kasih kepada tim penelitian Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Sintesis dan Jurusan Kimia FMIPA ITS, serta semua pihak yang turut membantu dalam penyelesaian jurnal ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Mao, L., & Foong, S. Y. (2013). Tracing ancestral biogeography of *Sonneratia* based on fossil pollen and their probable modern analogues. 133-143.
- [2] 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*, 1-5.
- [3] Jariyah, Widjanarko, S. B., Yuniarta, & Estiasih, T. (2014). Hypoglycemic effect of Pedada (*Sonneratia caseolaris*) Fruit. 31-40.
- [4] Tiwari, A. K., Viswanadh, V., Gowri, P. M., Ali, A. Z., Radhakrishnan, S., Agawane, S. B., et al. (2010). Oleanolic acid - an α -Glucosidase inhibitory and antihyperglycemic active compound from the fruits of *Sonneratia caseolaris*. 19-23.

- [5] Hou, W., Li, Y., Zhang, Q., Wei, X., Peng, A., Chen, L., et al. (2009). Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as alpha-glucosidase inhibitors. 614-618.
- [6] Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ohtsuki, T., & Ishibashi, M. (2006). Flavonoids from *Sonneratia caseolaris*. 264-265.
- [7] Rouessac, F., & Rouessac, A. (1994). *Chemical Analysis "Modern Instrumentation Methods and Techniques" Second Edition*. England: John Wiley & Sons Ltd.
- [8] Shahlaei, M., Ghanadian, S. M., Ayatollahi, A. M., Mesaik, A. M., Abdalla, O. M., Afsharypour, S., et al. (2013). Molecular modeling, structure activity relationship and immunomodulatory properties of some lupeol derivatives. *Med Chem Res*, 22:1795-1803.
- [9] Rungsimakan, S., & Rowan, M. G. (2014). Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*, 177-188.