

---

## TEKNOLOGI PEMURNIAN SENYAWA DENGAN METODA KROMATOGRAFI

**Jamilah Abbas, Puspa Dewi, M. Hanafi.**

Pusat Penelitian Kimia – LIPI, Kawasan puspipetek. Serpong, 15314

E-mail: [jamilahabbas@yahoo.com](mailto:jamilahabbas@yahoo.com)

### Abstrak

*Teknologi pemurnian senyawa dengan metoda kromatografi penting dilakukan agar didapat senyawa murni yang mempunyai aktivitas lebih tinggi. Metoda pemurnian dilakukan dengan menggunakan fasa diam silika dan fasa gerak merupakan campuran n-heksana dan etil asetat serta campuran etil asetat metanol dengan kepolaran yang dinaikkan secara gradien. Dari fraksi n-heksana dari tumbuhan *Calophyllum macrophyllum* didapat satu senyawa murni yang mempunyai aktivitas antioksidan.*

**Kata kunci :** *Kromatografi, *Calophyllum macrophyllum*, aktivitas antioksidan.*

### Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya dengan keanekaragaman hayati kedua didunia setelah Brazil, sehingga Indonesia dipandang sebagai sumber bahan kimia alami yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat dan bahan baku industri kimia. Dalam penelitian ini dipilih tumbuhan *Calophyllum macrophyllum* karena tersedia banyak di Indonesia dan berpotensi sebagai bahan baku obat. *C. macrophyllum* dapat tumbuh didaerah rawa-rawa dan di perbukitan sampai ketinggian 800 m diatas permukaan laut, tinggi pohon mencapai 45 m (pernah dilaporkan mencapai 60 m), diameter 16 cm, daun berbentuk lonjong dengan panjang 8-25 cm, buahnya berbentuk elip dengan panjang 8-13 cm, buah dan kulit buah (banyak serat) dapat dimakan. *C. macrophyllum* tumbuh tersebar sampai Thailand Selatan, Malaysia, Singapura, Kalimantan (Soerianegara 1994).

*Calophyllum* telah digunakan untuk obat rematik, hemorroid dan obat luka (Cottiglia 2004). Belum banyak penelitian tentang tumbuhan *C. macrophyllum*, tetapi penelitian spesies lain telah banyak dilakukan misalnya *C. teysmanni*, *C. calaba*, *C. cordato oblongum*, senyawa yang didapat mempunyai aktivitas antiinflamasi, antifungi dan bersifat menghambat peroksidase lipid (Inuma M, 1993). Senyawa kumarin (kostatolida, soulatrolida, kalanolide A) telah diisolasi dari *C. teysmanni*, adanya gugus benzil alkohol pada posisi C-10 sangat penting dalam menentukan aktivitas anti-HIV (Kirk R, 1994). Poliisoprenil ketone, enervosanone telah diisolasi dari kulit batang *C. enervosum* yang menunjukkan aktivitas antimikroba (Taher M, 2005), Santon dari *Calophyllum* berfungsi sebagai antihipoglycaemik, antiplatelet, antimikroba, prenikumarin mempunyai aktivitas antitumor (Itoigawa M, 2001).

Dalam penelitian ini dicoba untuk mendapatkan dan memurnikan senyawa aktif antioksidan dari *C. macrophyllum* dengan teknik kromatografi. Peran teknologi kromatografi untuk memperoleh senyawa aktif antioksidan dari kulit bantang *C. macrophyllum* sangat penting. Prinsip pemisahan berdasarkan daya serap senyawa terhadap fasa diam silika, dan daya larut senyawa dalam fasa pengembang. Metoda kromatografi yang dilakukan adalah kromatografi kolom cepat, kromatografi kolom lambat dan preparatif kromatografi lapis tipis (PKLT). Metoda pemurniaan senyawa hasil isolasi dilakukan bertahap, pertama dengan kromatografi kolom cepat, kedua kromatografi kolom lambat, ketiga preparatif kromatografi lapis tipis (PKLT), terakhir dengan metoda rekristalisasi.

### Tujuan penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi n-heksana dari tumbuhan *C. macrophyllum* yang positif sebagai antioksidan, metoda isolasi dengan teknik kromatografi.

## Metodologi

### 1. Metoda sampling dan maserasi.

Kulit batang *C. macrophyllum* 5 kg dikoleksi dari gunung Kerinci Jambi, dikeringkan dalam oven 50°C, lalu di rajang/dihaluskan. Sampel dimaserasi dengan etanol 70% sebanyak 10-15 liter, lakukan maserasi 3 kali, masing-masing selama 5 hari (Gambar 1).



Gambar 1. Maserasi sampel dengan etanol 70%

### 2. Metoda pemekatan

Gabungan sari etanol 3 kali maserasi (45 liter) dipekatkan dengan vakum evaporator kapasitas 60 liter (Gambar 2), Ekstrak etanol disuspensikan dalam aquades (250 ml) lalu dipartisi dengan *n*-heksana (4 x 250 ml) dengan menggunakan corong pisah (Gambar 3), lalu partisi dilanjutkan dengan etil asetat dan *n*-butanol dengan cara yang sama. Masing-masing fraksi yang didapat dipekatkan sehingga didapat fraksi *n*-heksana, etil asetat dan *n*-butanol. lalu diuj aktivitas antioksidan setiap fraksi dengan metoda DPPH.



Gambar 2. Pemekatan hasil maserasi dengan evaporator.

Gambar 3. Parsiti fraksi etanol

### 3. Uji aktivitas antioksidan dengan metoda DPPH radical scavenging

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam metanol, siapkan 5-200 ppm dalam 4 ml aquades dan encerkan dengan metanol yang telah mengandung DPPH\* (1 mM, 0.5 mL). Campuran

dikocok dan diinkubasi selama 30°C selama 30 menit. Ukur absorbansi pada 515 nm dengan spektrofotometer.

Pengukuran persentasi inhibisi terhadap DPPH (persentase scavenging effect) dengan rumus sbb :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

- DPPH ( $\alpha, \alpha$  diphenyl- $\beta$ -picryl-hydrazyl)

#### 4. Metoda pemurnian senyawa aktif antioksidan dengan kromatografi

Senyawa aktif antioksidan diperoleh dengan metoda kromatografi kolom lambat. Sebanyak 6 gram fraksi *n*-heksana dimasukkan kedalam kolom kromatografi (45 gram silika, 200-300 mesh), lalu dielusi dengan fasa gerak *n*-heksana : etil asetat dan dilanjutkan dengan etil asetat : metanol secara gradien 0-100 % dengan kenaikan kepolaran 10%. Cek masing-masing fraksi dengan kromatografi lapis tipis (TLC), fraksi yang sama digabung, fraksi yang memberikan harapan (akan didapat senyawa aktif) dipisahkan kembali dengan kolom kromatografi lambat (Gambar 4a, 4b)



Gambar 4a. Kromatografi kolomcepat (vakum)



4b. Kromatografi kolom lambat (konvensional)

Pemurnian lebih lanjut dilakukan dengan metoda preparatif TLC dengan pengembang *n*-heksana : etil asetat (9:1). Lalu direkristalisasi dengan menggunakan diklorometana –metanol. Senyawa murni yang didapat diuji aktivitas antioksidan dengan DPPH dan ditentukan strukturnya dengan spektroskopi

## Hasil dan Pembahasan

### 1. Aktivitas antioksidan

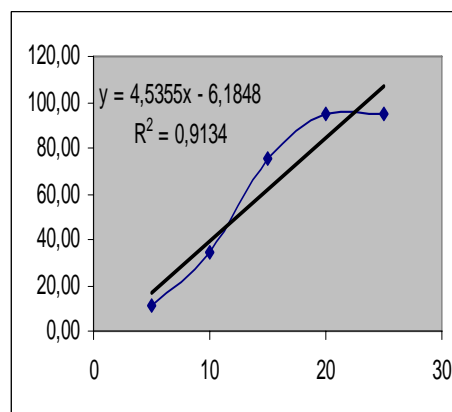
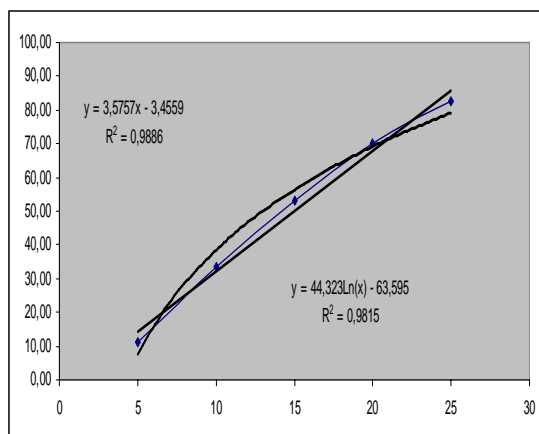
Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak *n*-heksana,etil aseta, *n*-butanol dan senyawa murni dengan DPPH free radical scavenging effect menunjukkan bahwa fraksi etil asetat paling aktif dan *n*-heksana cukup aktif sebagai antioksidan. Vitamin C sebagai standar mempunyai nilai  $IC_{50} = 10,96$  ppm.

Tabel 1 menggambarkan bahwa senyawa stigmasterol yang didapat mempunyai aktivitas antioksidan dengan  $IC_{50} = 11,96$  (ppm), data dibandingkan dengan standar quercetin dan vitamin C. Suatu senyawa dikatakan aktif sebagai antioksidan bila  $IC_{50} \leq 100$  ppm (sangat aktif), cukup aktif bila  $IC_{50} \leq 100 - 200$  ppm dan tidak aktif bila  $IC_{50} \geq 200$  ppm.

**Tabel 1. Hasil uji aktivitas antioksidan**

No	Sampel	Konsentrasi	% inhibisi	$IC_{50}$ (ppm)
1	Standar Vitamin C	25	94,44	10,96
		20	94,53	
		15	74,94	
		10	34,05	
		5	11,29	
2	Standar quercetin	25	82,46	14,95
		20	70,23	
		15	53,21	
		10	33,62	
3	Senyawa stigmasterol	200	94,44	11,96
		100	94,53	
		50	74,94	
		25	34,05	

Kurva konsentrasi versus % inhibisi untuk standar quercetin (Gambar 5a) dan senyawa murni (5b)



Gambar 5a Kurva konsentrasi versus % inhibisi quercetin    Gambar 5b. Senyawa murni

## 2. Hasil partisi kulit batang *C. macrophyllum*

Dari hasil partisi fraksi etanol kulit batang *C. macrophyllum* (5 kg) diperoleh fraksi *n*-heksana sebanyak 9 gr (0,18%), etil asetat 59,51 gr (1,19%), *n*-butanol 142,8 gr (2,96%) dan fraksi aquades 142,8 gr (2,96%)

## 3. Hasil Pemurnian dengan metoda kromatografi

Dari hasil pemurnian dengan metoda kromatografi didapat senyawa stigmasterol berupa kristal putih dari data LC-MS tampak puncak ion molekul (M+1) pada  $m/z = 413$  (BM 412).

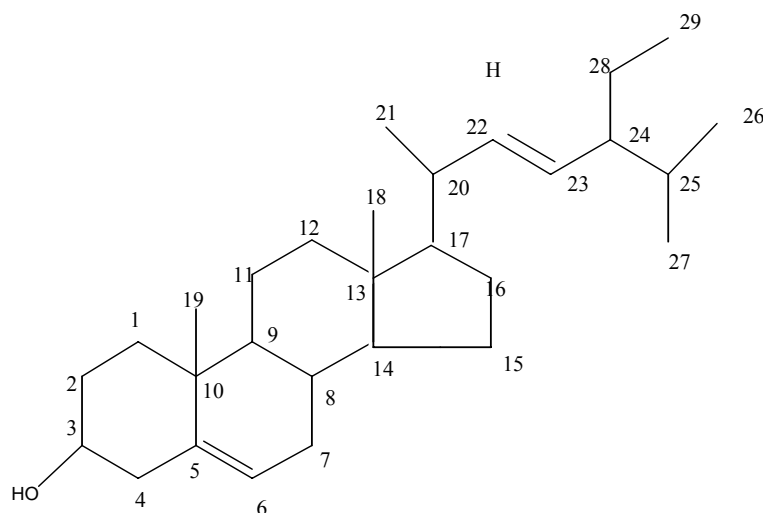
Dari spektrum IR menunjukkan adanya gugus OH dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang  $3420\text{ cm}^{-1}$  dan pita serapan pada bilangan gelombang  $2920\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur asimetris ikatan C-H

Dari perbandingan pergeseran kimia  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa yang didapat dengan stigmasterol standar (Tabel 2), menunjukkan pergeseran kimia yang mirip, sehingga senyawa yang didapat dipastikan stigmasterol

Tabel 2. Perbandingan pergeseran kimia  $^{13}\text{C-NMR}$  senyawa yang didapat dengan stigmasterol

No	Lit(stigma)	SampelRimby
1	37,2	36,2
2	31,6	29,2
3	<u>71,8</u>	<u>71,9</u>
4	42,5	42,4
5	<u>140,9</u>	<u>140,8</u>
6	<u>121,9</u>	<u>121,8</u>
7	32,8	32,0
8	31,9	31,8
9	50,2	46,0
10	36,6	34,8
11	22,7	21,8
12	39,7	36,6
13	42,3	39,9
14	56,9	56,9
15	24,3	23,2
16	28,9	26,2
17	56,0	56,1
18	12,0	12,0
19	19,3	19,1
20	40,5	37,4
21	21,3	19,9
22	<u>138,3</u>	<u>138,4</u>
23	<u>129,3</u>	<u>129,4</u>
24	51,2	50,2
25	31,8	28,3
26	18,9	18,9
27	21,1	19,5
28	25,4	24,4
29	12,2	12,9

Struktur stigmasterol seperti dalam Gambar 6



Gambar 6. Stuktur sitosterol

Dari data proton dan karbon NMR menunjukkan bahwa senyawa yang didapat mempunyai 2 memppunyai ikatan rangkap (satu didalam dan satu diluar cincin), 6 gugus metil ( $\text{CH}_3$ ), 3 C quartener, 1 gugus OH sehingga disimpulkan senyawa yang didapat adalah stigmasterol

### Kesimpulan

1. Didapat senyawa stigmasterol
2. Stigmasterol berpotensi menghambat terbentuknya radikal bebas didalam tubuh

### Daftar Pustaka

1. Cottigial (2004)
2. Itoigawa M, Ito C, Tan.H.T.W., Kuchide M., Tokuda H., Nishino H., Hurukawa H., (2001), Cancer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*, *Cancer Letter*, Vol. 169 Issue 1, 15-19.
3. Kirk R, Heidi R, Richard W, (1994), *Calanone*, A Novel Coumarin from *Calophyllum teysmannii*, *Tetrahedron Letters*, Vol. 35 No. 32 5821-5824
4. Linuma M., Tosa H., Tanaka T., Yonemori S.,(1996). Two xanthenes from roots bark of *calophyllum inophyllum*., *Phytochemistry*, vol 35, No 7, 527-532
5. Soerianegara & Lemmens, (1994). Plant Resources of Sout-East Asia. Prosea, 114-138
6. Taher M., Idris.M,S., Ahmad.F and Arbain D, A Polyisoprenylated ketone from *Calophyllum enervosum*. *Phytochemistry*, (2005), 66, 723-726. *Get al* Antimalarial xanthenes from *C. caledonicum* and *Garcinia vieillardii*., *Life Sciences* 75., 3077-3085.