



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI DAUN KAYU SINA (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.)

SKRIPSI



**FAJRI IKHSAN
0810412004**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN
ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

ABSTRAK

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI DAUN KAYU SINA (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.)

Oleh

Fajri Ikhsan (0810412044)

Pembimbing : Bustanul Arifin, M.Si. dan Dr. Andria Agusta

Isolasi dan identifikasi senyawa metabolisme sekunder dari 495,12 g daun kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) telah dilakukan dan diperoleh 46,8 mg senyawa murni pada fraksi etil asetat. Uji kualitatif senyawa hasil isolasi dengan larutan vanilin menunjukkan bahwa senyawa tersebut termasuk senyawa golongan flavonoid. Hasil analisa dan perbandingan data hasil uji spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa hasil isolasi dengan data $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ standar katekin dan epikatekin menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi identik dengan epikatekin. Data tersebut diperkuat juga oleh spektroskopi HC-HSQC dan H-H COSY. Berdasarkan spektroskopi tersebut, senyawa hasil isolasi ini disarankan dengan struktur 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol atau epikatekin.

Kata kunci : *Phyllocladus hypophyllus*, isolasi, NMR, epikatekin

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITE FROM KAYU SINA LEAVES (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.)

By

Fajri Ikhsan (0810412044)

Advisors : Bustanul Arifin, M.Si. and Dr. Andria Agusta

Isolation and Identification of secondary metabolite from 495,12 g kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) leaves have been done and the amount of 46,8 mg pure compound was gotten. Qualitative assay of isolated compound with vanilin solution show that this isolated compound included into flavonoid. Analysis and comparison of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of isolated compound with standard spectrum of catechin and epicatechin show that this isolated compound is identical with epicatechin. The data is also reinforced by HC-HSQC and H-H COSY. Based on these spectroscopies, this compound is suggested as 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavan-3 α -ol or epicatechin.

Keywords : *Phyllocladus hypophyllus*, isolation, NMR, epicatechin

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamini, segala puji dan syukur penulis aturkan kehadiran Allah SWT atas segala nikmat dan kasih sayang-Nya sehingga skripsi yang berjudul **Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Daun Kayu Sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.)** bisa diselesaikan dengan baik. Shalawat dan salam kepada junjungan umat sedunia Baginda Nabi Besar Muhammad SAW. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada bapak Bustanul Arifin, M.Si. selaku pembimbing I dan bapak Dr. Andria Agusta selaku pembimbing II dari LIPI Cibinong yang telah memberikan waktu, tenaga, dan fikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis baik sewaktu melakukan penelitian maupun dalam penyusunan skripsi ini.

Ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya juga penulis sampaikan kepada kedua orang tua atas semua doa, kasih sayang, dan dukungannya yang tiada henti sehingga penulis bisa menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini yang merupakan satu fase terpenting dalam hidup penulis.

Selanjutnya ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Emriadi selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas, Padang.
3. Kepala bidang bagian Botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, ibu Dr. Joeni S. Rahajoe yang telah memberikan izin dan kesempatan melaksanakan penelitian .
4. Ibu Dr. Refilda selaku penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menjalani perkuliahan di Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Andalas, Padang.

5. Ibu Dra. Yuliasri Jamal, M.Sc., Dr. Praptiwi, Hj. Hertina, Mas Ahmad Fathoni S.Si., dan Kang Asep yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Fitokimia Puslit Biologi LIPI Cibinong.
6. Bapak Dr. Ary P. Keim yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Semua dosen, karyawan, dan karyawan yang telah memberikan ilmu dan memfasilitasi penulis selama menuntut ilmu di Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Andalas.
8. Segenap karyawan dan karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas yang telah membantu selama penulis berada di bangku perkuliahan.
9. Semua pihak dan teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu penulisan tugas akhir ini.

Kepada semua pihak yang telah membantu penulis, semoga Allah SWT memberkahi dan membalas semua bantuan yang telah diberikan, dan semoga Allah SWT menilai semua ini sebagai ilmu yang bermanfaat yang pahalanya akan terus mengalir, serta skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Padang, Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum <i>Phyllocladus</i>	3
2.2 Kandungan Kimia <i>Phyllocladus</i>	4
2.3 Flavonoid.....	10
2.3.1 2-fenilbenzopiran	11
2.3.2 Isoflavonoid.....	12
2.3.3 Noeflavonoid.....	13
2.4 Ekstraksi	13
2.5 Kromatografi	14
2.6 Resonansi Magnet Inti (NMR).....	15
2.6.1 Proton NMR ($^1\text{H-NMR}$).....	16
2.5.2 Karbon NMR ($^{13}\text{C-NMR}$)	16
2.5.3 HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence).....	17
2.5.4 HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)	17
2.5.5 H-H COSY	17

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1	Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2	Material Tumbuhan.....	18
3.3	Alat dan Bahan.....	18
3.4	Prosedur Penelitian	18
3.4.1	Maserasi.....	18
3.4.2	Kromatografi Kolom	19
3.4.3	Penentuan Struktur Molekul	20

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Maserasi.....	21
4.2	Kromatografi Kolom.....	21
4.3	Penentuan Struktur Molekul.....	23
4.3.1	Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$)	23
4.3.2	Spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ ($^{13}\text{C-Nuclear Magnetic Resonance}$)	26
4.3.3	Spektroskopi HC-HSQC (HC-Heteronuclear Single Quantum Coherence).....	27
4.3.4	H-H COSY (H-H Homonuclear Correlation Spectroscopy)	28

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

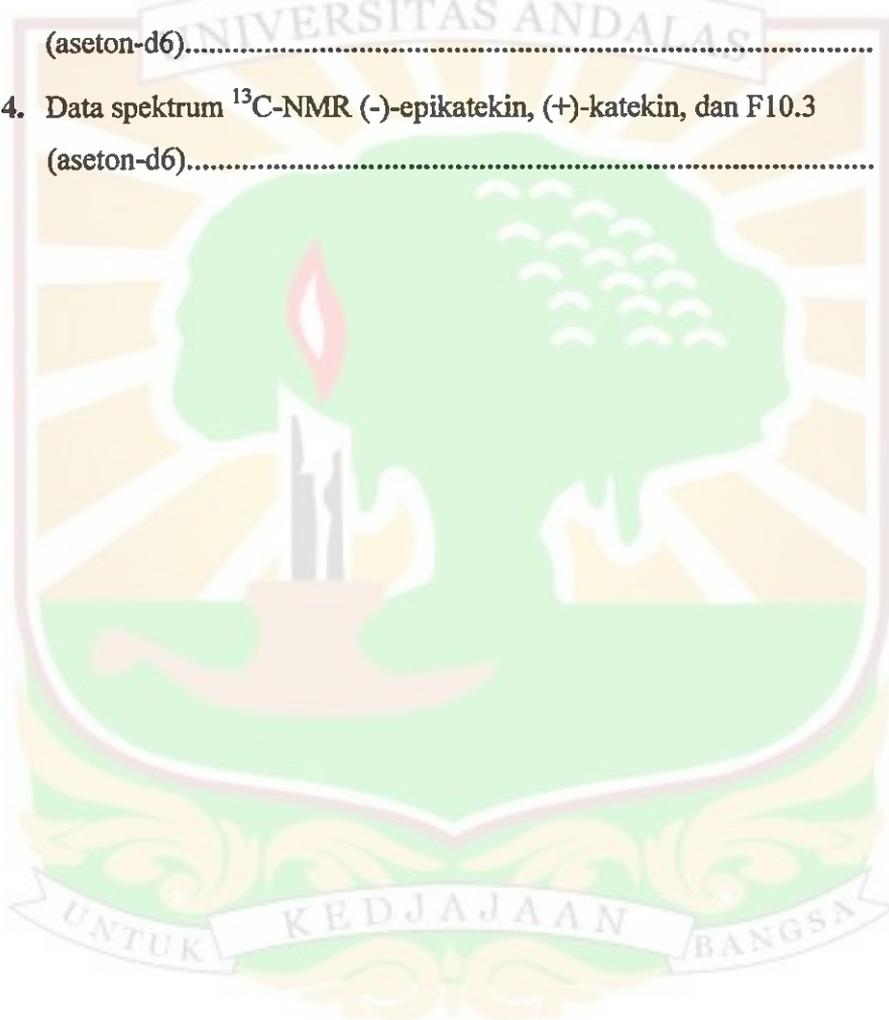
5.1	Kesimpulan.....	30
5.2	Saran.....	30

DAFTAR KEPUSTAKAAN	31
---------------------------------	----

LAMPIRAN	34
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil ekstraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol	21
Tabel 2. Hasil kromatografi kolom sephadex LH-20 dan KLT ekstrak etil asetat	22
Tabel 3. Data spektrum $^1\text{H-NMR}$ (-)-epikatekin, (+)-katekin, dan F10.3 (aseton- d_6).....	24
Tabel 4. Data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ (-)-epikatekin, (+)-katekin, dan F10.3 (aseton- d_6).....	26

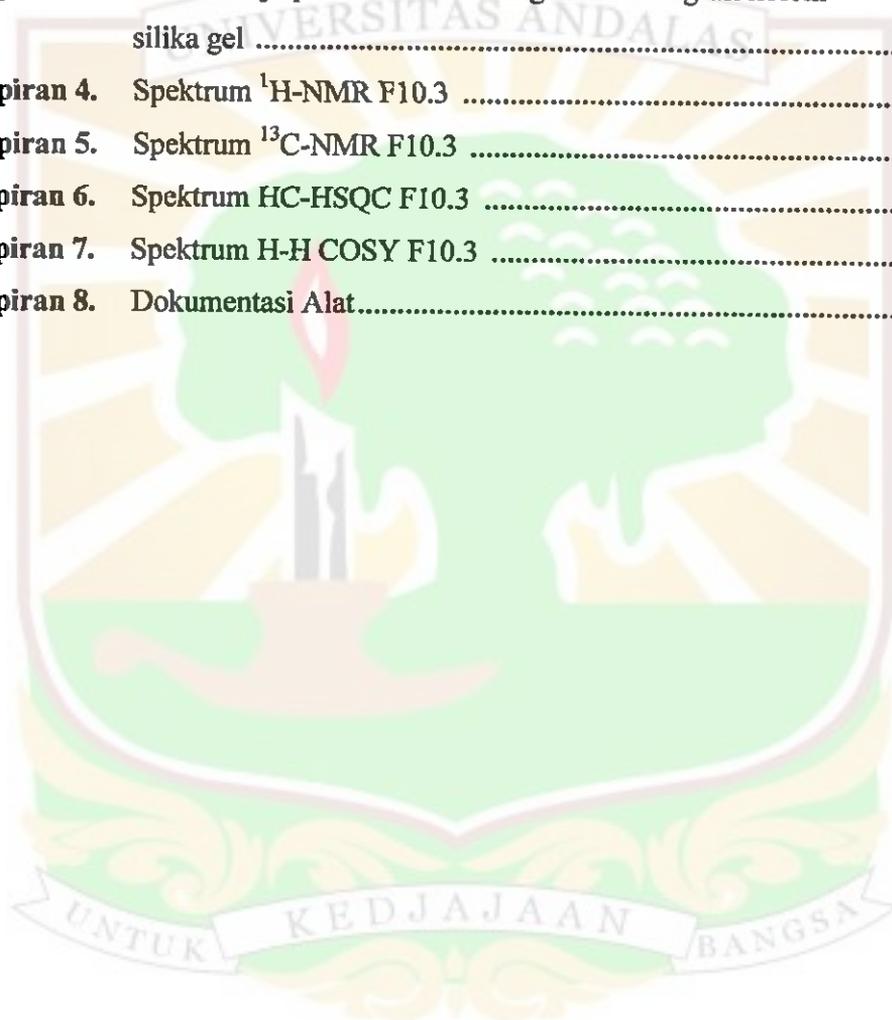


DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tumbuhan <i>Phyllocladus hypophyllus</i>	3
Gambar 2. Struktur senyawa golongan luteolin yang telah diisolasi dari beberapa genus <i>Phyllocladus</i>	5
Gambar 3. Struktur senyawa golongan apigenin yang telah diisolasi dari beberapa genus <i>Phyllocladus</i>	5
Gambar 4. Struktur senyawa golongan quersetin yang telah diisolasi dari beberapa genus <i>Phyllocladus</i>	6
Gambar 5. Struktur senyawa golongan kaempferol 3-glikosida yang telah diisolasi dari beberapa genus <i>Phyllocladus</i>	7
Gambar 6. Struktur senyawa katekin phylloflavan (1) dan turunan phylloflavan (2) yang diisolasi dari tumbuhan <i>Phyllocladus trichomanoides</i>	7
Gambar 7. Struktur senyawa cinchonian 1a (1) dan cinchonian 1b (2) yang diisolasi dari tumbuhan <i>Phyllocladus trichomanoides</i>	8
Gambar 8. Struktur senyawa flavanokumarin (1) dan flavanokumarin 2 (2) yang diisolasi dari tumbuhan <i>Phyllocladus trichomanoides</i>	8
Gambar 9. Struktur senyawa turunan katekin 1 (1) dan turunan katekin 2 (2) yang diisolasi dari tumbuhan <i>Phyllocladus trichomanoides</i>	9
Gambar 10. Struktur senyawa fenilpropanoid 1 (1) dan fenilpropanoid (2) yang diisolasi dari tumbuhan <i>Phyllocladus trichomanoides</i>	9
Gambar 11. Struktur flavonoid (1), isoflavonoid (2), dan neoflavonoid (3).....	10
Gambar 12. Struktur flavan, flavanon, flavon, flavanon, dihidroflavon, flavan-3-ol, flavan-4-ol, flavan-3,4-diol.....	11
Gambar 13. Struktur isoflavan, isoflavon, isoflavanon, isoflav-3-en, isoflavanol, rotenoid, kumestan, 3-arilkumarin, kumaronokromen, kumaronokromon, dan pterokarpan	12
Gambar 14. Struktur 4-arilkumarin, 3,4-dihidro-4-arilkumarin, dan noeflaven..	13
Gambar 15. 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol (epikatekin).....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema kerja ekstraksi sampel daun tumbuhan <i>Phyllocladus hypophyllus</i>	34
Lampiran 2.	Skema kerja pemurnian ekstrak etil asetat dengan menggunakan kromatografi kolom sephadex LH-20	35
Lampiran 3.	Skema kerja pemurnian F10 dengan kromatografi kolom silika gel	36
Lampiran 4.	Spektrum $^1\text{H-NMR}$ F10.3	37
Lampiran 5.	Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ F10.3	38
Lampiran 6.	Spektrum HC-HSQC F10.3	39
Lampiran 7.	Spektrum H-H COSY F10.3	41
Lampiran 8.	Dokumentasi Alat.....	42



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman flora (*biodiversity*) berarti keanekaragaman senyawa kimia (*chemodiversity*) yang kemungkinan terkandung di dalamnya. Hal ini memacu dilakukannya penelitian dan penelusuran senyawa kimia terutama metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan, seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, seperti teknik pemisahan, metode analisis, dan uji farmakologi. Senyawa hasil isolasi yang diperoleh dari tumbuhan bisa berfungsi sebagai bahan baku obat.

Phyllocladus adalah tumbuhan yang tersebar di beberapa belahan dunia termasuk Indonesia. Di Indonesia, tumbuhan ini hanya tersebar di beberapa pulau khususnya di daerah dataran tinggi yaitu sebagian Kalimantan, Sulawesi, Maluku, dan dataran tinggi Papua^[1]. Keanekaragaman *Phyllocladus* yang terbanyak terdapat di New Zealand, sedangkan untuk Indonesia hanya ada satu jenis tumbuhan yang tergabung ke dalam genus *Phyllocladus* yaitu *Phyllocladus hypophyllus*^[2,3].

Senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam genus *Phyllocladus* ini telah lama dan banyak dilaporkan oleh peneliti-peneliti dunia. Diantara senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman ini yang telah dilaporkan adalah katekin, epikatekin^[4] ; phylloflavan^[4,5,6] ; luteolin 7-glikosida, luteolin 3'-glikosida, luteolin 7-ramnosida, luteolin 3'-ramnosida, quersetin 3'-glikosida^[7,8] ; apigenin 7-glukosida, apigenin 4'-glukosida, kaempferol 3-glukosida, quersetin 3-glikosida, quersetin 3-ramnosida^[8] ; flavanokumarin dan flavanofenilpropanoid^[6]. Namun untuk Indonesia, senyawa kimia aktif yang terkandung di dalam tanaman dari genus ini masih belum pernah dilaporkan.

Dikarenakan belum adanya laporan ilmiah tentang senyawa-senyawa kimia yang terkandung di dalam tanaman ini di Indonesia, maka penelitian ini sangat perlu dilakukan. Dalam penelitian kali ini peneliti mengambil sampel tanaman kayu sina atau *Phyllocladus hypophyllus* Hook. f. yang berasal dari daerah dataran tinggi Wamena, Papua.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu senyawa metabolit sekunder apakah yang terdapat pada tumbuhan kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) yang tersebar di Indonesia.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dari daun kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu :

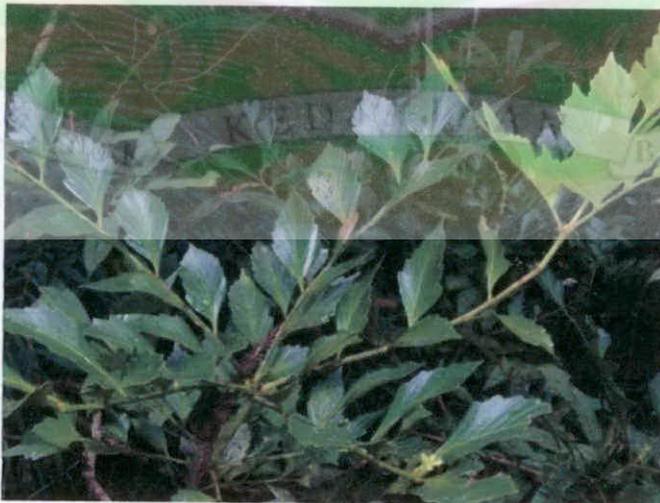
1. Memberikan informasi ilmiah tentang senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) yang ada di Indonesia yang belum pernah dilaporkan sebelumnya.
2. Informasi ilmiah yang dihasilkan dari penelitian ini dapat dijadikan landasan untuk penelitian berikutnya tentang isolasi senyawa metabolit sekunder yang lain yang terdapat pada tumbuhan kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.).

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum *Phyllocladus*

Phyllocladus adalah tanaman yang digolongkan ke dalam family Podocarpaceae. Tanaman ini mempunyai 5 spesies, tumbuh tersebar di beberapa daerah di dunia dan menjadi tanaman endemik dari daerah tersebut. Spesies-spesies tersebut adalah *P.hypophyllus*, tanaman endemik di daerah malesiana timur ; *P.aspleniifolius*, tanaman endemik dari Tasmania, Australia ; *P.alpinus* ; *P.toatoa* ; dan *P.trichomanoides* yang merupakan tanaman endemik dari New Zealand^[8]. Tanaman *Phyllocladus hypophyllus* yang digunakan dalam penelitian ini seperti terlihat pada Gambar 1. Klasifikasi ilmiah tanaman *Phyllocladus hypophyllus* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Division : Pinophyta
Class : Pinopsida
Order : Pinales
Family : Podocarpaceae
Genus : *Phyllocladus*
Spesies : *Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.
(<http://www.biolib.cz/en/taxon/id301413/>)^[9]



Gambar 1. Tumbuhan *Phyllocladus hypophyllus*

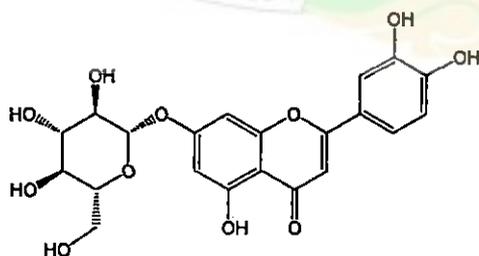
Genus *Phyllocladus* secara luas tersebar di daerah tropis dan subtropis pada bumi belahan timur : Filipina, Kalimantan, Sulawesi, Maluku, New Guinea, Tasmania, dan New Zealand^[10]. Pohon *Phyllocladus hypophyllus* pada umumnya tumbuh pada daerah dengan ketinggian 900-3.600 m. Dalam dunia taksonomi, *Phyllocladus* digolongkan ke dalam gimnospermae. Genus ini memiliki panjang biji 5 mm dan diameter 3-5 mm^[2,3].

Phyllocladus trichomanoides telah digunakan sebagai tanaman obat diantaranya untuk penanganan disentri, hepatitis, dan penyakit kulit^[11]. Dalam penelitian juga terbukti bahwa senyawa phyloflavan yang terkandung di dalam tumbuhan ini merupakan senyawa yang paling banyak memperlihatkan sifat yang bisa mencegah hipertensi^[12].

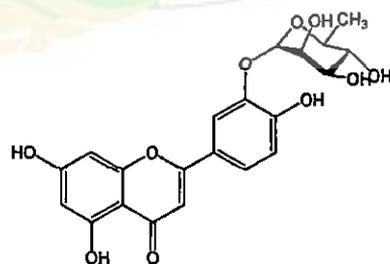
2.2 Kandungan Kimia *Phyllocladus*

Kandungan kimia yang secara merata terdapat di dalam tumbuhan *Phyllocladus* adalah golongan senyawa flavon O-glikosida. Senyawa dominan (senyawa mayor) yang ditemukan dalam *Phyllocladus* adalah luteolin 7-glukosida dan luteolin 3'-ramnosida. Dua senyawa flavon yang pertama kali dilaporkan adalah luteolin 3'-O- α -L-rhamnopyranosida dan luteolin 7-O- α -L-ramnosida^[7].

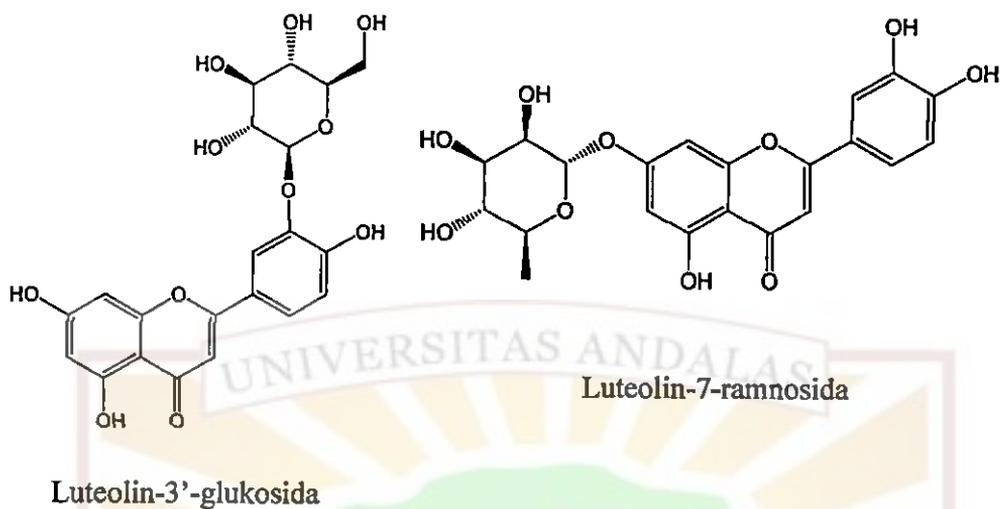
Senyawa-senyawa kimia yang sudah dilaporkan terkandung di dalam tumbuhan *Phyllocladus alpinus*, *P. aff. alpinus* (lowland variant), *P. aff. alpinus* (E. North island variant), *Phyllocladus aspleniifolius*, *Phyllocladus trichomanoides*, *P. aff. trichomanoides* (North cape variant), *Phyllocladus hypophyllus*, dan *Phyllocladus toatoa* adalah golongan senyawa luteolin yaitu luteolin 7-glikosida, luteolin 3'-ramnosida, luteolin 3'-glikosida, dan luteolin 7-ramnosida seperti terlihat pada Gambar 2.



Luteolin-7-glukosida

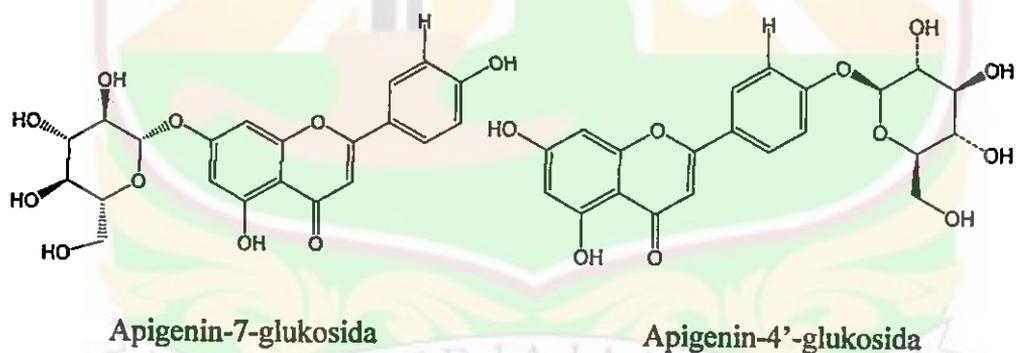


Luteolin-3'-ramnosida



Gambar 2. Struktur senyawa golongan luteolin yang telah diisolasi dari beberapa genus *Phyllocladus*.

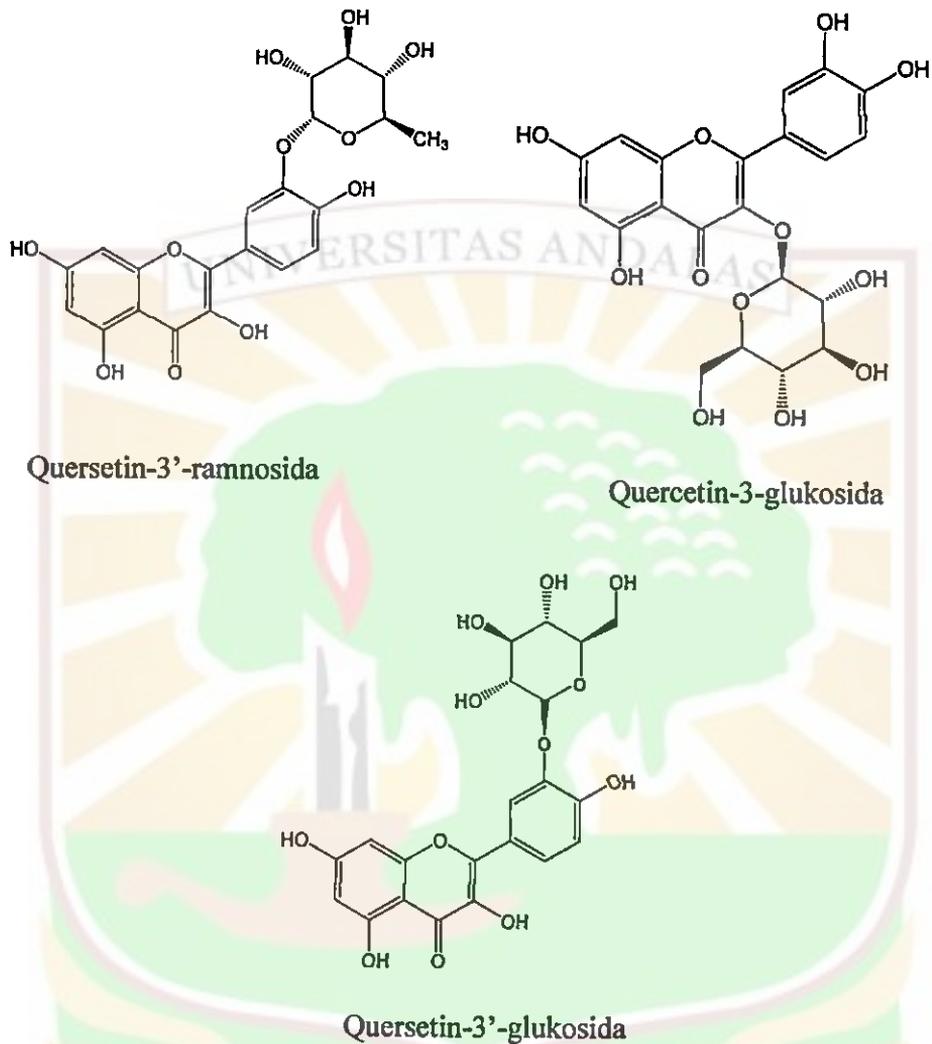
Golongan senyawa lain yang telah diisolasi dari tanaman-tanaman tersebut adalah golongan senyawa apigenin yaitu apigenin 7-glukosida dan apigenin 4-glikosida seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur senyawa golongan apigenin yang telah diisolasi dari beberapa genus *Phyllocladus*.

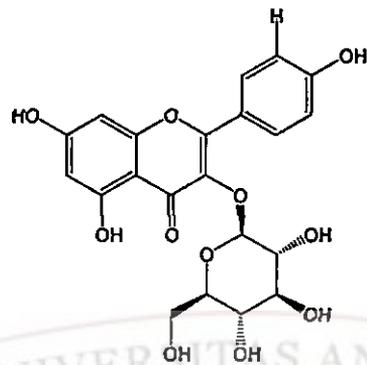
Golongan senyawa quersetin juga dilaporkan telah diisolasi dari 8 jenis tanaman di atas. Golongan senyawa quersetin yang telah dilaporkan tersebut adalah

quersetin 3'-ramnosida, quersetin 3-glikosida, dan quersetin 3'-glikosida yang strukturnya terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur senyawa golongan quersetin yang telah diisolasi dari beberapa genus *Phyllocladus*.

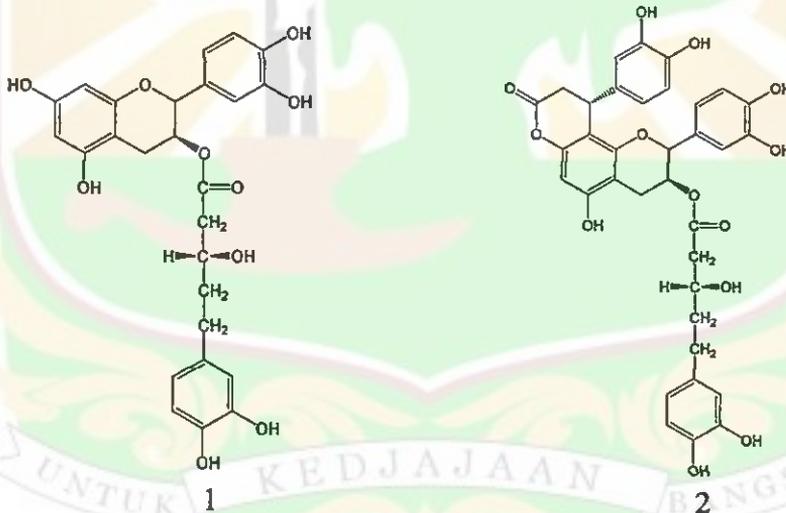
Selain golongan senyawa luteolin, apigenin, dan quersetin, senyawa kaempferol 3-glikosida juga dilaporkan telah diisolasi dari 8 jenis tanaman di atas. Struktur senyawa kaempferol 3-glikosida dapat di lihat pada Gambar 5.



Kaempferol-3-glukosida

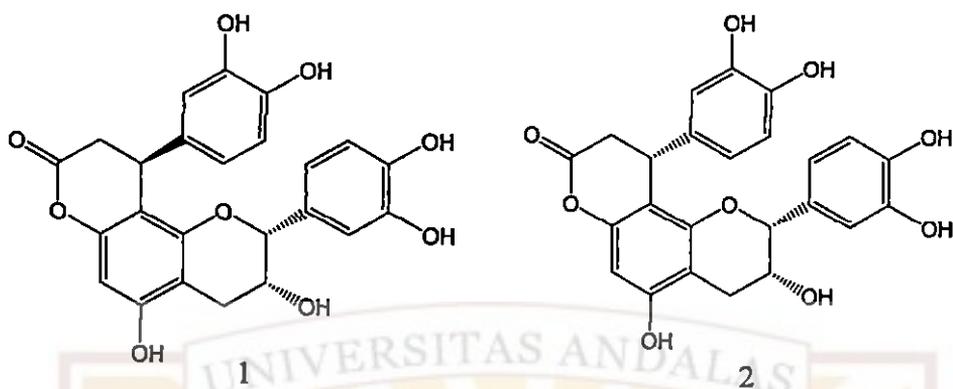
Gambar 5. Struktur senyawa kaempferol 3-glikosida yang telah diisolasi dari beberapa genus *Phyllocladus*.

Phyllocladus trichomanoides juga dilaporkan mengandung senyawa bioaktif golongan phylloflavan yaitu katekin phylloflavan dan senyawa turunan phylloflavan. Struktur senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 6.



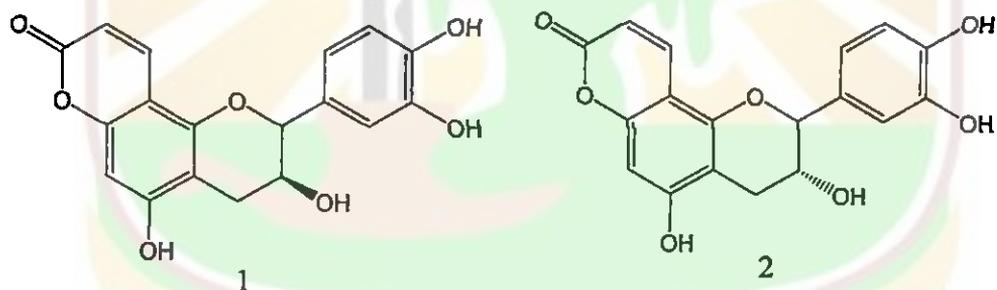
Gambar 6. Struktur senyawa katekin phylloflavan (1) dan turunan phylloflavan (2) yang diisolasi dari tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides*.

Tumbuhan ini juga mengandung senyawa golongan cinchonian yaitu cinchonian 1a dan cinchonian 1b. Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 7.



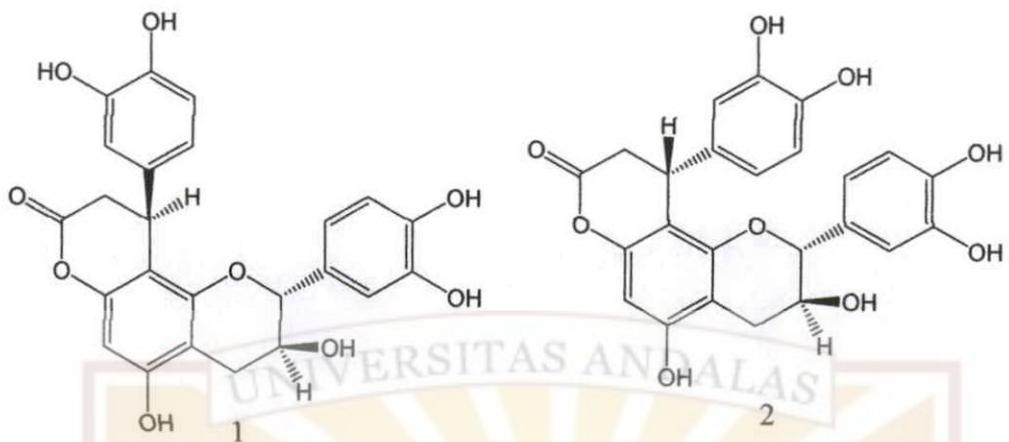
Gambar 7. Struktur senyawa cinchonian 1a (1) dan cinchonian 1b (2) yang diisolasi dari tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides*.

Berikutnya, tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides* juga mengandung senyawa golongan flavanokumarin yaitu flavanokumarin 1 dan flavanokumarin 2. Strukturnya dapat dilihat pada Gambar 8.



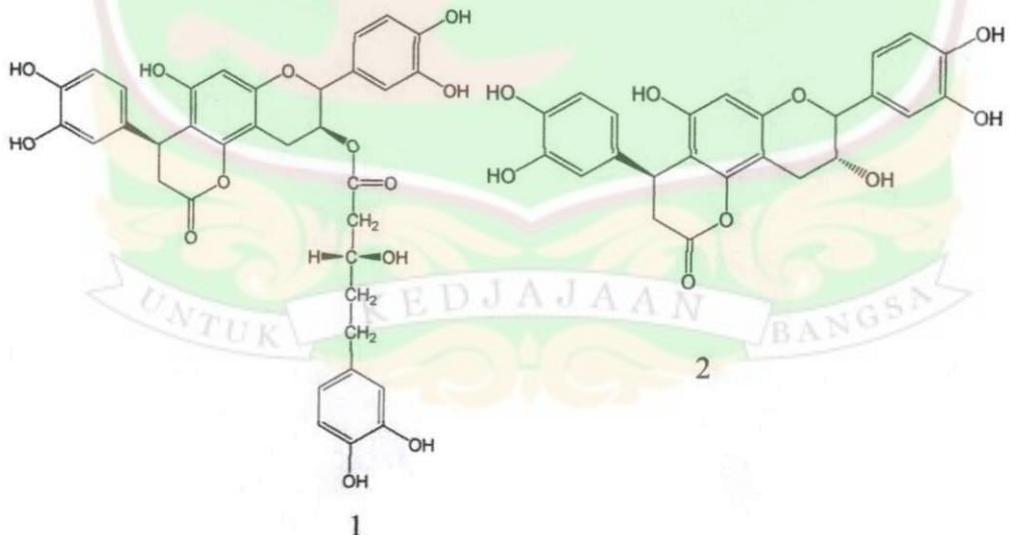
Gambar 8. Struktur senyawa flavanokumarin 1 (1) dan flavanokumarin 2 (2) yang diisolasi dari tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides*.

Selanjutnya, tumbuhan ini juga dilaporkan mengandung senyawa golongan turunan katekin, yaitu turunan katekin 1 dan turunan katekin 2. Struktur senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur senyawa turunan catekin 1 (1) dan turunan catekin 2 (2) yang diisolasi dari tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides*.

Selain mengandung senyawa golongan phylloflavan, golongan cinchonian, golongan flavanokumarin, dan turunan catekin, tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides* juga dilaporkan mengandung senyawa golongan fenilpropanoid yaitu fenilpropanoid 1 dan fenilpropanoid 2. Struktur senyawa-senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 10.^[6]

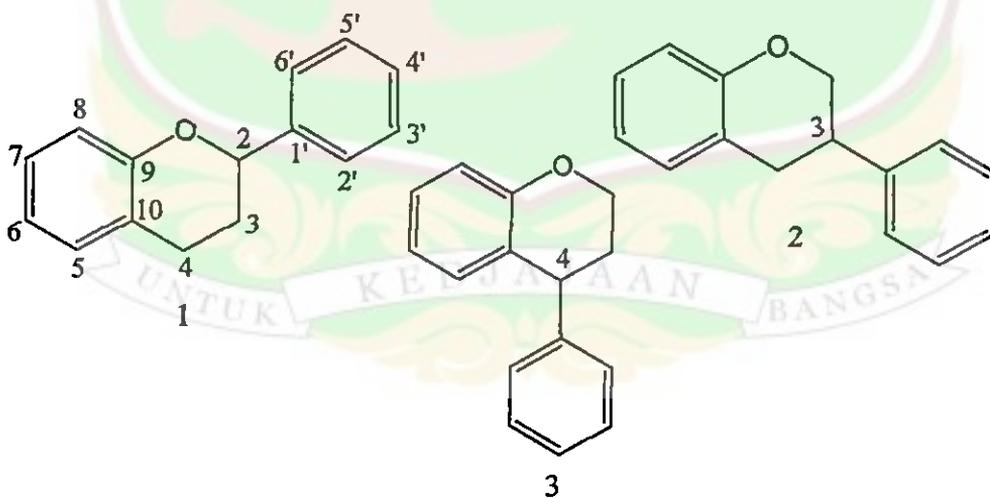


Gambar 10. Struktur senyawa fenilpropanoid 1 (1) dan fenilpropanoid (2) yang diisolasi dari tumbuhan *Phyllocladus trichomanoides*.

Beberapa senyawa yang juga dilaporkan terdapat di dalam genus *Phyllocladus* tertentu : diterpen phyllocladen dari *Phyllocladus aspleniifolius*^[13] dan *Phyllocladus alpinus*^[14] ; antosianin sianidin 3-O-glukosida dalam tumbuhan *Phyllocladus aspleniifolius*^[15] dan *Phyllocladus alpinus*, *Phyllocladus hypophyllus*, dan *Phyllocladus trichomanoides*^[16] ; sejumlah biflavon terdapat dalam *Phyllocladus toatoa* dan *Phyllocladus trichomanoides*^[17] ; beberapa diterpenoid terdapat dalam *Phyllocladus trichomanoides*^[18] dan dari *Phyllocladus toatoa*^[19] ; n-alkana terdapat pada permukaan lilin *Phyllocladus toatoa* dan *Phyllocladus trichomanoides*^[20] ; dan flavonol terdapat pada kelima spesies *Phyllocladus* tersebut^[4].

2.3 Flavonoid^[21]

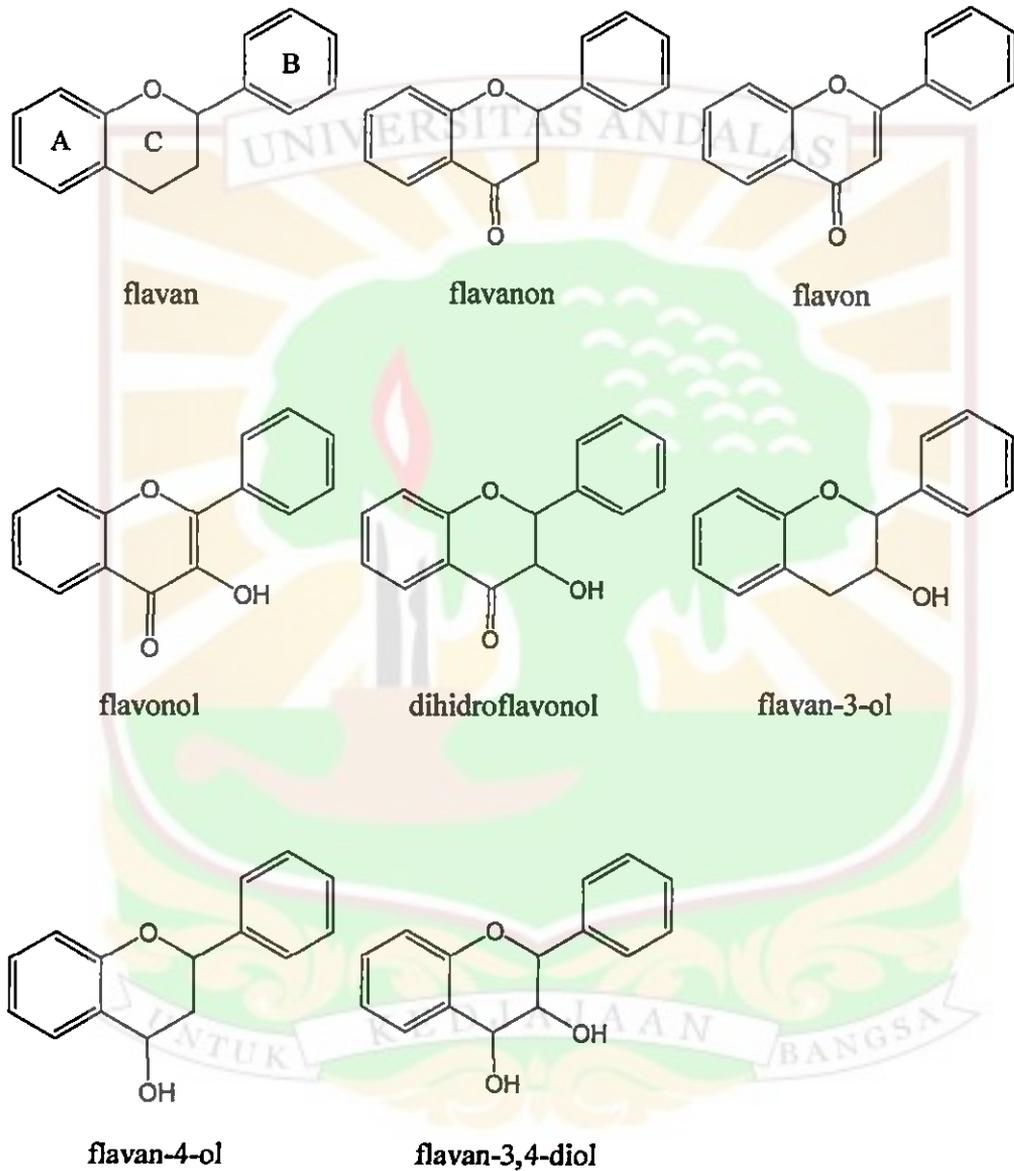
Flavonoid secara umum adalah istilah yang digunakan untuk mendiskripsikan senyawa bahan alam yang memiliki kerangka karbon C6-C3-C6. Berdasarkan posisi cincin aromatik pada kerangka benzopirannya, senyawa bahan alam dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu flavonoid (2-fenilbenzopiran), isoflavonoid (3-benzopiran), dan neoflavonoid (4-benzopiran). Strukturnya seperti terlihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Struktur flavonoid (1), isoflavonoid (2), dan neoflavonoid (3).

2.3.1 2-fenilbenzopiran

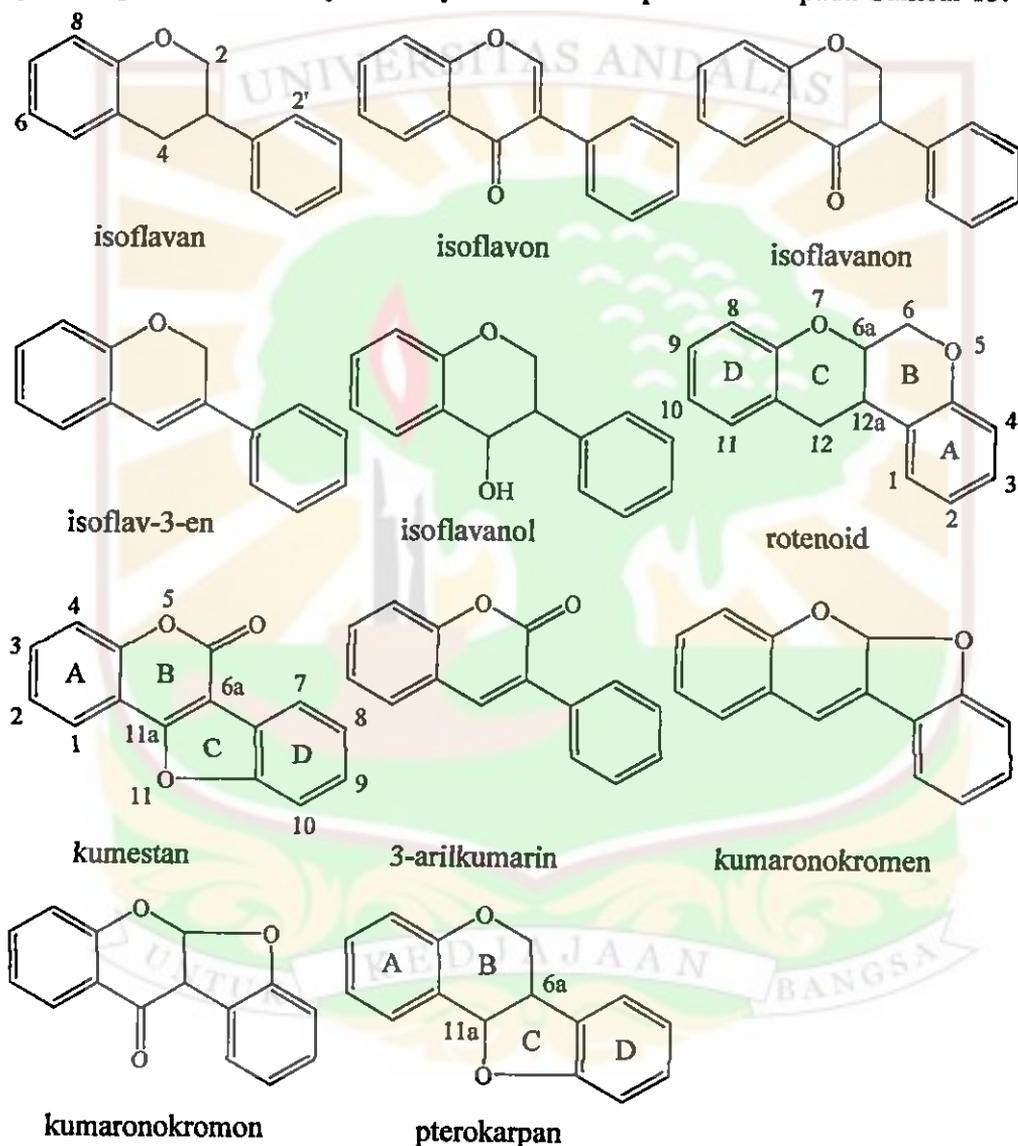
Berdasarkan derajat oksidasi dan kejenuhan pada cincin heterosiklik C, flavonoid dibagi menjadi flavan, flavanon, flavon, flavonol, dihidroflavonol, flavan-3-ol, flavan-4-ol, flavan-3,4-diol. Strukturnya seperti terlihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Struktur flavan, flavanon, flavon, flavonol, dihidroflavonol, flavan-3-ol, flavan-4-ol, flavan-3,4-diol.

2.3.2 Isoflavonoid

Isoflavonoid adalah subkelas khusus dari flavonoid. Senyawa ini mempunyai kerangka 3-fenil pada cincin alifatiknya. Senyawa ini dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu isoflavan, isoflavin, isoflavanon, isoflav-3-en, isoflavanol, rotenoid, kumestan, 3-arilkumarin, kumaronokromen, kumaronokromon, dan pterokarpan. Struktur senyawa-senyawa tersebut seperti terlihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Struktur isoflavan, isoflavin, isoflavanon, isoflav-3-en, isoflavanol, rotenoid, kumestan, 3-arilkumarin, kumaronokromen, kumaronokromon, dan pterokarpan.

2.3.3 Neoflavonoid

Neoflavonoid adalah subkelas dari flavonoid yang mempunyai kerangka 4-fenil pada cincin alifatiknya. Senyawa ini dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu 4-arilkumarin, 3,4-dihidro-4-arilkumarin, dan noeflaven. Struktur senyawa-senyawa tersebut seperti terlihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Struktur 4-arilkumarin, 3,4-dihidro-4-arilkumarin, dan noeflaven.

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan bagian yang aktif untuk kesehatan dari tanaman atau jaringan hewan dari bagian yang tidak aktif atau bagian yang iner dengan menggunakan pelarut yang selektif dalam prosedur standar ekstraksi [22]. Teknik ekstraksi ini biasa digunakan oleh para ahli kimia tanaman dalam mendapatkan atau mengumpulkan senyawa-senyawa bioaktif dari tanaman. Ada banyak jenis teknik ekstraksi yang sudah dikembangkan oleh para pakar kimia tanaman diantaranya maserasi, sokletasi, perkolasi, ekstraksi pelarut, dan destilasi.

Dari beberapa teknik ekstraksi, maserasi adalah teknik ekstraksi yang paling sering digunakan karena prosesnya yang sederhana dan ekonomis. Maserasi atau perendaman merupakan teknik pengekstraksian yang paling klasik. Sampel yang telah dihaluskan, direndam dalam pelarut organik selama 3 – 5 hari. Kemudian disaring, dan hasilnya didapat berupa filtrat. Perendaman dilakukan berulang-ulang sehingga sampel terekstrak secara sempurna.

Pada penelitian ini proses maserasi atau perendaman dilakukan dengan menggunakan sistem kepolaran bertingkat yaitu proses maserasi dilakukan dengan

menggunakan pelarut yang bersifat non polar terlebih dahulu, yaitu n-heksana untuk menarik lemak, lignin dan komponen yang bersifat non polar. Selanjutnya disaring sehingga didapatkan ampas dan filtrat n-heksana. Proses maserasi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut yang bersifat semi polar yaitu etil asetat untuk menarik komponen yang bersifat semi polar. Setelah itu disaring kembali sehingga didapatkan filtrat etil asetat dan ampas. Terakhir perendaman dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol untuk menarik komponen yang bersifat polar. Selanjutnya dipisahkan ampas dan filtratnya.

Filtrat hasil maserasi tadi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Penguapan pelarut dengan menggunakan *rotary evaporator* dipercepat dengan adanya gerakan berputar dari labu rotari sehingga akan memperluas bidang permukaan sampel. Dalam keadaan vakum, tekanan uap pelarut akan turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur yang lebih rendah dari titik didih normalnya.

2.5 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan dimana molekul-molekul komponen (solut) di dalam campuran sampel ditransformasikan oleh fasa gerak di atas suatu fasa diam^[23]. Fasa gerak yang digunakan bisa dalam bentuk gas atau cairan (sistem pelarut) dan fasa diam yang digunakan bisa dalam bentuk lapisan cairan di atas sebuah material iner atau bisa juga berbentuk padatan. Solut, fasa gerak, dan fasa diam berbentuk sistem ternary. Interaksi terjadi antara solut dan fasa diam sehingga solut didistribusikan antara fasa diam dan fasa gerak. Daya tarik yang terjadi antara solut dan fasa diam menghasilkan hambatan dalam pergerakannya pada sistem kromatografi. Komponen-komponen yang berbeda (solut) akan bergerak dengan laju yang berbeda sehingga masing-masingnya akan memiliki daya tarik yang berbeda pada fasa diam dan juga fasa gerak. Masing-masing komponen didistribusikan pada kedua fasa tersebut dengan tercapainya suatu kesetimbangan yang disebut perbandingan distribusi. Perbandingan antara konsentrasi komponen persatuan volume pada fasa diam dan perbandingan

konsentrasi komponen persatuan volume pada fasa gerak dikenal dengan konstanta distribusi (K).

Suatu komponen dalam campuran sampel akan didistribusikan antara fasa gerak dan fasa diam berdasarkan konstanta distribusinya akan tercapai jika komponen tersebut melewati sistem kromatografi. Ketika fasa gerak dijalankan komponen yang akan keluar terlebih dahulu adalah komponen yang konstanta distribusinya (K) paling kecil, demikian berurut sampai kepada komponen yang mempunyai konstanta distribusi terbesar.

Senyawa bahan alam biasanya tidak berada dalam bentuk murni tetapi berada dalam bentuk campuran. Untuk itu dibutuhkan usaha untuk memurnikan atau memisahkan senyawa-senyawa tersebut. Untuk memisahkan masing-masing komponen bahan alam ini digunakan teknik kromatografi. Diantara teknik-teknik kromatografi yang paling sering digunakan untuk memurnikan senyawa bahan alam tersebut adalah teknik kromatografi lapisan tipis, kromatografi liquid solid, dan kromatografi eksklusi [24].

Untuk memisahkan senyawa dalam jumlah besar (lebih dari 1 gram) dapat digunakan kromatografi kolom. Fasa diam yang digunakan dapat berupa silika gel, sedangkan fasa geraknya dapat dimulai dari pelarut yang kepolaran ditingkatkan secara bertahap, baik dengan pelarut tunggal atau kombinasi dua pelarut berbeda yang kepolarannya sesuai dengan tingkat kepolaran yang dibutuhkan. Eluat yang keluar dari kolom kromatografi ditampung dan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT), fraksi-fraksi yang nilai R_f sama digabung. [25]

2.6 Resonansi Magnet Inti (NMR)

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) adalah salah satu metoda yang sangat penting dalam menentukan suatu struktur senyawa kimia. Nuclear Magnetic Resonance adalah suatu teknik spektroskopi yang bisa mempelajari karakteristik inti atom dalam suatu senyawa. Sifat tersebut berhubungan dengan sifat magnet inti atom tersebut. Masing-masing inti atom memiliki sifat magnet yang berbeda, sehingga semua informasi tentang atom tersebut dapat diketahui. Dengan

menggunakan data-data ini struktur suatu senyawa dapat ditentukan. Ada beberapa bagian dalam spektroskopi NMR yaitu $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMQC, HMBC, H-H Cosy.

2.6.1. Proton NMR ($^1\text{H-NMR}$)

Proton NMR adalah suatu teknik NMR yang dapat mempelajari karakteristik-karakteristik atom hidrogen dalam suatu senyawa. Beberapa informasi yang bisa diperoleh dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ yaitu :

1. Banyaknya jenis lingkungan hidrogen yang berbeda dalam satu molekul.
2. Banyak atom hidrogen yang ada pada masing-masing lingkungan hidrogen tersebut.
3. Banyaknya atom hidrogen pada suatu atom karbon.

Suatu elektron akan memberikan medan perlindungan pada suatu inti atom dari suatu medan magnet yang berasal dari luar, dan masing-masing atom hidrogen akan mengalami perlindungan (shielding) yang berbeda-beda^[26]. Akibatnya masing-masing proton yang mempunyai lingkungan kimia yang berbeda akan keluar pada daerah yang berbeda dalam suatu spektrum $^1\text{H-NMR}$. Besarnya efek shielding tergantung pada kerapatan elektron yang mengelilingi proton^[27]. Hal ini dapat menjadi petunjuk dalam menentukan struktur suatu senyawa kimia.

2.6.2. Karbon NMR ($^{13}\text{C-NMR}$)

Spektrum karbon dapat digunakan untuk menentukan jumlah dari karbon yang tidak ekuivalen dan untuk mengidentifikasi tipe atom karbon (metil, metilen, aromatik, karbonil, dan lain-lain) yang mungkin terdapat dalam suatu senyawa^[28]. Dengan demikian, karbon NMR menyediakan langsung informasi tentang kerangka karbon dari suatu molekul. Dalam spektroskopi karbon NMR juga dikenal istilah shielding dan deshielding. Efek shielding pada karbon NMR juga dipengaruhi oleh kerapatan elektron pada suatu atom karbon. Jika suatu gugus donor elektron terikat pada suatu gugus alkena atau aromatik, maka atom karbon pada posisi β akan mengalami efek shielding, sedangkan pada gugus alkena atau

aromatik tersebut terikat gugus akseptor elektron maka atom karbon pada posisi β akan mengalami efek deshielding^[26]. Peristiwa ini akan berpengaruh pada pergeseran kimia atom karbon pada spektrum karbon NMR.

2.6.3. HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

Heteronuclear Multiple Quantum Coherence adalah suatu teknik NMR yang menentukan korelasi antara proton dan karbon (invers). Keuntungan penentuan korelasi secara invers ini adalah inti yang diukur memiliki γ yang sangat tinggi sehingga menghasilkan sensitifitas yang juga sangat tinggi^[27]. Dengan demikian pengukuran dapat dilakukan dalam waktu singkat. HMQC atau HSQC memberikan informasi tentang korelasi karbon dan proton dengan jarak satu ikatan^[25]. Sehingga, bisa disimpulkan proton yang berkorelasi dengan suatu atom karbon adalah proton yang berikatan langsung dengan karbon tersebut.

2.6.4. HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)

Heteronuclear multiple Bond Coherence (HMBC) adalah suatu teknik NMR yang dapat memberikan informasi tentang korelasi proton dan atom karbon yang berjarak dua dan tiga ikatan^[27]. Dengan demikian teknik ini juga bisa digunakan untuk mendapatkan informasi tentang atom karbon yang tidak memiliki proton (atom karbon quarterner)^[26].

2.6.5. H-H COSY

H-H Cosy adalah suatu teknik NMR yang dapat memberikan informasi tentang korelasi yang terjadi antara proton-proton. Sehingga dengan data ini bisa diketahui posisi proton-proton tersebut dalam suatu senyawa. Data ini sangat memudahkan suatu proses elucidasi struktur molekul organik.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Januari 2012 sampai dengan April 2012 di Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi LIPI Cibinong.

3.2 Material Tumbuhan

Material tumbuhan berupa daun tumbuhan kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) yang dikoleksi dari Daratan Tinggi Wamena, Papua dan diidentifikasi oleh Dr. Ary P. Keim.

3.3 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu : kolom kromatografi, plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, *chamber*, tabung reaksi (Pyrex), neraca analitik (And HR-202i), UV cabinet (Camag), labu evaporator (Pyrex), *rotary evaporator* (Heidolph WB 2000), *hot plate* (Cimarec 2), corong pisah, pipet tetes, dan *freeze dryer* (Eyela FDU-1200).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : silika gel 70-230 mesh (Merck), sephadex LH-20, n-heksan, etil asetat, metanol, etanol, kloroform, diklorometan, larutan vanilin.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Maserasi

Sampel kering dan halus daun kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) seberat 495,12 g di ekstraksi dengan menggunakan metoda maserasi dengan sistem kepolaran bertingkat. Maserasi pertama dilakukan dengan menggunakan 2,5 Liter n-heksana, dikocok dan dibiarkan selama 3 hari pada suhu ruang. Selanjutnya, hasil maserasi disaring dan ditampung dengan erlenmeyer. Maserasi dengan pelarut n-heksana ini dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Ampas sisa

perendaman dimaserasi kembali dengan menggunakan 2,5 Liter pelarut etil asetat, dikocok, dibiarkan dalam suhu ruang selama 3 hari, dan disaring. Maserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat juga dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Maserasi terakhir dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dengan cara yang sama.

Ekstrak dari masing-masing pelarut dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 35°C-40°C, sehingga diperoleh ekstrak kental n-heksana, ekstrak kental etil asetat, dan ekstrak kental metanol. kemudian proses pemurnian dilanjutkan pada ekstrak etil asetat. Skema kerja dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

3.4.2 Kromatografi Kolom

Ekstrak etil asetat seberat kurang lebih 300 mg dimurnikan dengan menggunakan metoda kromatografi kolom dengan menggunakan sephadex LH-20 sebagai fasa diam. Fasa gerak yang digunakan adalah etanol. Fraksi-fraksi yang keluar ditampung dengan menggunakan tabung reaksi dan masing-masing tabung reaksi dianalisa pola pemisahan nodanya dengan menggunakan KLT. Fraksi-fraksi yang mempunyai noda sama digabung menjadi satu, lalu dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi-fraksi yang didapat ditimbang dan dianalisa kembali pola pemisahan nodanya dengan menggunakan KLT. Skema kerja dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

Fraksi yang jumlahnya lebih banyak dan pola pemisahan nodanya paling baik, dimurnikan kembali dengan metoda kromatografi kolom menggunakan silika gel sebagai fasa diam dan dielusi dengan eluen kloroform : metanol (4 : 1). Fraksi-fraksi yang keluar ditampung dengan menggunakan tabung reaksi dan dianalisa pola pemisahan nodanya dengan menggunakan KLT. Fraksi-fraksi yang mempunyai pola noda yang sama digabung menjadi satu dan dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*. Fraksi-fraksi yang didapatkan ditimbang dan dianalisa kembali pola pemisahan nodanya dengan menggunakan KLT. Fraksi yang pola nodanya bulat dan tunggal ditentukan struktur molekulnya. Skema kerja dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

3.4.3 Penentuan Struktur Molekul

Senyawa murni yang didapatkan, ditentukan struktur molekulnya dengan menggunakan NMR. Spektrum NMR yang diukur meliputi spektrum ^{13}C -NMR, spektrum ^1H -NMR, HC-HSQC, dan H-H COSY.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Maserasi

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol secara berturut-turut dilakukan sebanyak 5 kali terhadap 495,12 gram sampel daun kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) bertujuan untuk mendapatkan semua senyawa-senyawa metabolit sekunder yang memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol. Hasil dari ekstraksi dengan n-heksana, etil asetat, dan metanol didapatkan tiga fraksi seperti tercantum pada Tabel 1. Masing-masing fraksi diidentifikasi dengan menggunakan KLT.

Tabel 1. Hasil ekstraksi n-heksana, etil asetat, dan metanol

No	Ekstrak	Berat (g)	Rendemen (%)	Warna
1	n-heksana	18,195	3,7	Hijau kecoklatan
2	Etil asetat	53,0495	10,7	Kecoklatan
3	Metanol	140,928	28,5	Kecoklatan

Dari tabel hasil ekstraksi di atas terlihat bahwa ekstrak metanol yang didapat lebih banyak dari ekstrak etil asetat, dan ekstrak etil asetat yang didapat lebih banyak dari n-heksana. Hal ini disebabkan oleh proses ekstraksi masing-masing pelarut yang tidak sempurna. Sehingga, komponen non polar yang tidak terekstrak pada saat perendaman dengan n-heksana, terekstrak pada saat perendaman dengan etil asetat. Hal ini juga terjadi pada saat maserasi dengan menggunakan metanol.

4.2. Kromatografi Kolom

Ekstrak etil asetat seberat 309,2 mg dipisahkan dengan metoda kromatografi kolom menggunakan fasa diam sephadex LH-20 dengan eluen etanol. Tidak ditemukannya fasa gerak yang cocok untuk pemisahan ekstrak etil asetat dengan fasa diam silika gel menjadi alasan digunakannya sephadex LH-20 sebagai fasa diam. Sebanyak 13 fraksi didapatkan dari hasil KLT dan penggabungan eluat. Kemudian, ketigabelas fraksi tersebut dievaporasi dan di-KLT kembali. Hasil kromatografi kolom dan KLT dari ekstrak etil asetat dicantumkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil kromatografi kolom dan uji KLT dari hasil kromatografi kolom sephadex LH-20.

No	Fraksi	Kromatogram	Berat (mg)
1	F1	- 2 noda terpisah baik - 2 noda tidak terpisah dengan baik - 1 noda tailing	16,5
2	F2	- 2 noda terpisah baik - 3 noda tidak terpisah dengan baik	22,6
3	F3	- 1 noda terpisah baik - 3 noda tidak terpisah dengan baik	1,5
4	F4	- 1 noda terpisah baik - 3 noda tidak terpisah dengan baik	3,1
5	F5	- 1 noda terpisah baik - 2 noda tailing	1,1
6	F6	- 1 noda terpisah baik - 4 noda tidak terpisah dengan baik	1,6
7	F7	- 3 noda terpisah baik	1,2
8	F8	- 3 noda tidak terpisah dengan baik - 1 noda tailing	2,1
9	F9	- 3 noda terpisah baik	4,7
10	F10	- 4 noda terpisah baik	67,8
11	F11	- 3 noda tidak terpisah dengan baik - 1 noda tailing	4,7
12	F12	- 1 noda terpisah baik - 2 noda tailing	76,3
13	F13	- 1 noda terpisah baik - 2 noda tailing	7,2

Dari tabel di atas dapat terlihat bahwa ada dua fraksi yang jumlahnya jauh lebih banyak dari fraksi yang lain yaitu F10 dan F12. Namun dari pola noda pada plat KLT, F12 menunjukkan adanya 2 noda yang tailing. Dengan demikian, fraksi yang menjadi prioritas untuk pemurnian berikutnya adalah F10.

Pemurnian F10 dilanjutkan dengan menggunakan kromatografi kolom silika gel. Fasa gerak yang digunakan adalah kloroform-metanol (4:1). Kloroform-metanol (4:1) digunakan sebagai fasa gerak karena memperlihatkan pola pemisahan noda yang baik untuk F10 pada plat KLT. Sebanyak 85 tabung reaksi didapat dari hasil kromatografi kolom F10. Masing-masing tabung reaksi dianalisa pola pemisahan nodanya dengan KLT. Tabung reaksi yang memiliki pola dan banyak noda yang sama digabung dan dievaporasi dengan *rotary evaporator*. Dari hasil penggabungan ini didapat 5 fraksi (F10.1; 1,2 mg, F10.2; 1,5 mg, F10.3; 46,8 mg, F10.4; 2,3 mg, dan F10.5; 15,3 mg). Fraksi-fraksi tersebut dianalisa kembali pola nodanya dengan KLT. Hasil KLT ini menunjukkan bahwa F10.3 mempunyai pola noda bulat dan tunggal yang mengindikasikan senyawa tersebut relatif murni.

4.3. Penentuan Struktur Molekul

Penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan Nuclear Magnetic Resonance (^{13}C -NMR, ^1H -NMR), ^1H - ^{13}C Heteronuclear Single Quantum Coherence (HC-HSQC), dan H-H Homonuclear Correlation Spectroscopy (H-H COSY).

4.3.1. Spektroskopi ^1H -NMR (^1H -Nuclear Magnetic Resonance)

Pada saat indentifikasi dengan KLT dengan menggunakan larutan penampak noda vanilin, senyawa ini menunjukkan sifat yang sangat sensitif dan noda berwarna merah. Dari data ini, diasumsikan bahwa senyawa ini adalah flavonoid^[4]. Data pergeseran kimia pada spektrum ^1H -NMR juga menunjukkan hal ini.

Analisis ^1H -NMR F10.3 dilakukan pada kondisi : pelarut aseton- d_6 , dengan frekuensi yang digunakan adalah 500MHz. Data spektrum ^1H -NMR pembanding dan F10.3 dicantumkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data spektrum $^1\text{H-NMR}$ (-)-epikatekin, (+)-katekin, dan F10.3 (aseton- d_6)

H	Pergeseran kimia (ppm)		
	(-)-epikatekin*	(+)-katekin**	Fraksi 10.3
H-2	4,87 (1H, s)	4,54 (1H, d, J = 7,0)	4,84 (1H, s)
H-3	4,02(1H, t, J = 2,8 Hz)	3,99 (1H, m)	4,165 (1H, broad d)
H-4a	2,73 (1H, dd, J = 3,2 ; 16,8 Hz)	2,44 (1H, dd, J = 8,0 ; 16,0)	2,70 (1H, dd, J = 3,2 ; 16,6 Hz)
H-4b	2,85 (1H, dd, J = 4,8 ; 16,8 Hz)	2,76 (1H, dd, J = 6,0 ; 16,0)	2,82 (1H, dd, J = 4,7 ; 16,7 Hz)
H-6	6,01 (1H, d, J = 2,2 Hz)	5,95 (1H, d, J = 2,0)	5,985 (1H, d, J = 2,2 Hz)
H-8	5,91 (1H, d, J = 2,2 Hz)	5,82 (1H, d, J = 2,0)	5,88 (1H, d, J = 2,2 Hz)
H-2'	7,04 (1H, d, J = 1,8 Hz)	6,81 (1H, d, J = 2,0)	7,01 (1H, d, J = 1,9 Hz)
H-5'	6,78 (1H, d, J = 8,2 Hz)	6,75 (1H, d, J = 8,0)	6,75 (1H, d, J = 8,1 Hz)
H-6'	6,83 (1H, dd, J = 1,8 ; 8,2 Hz)	6,68 (1H, dd, J = 2,0 ; 8,0)	6,80 (1H, dd, J = 1,9 ; 8,3 Hz)

* Han *et al*, 2003^[29]

** Watanabe, 1998^[33]

Proton H-2 muncul pada pergeseran kimia 4,84 ppm (1H, s) dan proton H-3 pada 4,165 ppm (1H, broad d), ini menunjukkan bahwa kedua sinyal tersebut adalah proton alifatik. Pergeseran kimia 2,70 ppm (1H, dd, J = 3,2 ; 16,6 Hz) dan 2,82 ppm (1H, dd, J = 4,7 ; 16,7 Hz) menunjukkan adanya dua proton yang terikat pada 1 atom C (C-4) yang masing-masing proton saling mengkopling (kopling geminal). Ini mengindikasikan bahwa senyawa ini flavonoid dari golongan flavan-3-ol^[30].

Spektrum ini juga menunjukkan adanya puncak yang muncul pada pergeseran kimia 5,985 ppm (1H, d, $J = 2,2$ Hz) dan 5,88 ppm (1H, d, $J = 2,2$ Hz). Dari nilai pergeseran kimianya diketahui bahwa kedua puncak ini adalah puncak proton aromatis pada cincin A. Munculnya puncak-puncak ini dengan nilai $J = 2,2$ Hz menunjukkan bahwa kedua proton ini berorientasi meta yaitu H-6 dan H-8. Sehingga letak substituen pada cincin A adalah pada C-5 dan C-7. Analisis $^1\text{H-NMR}$ berikutnya memperlihatkan ada 3 puncak yang muncul pada pergeseran kimia 7,01 (1H, d, $J = 1,90$ Hz), 6,75 (1H, d, $J = 8,1$ Hz), dan pada 6,80 (1H, dd, $J = 1,9 ; 8,3$ Hz). Puncak-puncak ini adalah puncak proton pada cincin aromatis B. Nilai $J = 1,90$ Hz menunjukkan adanya proton yang berorientasi meta. Nilai $J = 8,1$ Hz menunjukkan adanya proton yang berorientasi orto. Sedangkan nilai $J = 1,9 ; 8,3$ Hz menunjukkan adanya proton yang berorientasi meta sekaligus berorientasi orto. Puncak-puncak tersebut adalah puncak H-2', H-5', dan H-6'. Data ini menunjukkan substituen pada cincin B terletak pada C-3' dan C-4'. Substituen-substituen tersebut adalah gugus $\text{OH}^{[31]}$. Puncak-puncak tersebut merupakan cirikhas senyawa 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol $^{[32]}$.

Pada pergeseran kimia disekitar 8,00 ppm muncul 3 puncak proton dan pada pergeseran kimia 3,545 ppm muncul 1 puncak doublet, puncak-puncak ini dimungkinkan adalah puncak proton pada OH fenolik dan pada OH alifatik $^{[26,28]}$. Pada spektrum ini juga ditemukan 2 puncak singlet yang sangat mencolok yaitu pada pergeseran kimia 2,05 ppm dan 2,94 ppm. Menurut Silverstein *et al.* (2005) $^{[27]}$ puncak ini adalah puncak proton pelarut dan air. Sedangkan, puncak yang muncul pada 3,275 ppm dan puncak-puncak kecil lainnya, diperkirakan adalah puncak-puncak impurty yang masih terdapat di dalam F10.3. Namun puncak-puncak ini tidak begitu dominan.

Pembandingan spektrum $^1\text{H-NMR}$ F10.3 dengan spektrum $^1\text{H-NMR}$ (-)-epikatekin dan (+)-katekin memperlihatkan bahwa spektrum $^1\text{H-NMR}$ F10.3 lebih identik dengan spektrum $^1\text{H-NMR}$ (-)-epikatekin.

Berdasarkan analisa spektrum $^1\text{H-NMR}$ F10.3 diperkirakan senyawa hasil isolasi ini adalah 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

4.3.2. Spektroskopi ^{13}C -NMR (^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance)

Berikut tabulasi data ^{13}C -NMR dari F10.3. Data spektrum ^{13}C -NMR dibandingkan dengan data standar (-)-epikatekin.

Tabel 4. Data spektrum ^{13}C -NMR (-)-epikatekin, (+)-katekin, dan F10.3 (aseton-d6)

Atom	(-)-epikatekin (ppm)*	(+)-katekin (ppm)**	Fraksi 10.3 (ppm)	Jenis
C2	79,5	81,5	79,51	-CH-O-
C3	67,0	67,3	67,02	-CH-OH
C4	29,0	27,6	29,08	-CH ₂ -
C5	157,6	156,2	157,65	C(aromatis)
C6	96,2	95,9	96,26	CH(aromatis)
C7	157,7	156,4	157,65	C(aromatis)
C8	95,7	95,1	95,78	CH(aromatis)
C9	157,2	155,8	157,23	C(aromatis)
C10	99,8	100,0	99,88	C(aromatis)
C1'	132,3	131,1	132,35	C(aromatis)
C2'	115,3	115,0	115,37	CH(aromatis)
C3'	145,4	144,8	145,37	C(aromatis)
C4'	145,5	144,9	145,48	C(aromatis)
C5'	115,5	116,0	115,58	CH(aromatis)
C6'	119,4	119,7	119,44	CH(aromatis)

*Han *et al*, 2003^[29]

** Watanabe, 1998^[33]

Disekitar pergeseran kimia pelarut (29-30 ppm) ada 4 puncak yang muncul. Dari 4 puncak tersebut, berdasarkan standar epikatekin yang didapat, ada 1 puncak yang memenuhi syarat sebagai puncak senyawa yaitu puncak pada 29,08 ppm. Dengan demikian spektrum ^{13}C -NMR F10.3 menunjukkan adanya 15 atom karbon. Data ini mendukung sistem C6-C3-C6 yang merupakan ciri khas flavonoid^[31].

Karbon C2 muncul pada pergeseran kimia 79,51 ppm (-CH-O-), karbon C3 muncul pada pergeseran kimia 67,02 ppm (-CH-OH), dan C4 muncul pada pergeseran kimia 29,08 ppm (-CH₂). Pergeseran-pergeseran kimia tersebut merupakan cirikhas dari senyawa golongan flavan-3-ol^[33]. Dua belas atom C aromatis lainnya muncul pada pergeseran kimia 95,78 ppm sampai 157,65 ppm.

Pembandingan spektrum ¹³C-NMR F10.3 dengan spektrum ¹³C-NMR (-)-epikatekin dan (+)-katekin memperlihatkan bahwa spektrum ¹³C-NMR F10.3 lebih identik dengan spektrum ¹³C-NMR (-)-epikatekin.

Hasil analisa spektrum ¹³C-NMR F10.3, mendukung perkiraan bahwa senyawa hasil isolasi ini adalah flavonoid dari golongan flavan-3-ol. Spektrum ¹³C-NMR dapat dilihat pada Lampiran 5.

4.3.3. Spektroskopi HC-HSQC (HC-Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Analisis HC-HSQC memperlihatkan proton yang berkorelasi dengan karbon. Dari spektrum HC-HSQC dapat diketahui pada C alifatis terdapat proton H-4 pada pergeseran kimia 2,70 ppm dan 2,82 ppm berkorelasi dengan C-4 pada pergeseran kimia 29,08 ppm, proton H-3 pada pergeseran kimia 4,165 ppm berkorelasi dengan C-3 pada pergeseran kimia 67,02 ppm, dan proton H-2 pada pergeseran kimia 4,84 ppm berkorelasi dengan C-2 pada pergeseran kimia 79,51 ppm. Selanjutnya, pada cincin aromatik A, proton H-6 pada pergeseran kimia 5,985 ppm berkorelasi dengan C-6 pada pergeseran kimia 96,26 ppm, dan proton H-8 pada pergeseran kimia 5,88 ppm berkorelasi dengan C-8 pada pergeseran kimia 95,78 ppm. Pada cincin aromatik B dapat diketahui bahwa proton H-2' pada pergeseran kimia 7,01 ppm berkorelasi dengan C-2' pada pergeseran kimia 115,37 ppm, proton H-5' pada pergeseran kimia 6,75 ppm berkorelasi dengan C-5' pada pergeseran kimia 115,58 ppm, serta proton H-6' pada pergeseran kimia 6,80 ppm berkorelasi dengan C-6' pada pergeseran kimia 119,44 ppm.

Data HC-HSQC memberikan informasi bahwa proton pada cincin alifatis terdapat pada C-2, C-3, dan C-4. Jika data ini dihubungkan dengan integrator pada H-2, H-3, dan H-4, maka dapat diketahui bahwa satu gugus OH tersubstitusi pada

atom C-3. Pada cincin aromatik A terdapat proton pada C-6 dan C-8. Ini mengindikasikan bahwa 2 buah gugus OH terubstitusi pada C-5 dan C-7. Sedangkan pada cincin aromatik B terdapat proton pada C-2', C-5', dan C-6'. Ini menginformasikan bahwa 2 gugus OH tersubstitusi pada C-3' dan C-4'.

Data HC-HSQC juga menunjukkan tidak adanya korelasi antara puncak proton pada pergeseran kimia 3,275 ppm, dan puncak-puncak kecil lainnya dengan atom karbon manapun. Hal ini memberikan penjelasan bahwa kemungkinan puncak-puncak proton tersebut adalah puncak impurity dari hasil isolasi.

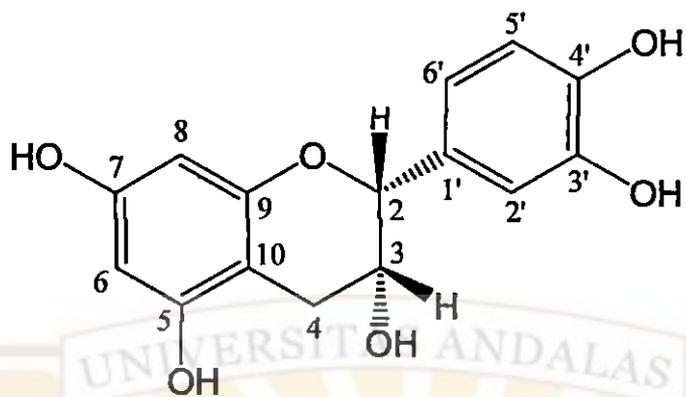
Dengan melihat data HC-HSQC ini semakin menguatkan perkiraan bahwa senyawa hasil isolasi ini adalah 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksi-3 α -ol. Spektrum HC-HSQC dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

4.3.4. H-H COSY (H-H Homonuclear Correlation Spectroscopy)

Spektrum COSY pada pergeseran kimia 2,70 ppm sampai 4,84 ppm memperlihatkan adanya korelasi antara H-4a dan H-4b. Selanjutnya, korelasi juga terjadi antara H-2 dan H-3, serta antara H-3 dengan H-4a dan H-4b. Hal ini menunjukkan bahwa H-2 dan H-3 terletak bersebelahan, dan H-3 dengan H-4a dan H-4b juga terletak bersebelahan, sedangkan H-2 dengan H-4a dan H-4b tidak terletak bersebelahan, hal ini terlihat dengan tidak adanya korelasi yang terjadi.

Dari analisa spektrum H-H COSY ini semakin memperkuat perkiraan bahwa senyawa hasil isolasi ini adalah 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol. Spektrum H-H COSY dapat dilihat pada **Lampiran 7**.

Dengan melihat semua hasil analisa spektrum $^1\text{H-NMR}$, spektrum $^{13}\text{C-NMR}$, spektrum HC-HSQC, dan spektrum H-H COSY, maka senyawa hasil isolasi ini disarankan dengan struktur 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol, atau yang lebih dikenal dengan nama epikatekin. Struktur dari senyawa 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol atau epikatekin dapat dilihat pada **Gambar 15**.



Gambar 15. 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol (epikatekin)



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari daun kayu sina (*Phyllocladus hypophyllus* Hook. f.) yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi dari ekstrak etil asetat ini disarankan dengan struktur 5, 7, 3', 4'-tetrahidroksiflavan-3 α -ol atau yang biasa dikenal sebagai epikatekin. Namun usulan ini membutuhkan konfirmasi lebih lanjut dari berbagai uji spektroskopi lainnya.

5.2. Saran

Beberapa saran untuk penelitian lanjutan yaitu :

1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk memastikan struktur senyawa hasil isolasi dengan melengkapi data GC-MS, DEPT, spektroskopi IR, dan spektroskopi UV-Vis.
2. Melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder yang lain dari tanaman tersebut.

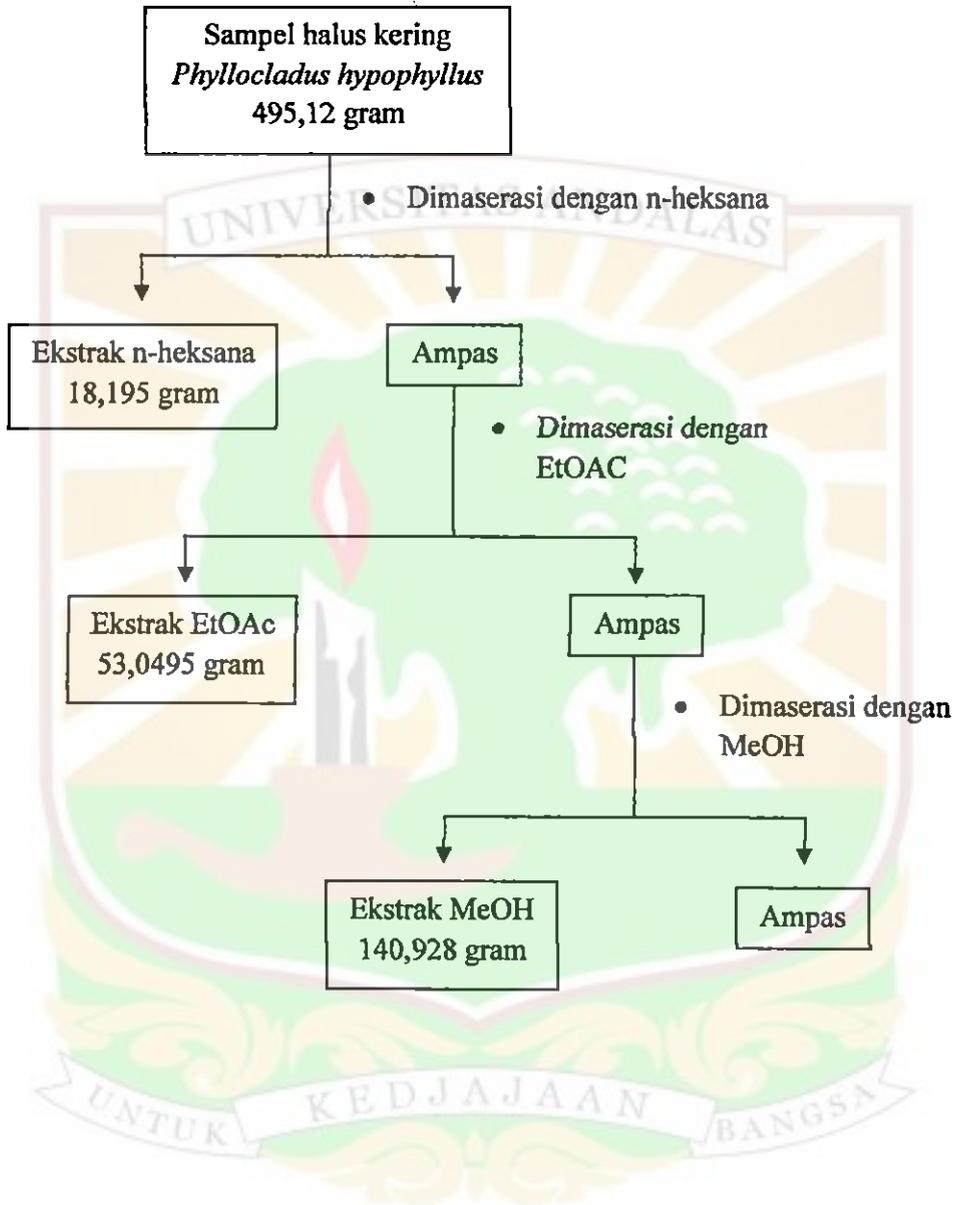
DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. A. Farjon, *World Checklist and Bibliography of Conifers*. The Royal Botanic Garden, Kew, Belgium, 1998.
2. B. L. Turner and L. A. Cernusak, *Ecology of The Podocarpaceae In Tropical Forest*. Smithsonian Institution Scholarly Press Washington D. C. 2011.
3. R. H. M. J. Lemmens, I. Soerianegara, W. C. Wong, *Plant Resources of South-East Asia No 5(2) Timber Trees: Minor Commercial Timbers*. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia, 1995.
4. L. Y. Foo, L. Hrstich, C. Vilain, Phylloflavan, a characteristic constituent of *Phyllocladus* species. *Phytochemistry*, 24: 1495-1498 (1985).
5. L. Y. Foo, Phenylpropanoid Derivates of Catechin, Epicatechin, and Phylloflavan From *Phyllocladus trichomanoides*. *Phytochemistry*, 26: 2825-2830 (1987).
6. L. Y. Foo, Flavanocoumarins and Flavanophenylpropanoids from *Phyllocladus trichomanoides*. *Phytochemistry*, 28: 2477-2481 (1989).
7. K. R. Markham, R. F. Webby, B. P. J. Molloy, C. Vialin, Uniformity and distinctness of *Phyllocladus* as evidence by flavonoid accumulation. *Phytochemistry*, 24: 2607-2609 (1985).
8. B. P. J. Molloy and K. R. Markham, A contribution to the taxonomy of *Phyllocladus* (Phyllocladaceae) from the distribution of key flavonoids. *New Zealand Journal of Botany*, 37: 375-382 (1999).
9. Anonim. 2011. *Phyllocladus hypophyllus* Hook. f. <http://www.bioloib.cz/en/taxon/id301413/> [15 April 2012].
10. A. V. F. C. Bobrov, A. P. Melikian, E. Y. Yembaturova, Seed Morphology, Anatomy, and Ultrastructure of *Phyllocladus* L. C. & A. Rich. Ex Mirb. (Phyllocladaceae (Pilg.) Bessey) in Connection with the Generic System and Phylogeny. *Annals of Botany*, 83: 601-618 (1999).
11. S. G. Brooker, R. C. Cambie, R. C. Cooper, *New Zealand Medicinal Plants*. Heinemann, Auckland, 1981.

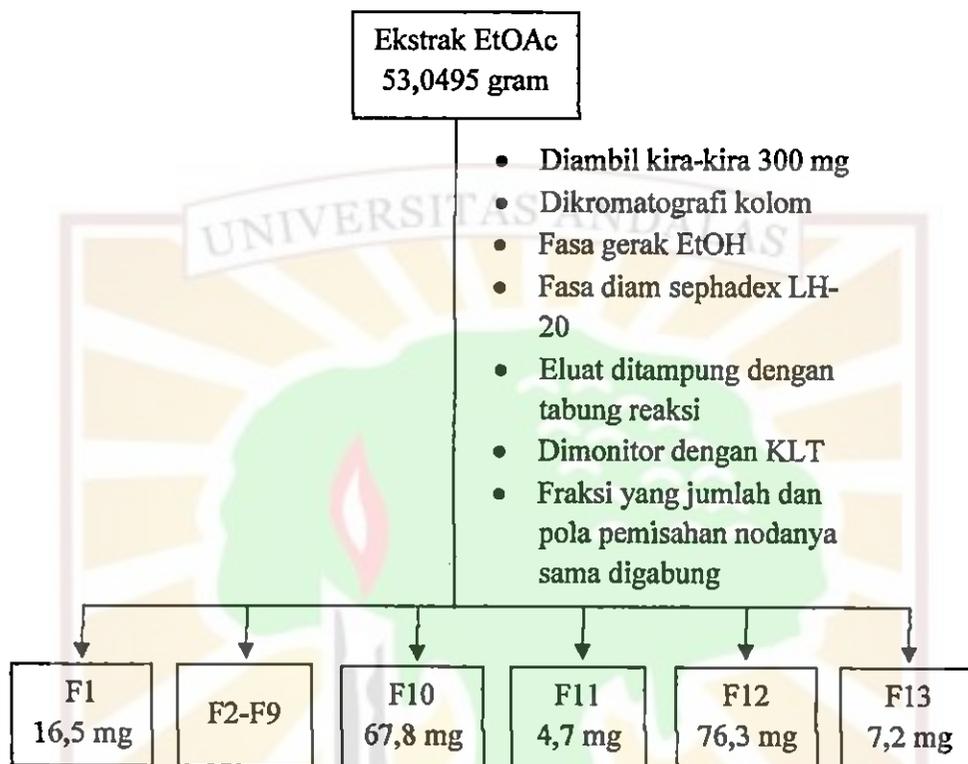
12. C. Vilain, J. Damas, J. Lecomte, L. Y. Foo, *Flavonoids and Bioflavonoid*, L. Farkas, M. Jabor, F. Kallay., eds. Elsevier, Amsterdam, 1986. pp. 287.
13. R. T. Baker, H. G. Smith, A research on the pines of Australia. Sydney, William Applegate Gullick, 1910.
14. L. H. Briggs, A review of the diterpenes. *Report of the Australian and New Zealand Association for the Advancement of Science* 23: 45 (1937).
15. R. K. Crowden, M. J. Grubb, Anthocyanins from five species of the Podocarpaceae. *Phytochemistry* 10: 2821-2822 (1971).
16. P. Sing, P. G. Fenemore, J. S. Dugdale, G. B. Russel, The insecticidal of foliage from New Zealand conifer. *Biochemical Systematics and Ecology* 6: 103-106 (1978).
17. R. C. Cambie, M. A. James, The taxonomic distribution of some biflavonoids. *New Zealand Journal of Science* 10: 918-926 (1976).
18. S. K. Adhikari, R. A. Bell, W. E. Harvey, Cyclitols from heartwood of *Phyllocladus trichomanoides*. *Journal of the Chemical Society Part II*: 2829-2831 (1962).
19. E. G. Brooke, Constituens of *Phyllocladus glaucus*. *New Zealand Journal of Science* 2: 212-214 (1959).
20. J. Broges del Castillo, C. J. Brooks, R. C. Cambie, G. Eglinton, R. J. Hamilton, P. Pellitt, The taxonomic distribution of some hydrocarbons in gymnosperms. *Phytochemistry* 6: 391-398 (1967).
21. J. P. J. Marais, B. Deavours, R. A. Dixon, D. Ferreira, The Stereochemistry of Flavonoids, in *The Science of Flavonoid*, Erich G., Ed. Springer, USA. 2006. pp. 1-4.
22. S. S. Handa, An Overview of Extraction Technique for Medicine and Aromatic Plant, in *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, Sukhdev S. H., Suman P. S. K., Gennaro L., Dev D. R., United Nation Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High technology, Trieste, 2008. pp. 22.
23. A. Braithwaite and F. J. Smith, *Fifth Edition Chromatography Method*. Kluwer Acedemic Publisher, USA, 1999. pp. 17-20.

24. J. M. Miller, *Chromatography Concepts and Contrasts Second Edition*. A John Wiley & Sons, inc., Publication, New Jersey, 2005. pp. 41-45.
25. J. R. Gritter, M. Boobit, A. E. Schwarting, *Pengantar Kromatografi*, Penerbit ITB, Bandung, 1991.
26. E. Breitmaier, *Structure Elucidation in Organic Chemistry A Practical Guide*. John Wiley & Sons, Ltd, England, 2002. pp. 11-41.
27. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compound Seventh Edition*. John Wiley & Sons, Inc, USA, 2005. pp. 127-244.
28. D. L. Pavia, M. G. Lampman, S. G. Kriz, J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy Fourth Edition*. Brooks/Cole: USA, 2009. pp. 105-362.
29. A. R. Han, W. Mar, E. K. Seo, Dna Strand-Nicking Principles of *Mucuna birdwoodiana*. *Natural Product Science*, 9(2) : 105-108 (2003).
30. K. Okushio, M. Suzuki, N. Matsumoto, S. Nanjo, Y. Hara, Identification of (-)-Epicatechin Metabolites and Their Metabolic Fate in The Rat. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutic*, 27 (2) : 309-316 (1998).
31. T. S. Martin, H. Kikuzaki, M. Hisamoto, N. Nakatani, Constituents of *Amomum tsao-ko* and Their Radical Antioxidant Activities. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 77, 6: 667-673 (2000).
32. A. A. Shahat, Procyanidins from *Adansonia digitata*. *Pharmaceutical Biology*, 44(6) : 445-450 (2006).
33. M. Watanabe, Catechin as Antioxidant from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. *J. Agric. Food Chem*, 46: 839-845 (1998).

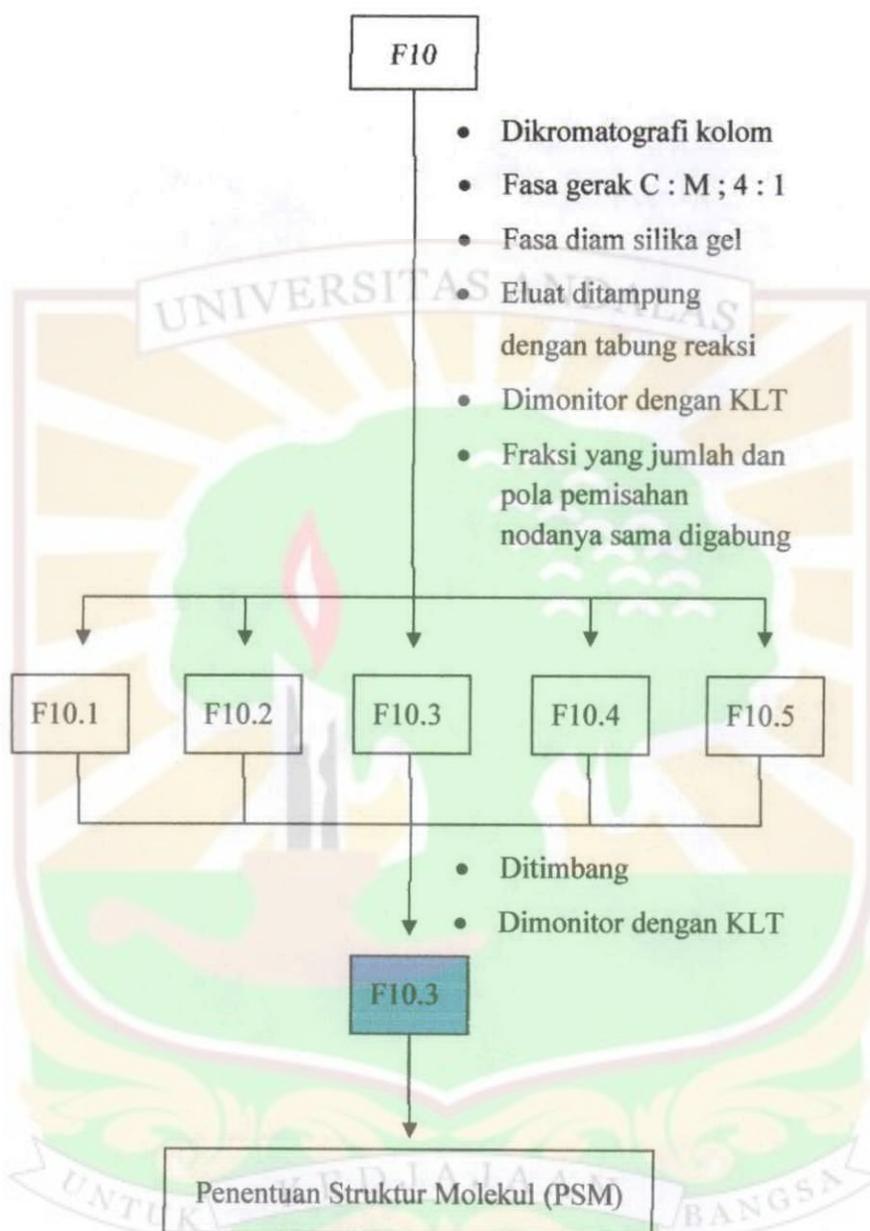
Lampiran 1. Skema kerja ekstraksi sampel daun tumbuhan *Phyllocladus hypophyllus*.



Lampiran 2. Skema kerja pemurnian ekstrak etil asetat dengan menggunakan kromatografi kolom sephadex LH-20.



Lampiran 3. Skema kerja pemurnian F10 dengan kromatografi kolom silika gel

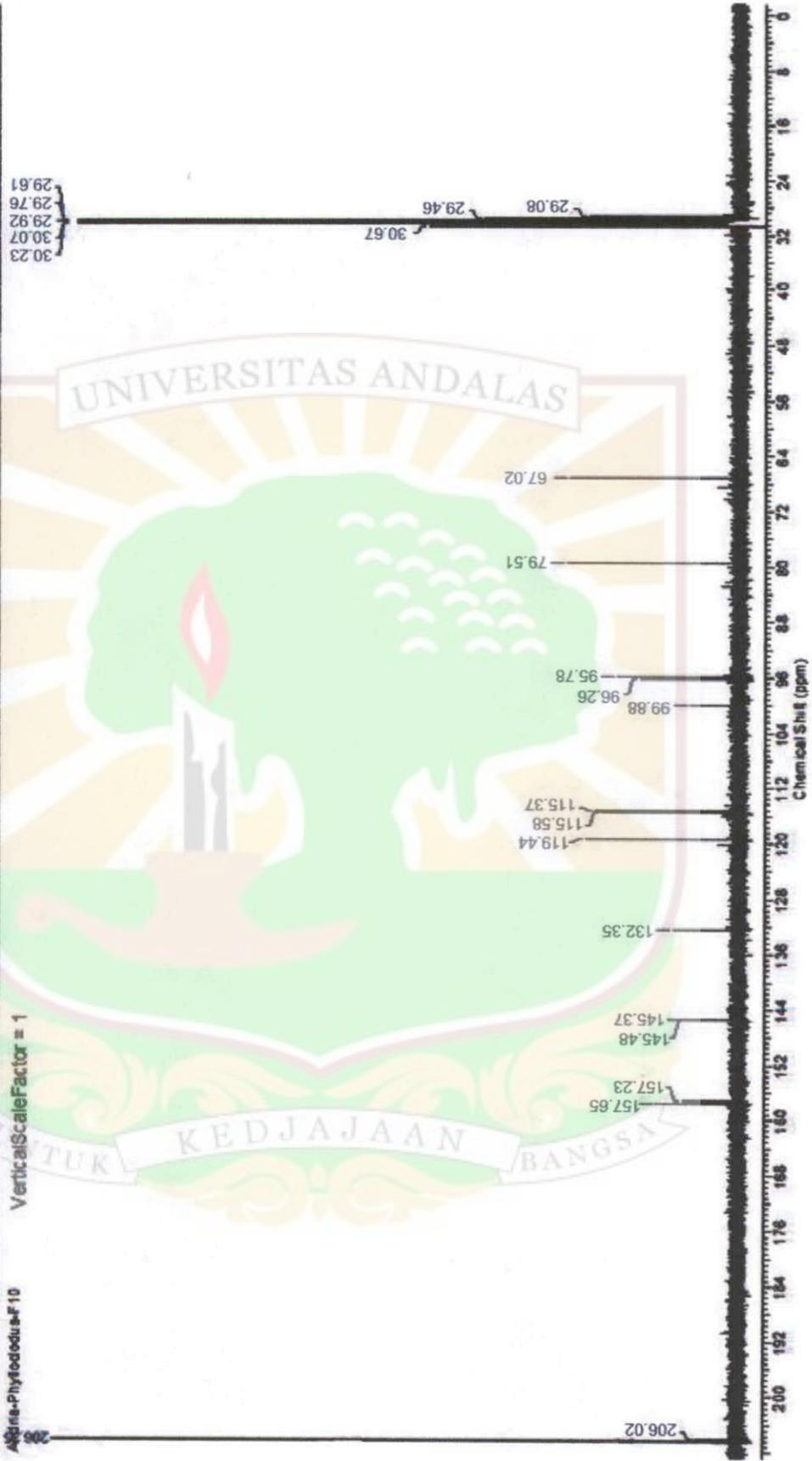


Keterangan :  : senyawa murni

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.jcdlabs.com/nmrprod/

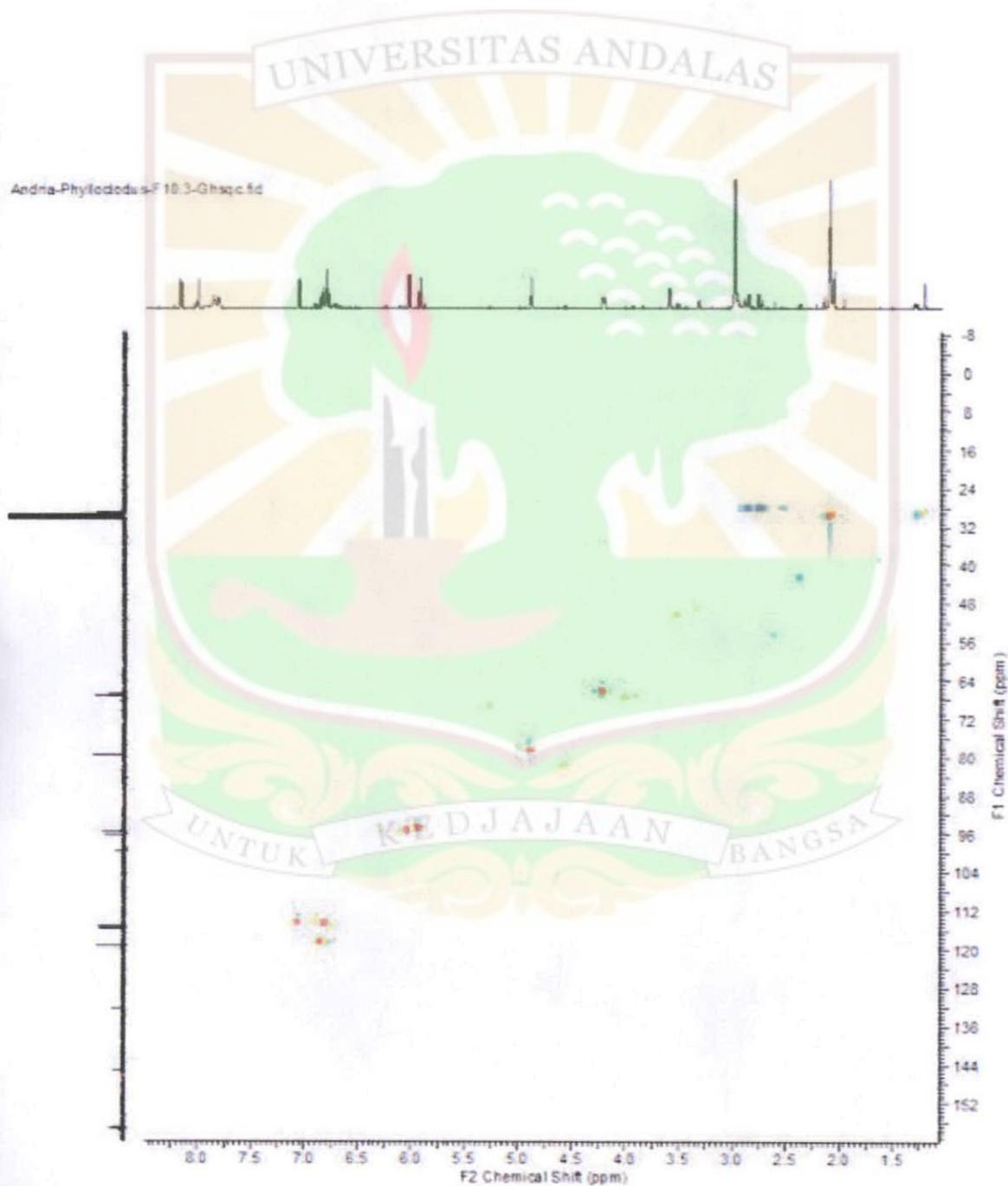
27/03/2012 11:34:50

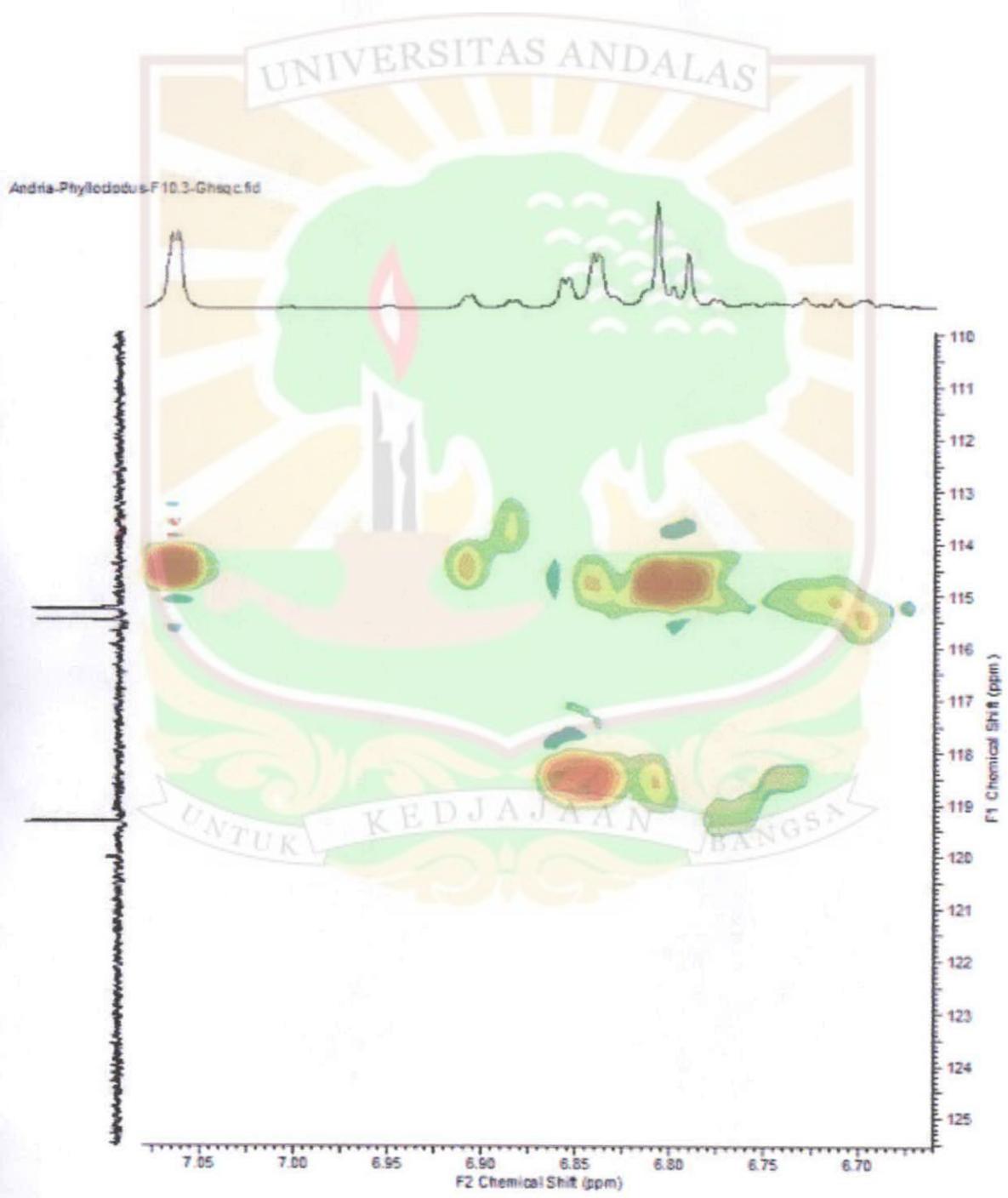
Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Andria-Phytododus-F10.3	Date	Mar 9 2012
Date Stamp	Mar 9 2012				
File Name	E. WAHASI SWA BIM BUNGAN-SKRIP SI DAN DOKUMEN WAHASI Bimbingan 2012 NMR DAT APHydlocidusAndria-Phytododus-F10.3-13C.fid1d				
Frequency (MHz)	125.63	Nucleus	¹³ C	Original Points Count	39849
Points Count	65536	Pulse Sequence	g30ul	Solvent	Acetone
Spectrum Obs of (Hz)	13316.8174	Spectrum Type	STANDARD	Temperature (degree C)	AMBIENT TEMPERATURE



Lampiran 6. Spektrum HC HSQC

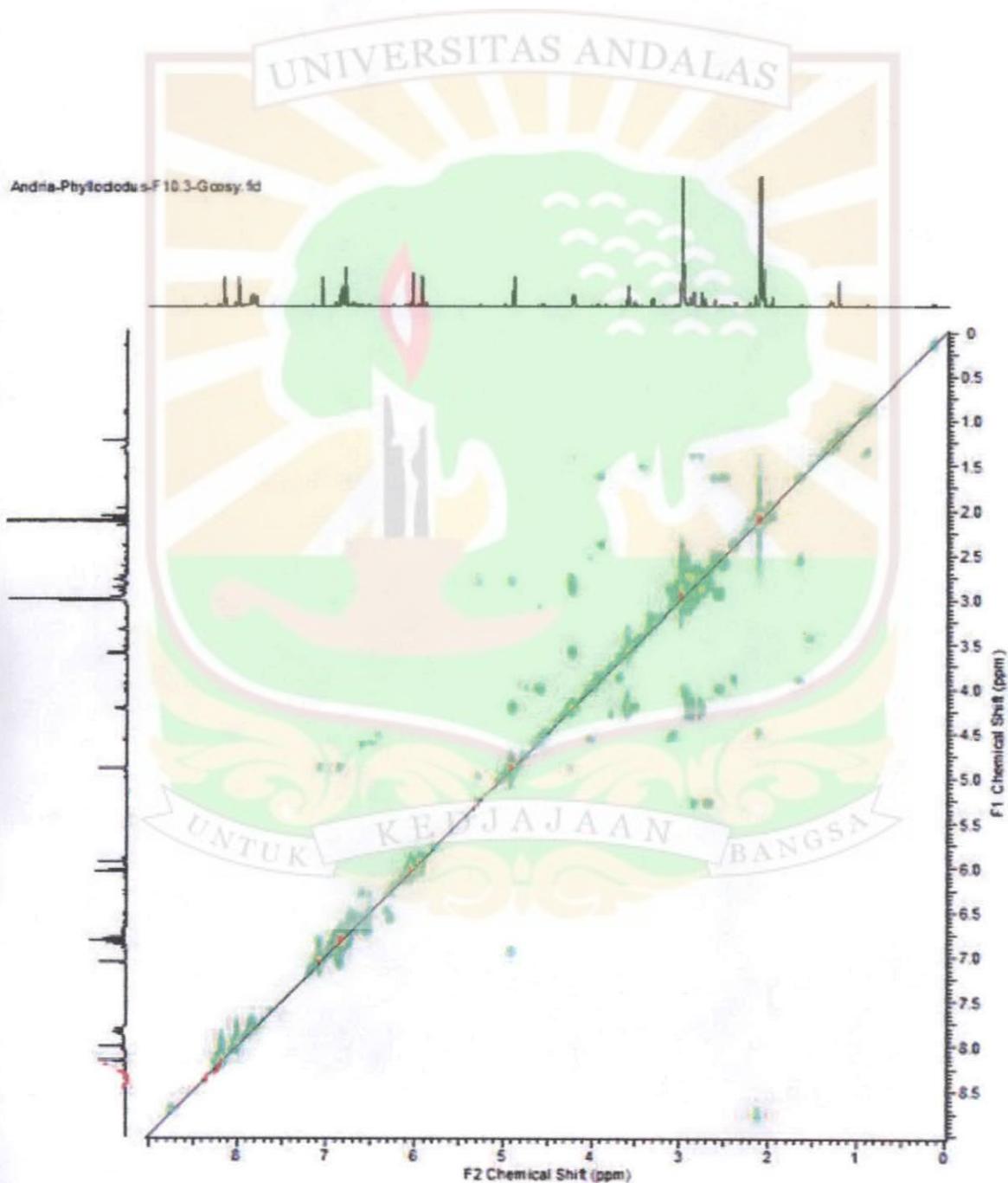
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/





Lampiran 7. Spektrum H-H COSY

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproci



Lampiran 8. Dokumentasi Alat



Kolom sephadex LH-20



Tabung gas nitrogen (N₂)



Freeze Dryer



Rotary Evaporator



Freezer



UV Cabinet



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(Research Center for Biology)

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

SURAT KETERANGAN

UNIVERSITAS ANDALAS

Saya selaku pembimbing menerangkan bahwa Mahasiswa (S1), Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Andalas:

Nama : Fajri Ikhsan
No. BP : 0810412044

Telah melakukan penelitian selama 4 bulan terhitung mulai bulan Januari – Mei 2012 dengan judul: **Isolasi, Identifikasi, dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder dari Tumbuhan *Phyllocladus hypophyllus*** di Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

Demikianlah surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Cibinong, 21 Mei 2012
Laboratorium Fitokimia

Dr. Andria Agusta
NIP. 196908161994031003

KEDJAJAAN

BANGSA