



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 KUMARIN SERTA UJI ANTIOKSIDAN DARI FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BATANG DUKU (*Lansium domesticum* Corr)

SKRIPSI



Riko Irwan
07132 033

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

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

..... يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ ءَامَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ.....

**.....Allah akan meninggikan orang-orang beriman diantara mu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat.....* (Al-Mujadilah ; 11)*

Assalam'alaikum Warahmatullahi Wabaraktuh....

Tiada kata terindah yang dapat saya sampaikan kecuali ALHAMDULILLAH kehadiran ALLAH SWT, Karena Berkat Rahmat dan Karunia-Nya Saya dapat menyelesaikan Skripsi sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana....Gelar bukan lah apa-apa namun ilmulah yang semestinya membuat kita semakin tunduk kepada ALLAH SWT karena kita makin menyadari betapa sangat rendahnya ilmu yang kita miliki dibandingkan dengan ALLAH sang Maha pemilik ilmu...

Shalawat dan Salam agar selalu ALLAH SWT curahkan kepada sosok kekasisih umat Islam yang menjadi suri tauladan dalam semua sisi kehidupan ini yakni nabi Muhammad SAW...

1. Terima kasih banyak kepada dua orang sosok manusia yang selalu menjadi motivasi kehidupan saya yaitu AMAK (Irdawati) dan AYAH (Azwar), semoga ALLAH menyayangi keduanya melebihi sayangnya kepada saya....Walaupun saya tidak bisa membalas kasih-sayang dan pengorbanan yang diberikan, namun saya berharap semoga ini dapat membahagiakan keduanya untuk saat sekarang ini. Dan juga kepada Abang (Roni Irwan) dan Adik (Diana Febrianti) semoga kita menjadi Anak Shaleh dan Shalehah.
2. Terima kasih kepada pembimbing saya yaitu Dr. Mai Efdi dan Dr. Afrizal, semoga atas bimbingan dibalasi dengan nilai ibadah oleh Allah dan setiap ilmu yang bermanfaat menjadi amalan yang tidak putus-putusnya tercurahkan kepada Bapak.

3. Terima kasih untuk staf dosen Kimia Universitas Andalas atas ilmu yang selalu diberikan kepada kami semoga semua itu menjadi nilai ibadah disisi Allah.
4. Terima kasih untuk rekan-rekan kimia angkatan 2007 atas dukungannya semoga kita menjadi generasi yang sukses dan berguna bagi nusa dan bangsa.
5. Untuk rekan-rekan Aktivis baik itu di BEM KM Unand kabinet KARYA, BEM KM FMIPA dari periode 2008-2011 dan FSI yang belum menyusul untuk wisuda agar dimudahkan ALLAH untuk menyelesaikan studinya karena kita sama-sama mengetahui bahwa kuliah adalah nomor satu namun organisai jangan di nomor duakan...
6. Untuk adik-adik Aktivis generasi penerus tetaplah berkaya dengan niat ikhlas untuk mengharapkan Ridho Allah karena tugas kalian bukan hanya menuntut Ilmu tapi peran kontrol sosial dan agen perubahan dari seorang mahasiswa sangat lah penting dan masyarakat menanti karya-karya kita semua..

“Ingatlah Aktivis bukanlah profesi namun Jiwa yang akan kita bawa kemanapun kita berada”....Semoga kita merupakan generasi emas yang akan membangkitkan kejayaan Bangsa ini.....Dan semoga Ukhuwah antara kita tetap terjaga sampai ke Syurga....Amin... HIDUP MAHASISWA!!!

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

ISOLASI KUMARIN SERTA UJI ANTIOKSIDAN DARI FRAKSI ETIL ASETAT KULIT BATANG DUKU (*Lansium domesticum Corr*)

Riko Irwan

Sarjana Sains (S.Si) dalam bidang kimia fakultas MIPA Universitas Andalas
Dibimbing oleh Dr. Mai Efdi, M.Si dan Dr. Afrizal, M.S

Duku (*Lansium domesticum corr*) merupakan tumbuhan tropis dari famili Meliaceae yang berasal dari Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, Vietnam dan Filipina. Tumbuhan ini dikenal sebagai bahan obat tradisional. Tujuan penelitian adalah untuk mengisolasi senyawa kumarin dari kulit batang tumbuhan ini. Isolasi dilakukan dengan metoda maserasi dan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel dan dielusi secara bertahap menggunakan metoda Step Gradient Polarity (SGP) dengan menggunakan pelarut n-heksan, dikloro metana, etil asetat dan metanol. Karakterisasi strukturnya digunakan spektrofotometer UV dan IR. Senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat berupa padatan berwarna kuning yang diperkirakan sebagai hidroksi kumarin. Pengujian aktifitas antioksidan dengan DPPH menunjukkan fraksi etil asetat memiliki aktifitas yang relatif lebih baik dibandingkan fraksi n-heksan.

Kata Kunci : Kumarin, Duku, antioksidan

ISOLATION OF COUMARIN AND ANTIOXIDANT ASSAY OF ETHYL ACETATE FRACTION FROM DUKU (*Lansium domesticum Corr*) BARK

Riko Irwan

Bachelor of Science in Chemistry Faculty of Mathematic and Natural Science
University of Andalas
Advice by Dr. Mai Efdi, M.Si and Dr. Afrizal, M.S

ABSTRACT

Duku (*Lansium domesticum Corr*) is a tropical plant from meliaceae family, which in only grow at south east region like Indonesia, Malaysia, Vietnam and Philipine. It is known as traditional medicine. The purpose of this research was to isolate coumarin compound from the bark of this plant. Isolation was done by maceration and coulumn chromatography method with silica gel as stationary phase and eluted by step gradien polarity gradually hexana, dichloromethane, ethyl acetate and methanol solvents. Characterization of the structure was done by using UV and IR Spectroscopy. the Isolated compound from ethyl acetate fraction showed a yellow solid, it was predicted as hydroxycoumarin. Antioxidant assay with DPPH showed ethyl acetat fraction had more activity than hexana fraction.

Keywords : Coumarin, Duku, Antioxidant

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul **“Isolasi Senyawa Kumarin dan Uji Antioksidan dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Duku (*Lansium domesticum Corr*)**.

Selanjutnya salawat beserta salam dikirimkan kepada tauladan umat, Nabi Muhammad SAW. Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi syarat guna memperoleh gelar Strata satu pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada :

1. Dr. Mai Efdi selaku Pembimbing Utama dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Afrizal selaku Pembimbing Pendamping selama pelaksanaan penelitian sekaligus selaku Pembimbing Akademik.
3. Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas Padang.
4. Prof. Dr. Safni, M.Eng sebagai Pembimbing akademik selama studi di Jurusan Kimia
5. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.
6. Kedua Orangtua Penulis dan keluarga besar di Kepala Hilalang Kec Kayu Tanam Padang Pariaman Sumatera Barat.
7. Rekan-rekan mahasiswa Kimia angkatan 2007.

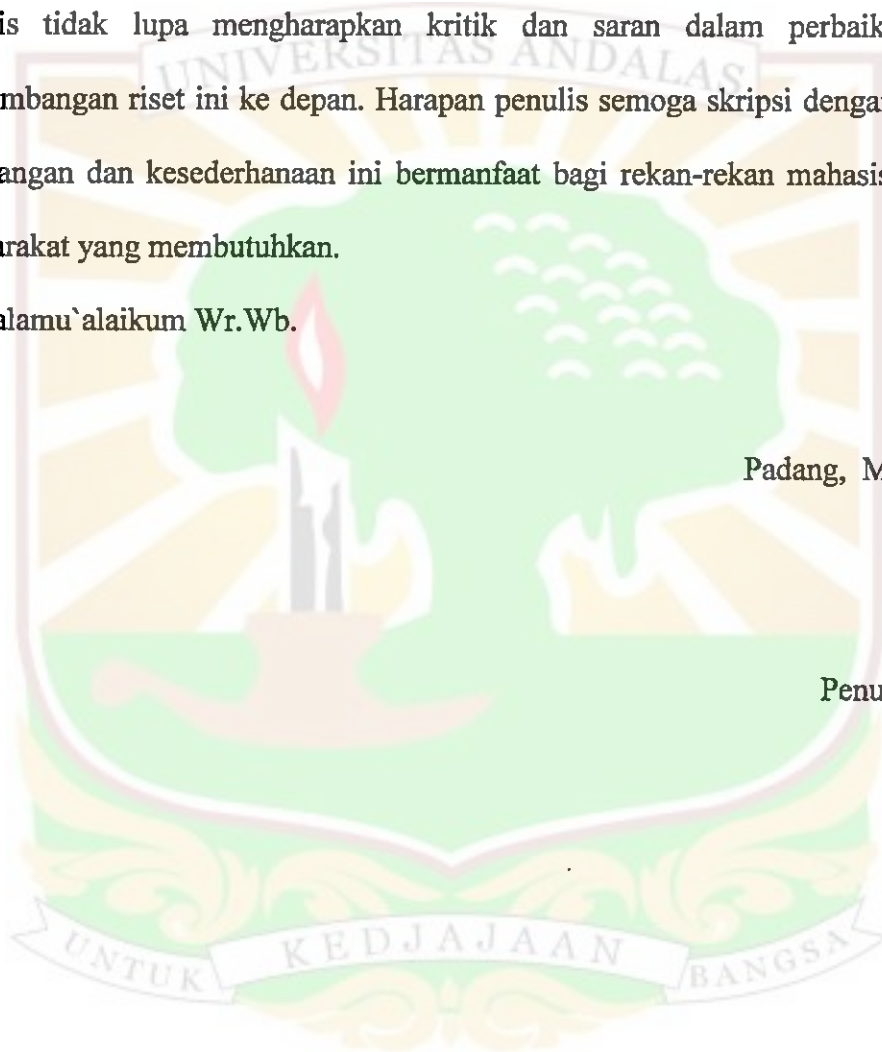
8. Rekan-rekan mahasiswa penelitian di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Universitas Andalas.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis sehingga selesainya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tidak ada gading yang tak retak. Oleh karena itu Penulis tidak lupa mengharapkan kritik dan saran dalam perbaikan dan pengembangan riset ini ke depan. Harapan penulis semoga skripsi dengan segala kekurangan dan kesederhanaan ini bermanfaat bagi rekan-rekan mahasiswa dan masyarakat yang membutuhkan.

Wassalamu`alaikum Wr.Wb.

Padang, Mei 2012

Penulis



DAFTAR ISI

	hal
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Perumusan Masalah.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum Botani Tumbuhan Duku.....	3
2.2 Tinjauan Kandungan kimia dari Tumbuhan Duku.....	4
2.3 Kumarin.....	8
2.3.1 Tinjauan Umum kumarin.....	8
2.3.2 Sifat-sifat Kumarin.....	9
2.3.3 Biosintesis Kumarin.....	10
2.4 Metoda Isolasi Senyawa Bahan Alam.....	11
2.4.1 Metoda Ekstraksi.....	11
2.4.2 Metoda Kromatografi.....	14
2.4.3 Metoda Rekrystalisasi.....	14
2.4.4 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi.....	15
2.5 Metoda Karakterisasi.....	15
2.5.1 Spektroskopi Ultraviolet.....	15
2.5.2 Spektroskopi Inframerah.....	16
2.6 Aktivitas Antioksidan.....	17
2.7 Metoda DPPH sebagai uji aktifitas antioksidan.....	17

III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan.....	18
3.2.1 Peralatan.....	18
3.2.2 Bahan Kimia.....	18
3.2.3 Bahan Tumbuhan.....	18
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Pembuatan Pereaksi.....	19
3.3.2 Pengujian Profil Fitokimia kulit batang duku.....	20
3.4 Isolasi Kumarin dari kulit Batang Duku.....	21
3.5 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi.....	22
3.6 Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Duku.....	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pengujian Profil Fitokimia Kulit Batang Duku.....	24
4.2 Isolasi Kumarin dari Kulit Batang Duku.....	24
4.2.1 Ekstraksi.....	24
4.2.2 Kromatografi kolom.....	25
4.3 Karakterisasi Senyawa Kumarin.....	28
4.4 Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Duku.....	31
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	33
5.2 Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
Lampiran.....	36

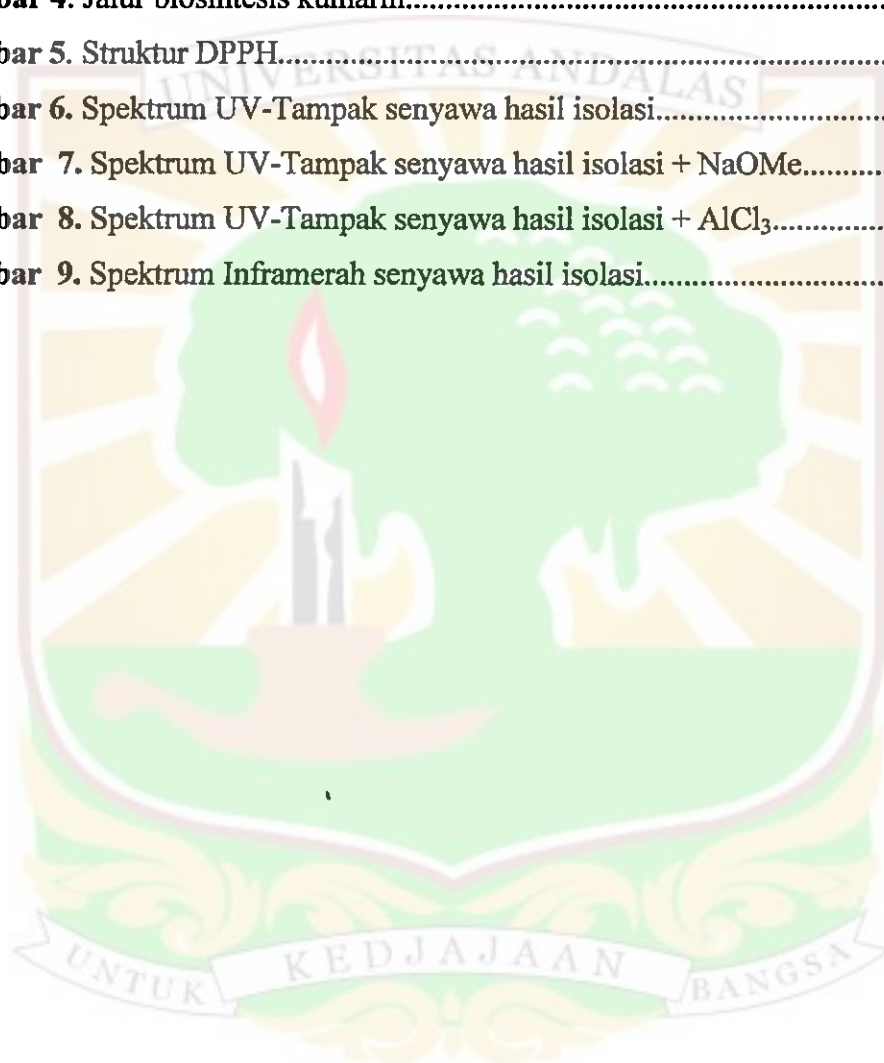
DAFTAR TABEL

	hal
Tabel 1. Hasil Pengujian profil fitokimia kulit batang duku.....	24
Tabel 2. Maserasi dengan heksana dan etil asetat.....	25
Tabel 3. Hasil kolom kromatografi.....	25
Tabel 4. Analisis KLT terhadap kelompok fraksi.....	26
Tabel 5. Nilai Rf senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen.....	27
Tabel 6. Hasil pengukuran absorban dan daya antioksidan.....	32



DAFTAR GAMBAR

	hal
Gambar 1. Senyawa yang diisolasi oleh Shi Hui Dong dari Duku.....	6
Gambar 2. Senyawa yang diisolasi oleh Nishizawa dari Duku.....	7
Gambar 3. Kerangka dasar kumarin.....	8
Gambar 4. Jalur biosintesis kumarin.....	10
Gambar 5. Struktur DPPH.....	17
Gambar 6. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi.....	28
Gambar 7. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi + NaOMe.....	29
Gambar 8. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi + AlCl ₃	30
Gambar 9. Spektrum Inframerah senyawa hasil isolasi.....	31



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1.** Skema Kerja Isolasi Kumarin dari Kulit Batang Duku.....36
- Lampiran 2.** Skema Kerja Uji antioksidan terhadap ekstrak heksana dan etil asetat dari kulit batang Duku.....38
- Lampiran 3.** Perhitungan Persen Inhibisi aktivitas antioksidan fraksi heksana dan fraksi etil asetat dari kulit batang Duku.....39



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan merupakan hasil dari metabolisme baik metabolisme primer maupun metabolisme sekunder. Hasil metabolisme sekunder banyak memberikan efek fisiologis dan efek farmakologis yang lebih dikenal dengan senyawa kimia aktif. Hal ini mendorong para ahli untuk melakukan penelitian terhadap berbagai macam tumbuhan untuk mengisolasi, sintesis, uji bioaktivitas dan pemanfaatan senyawa kimianya lebih lanjut¹.

Satu diantara ribuan tumbuhan dalam hutan tropis basah yang menarik dari segi fitokimia dan biologi adalah famili Meliaceae. Tumbuhan ini banyak mengandung senyawa yang berfungsi sebagai insektisida, *antifeeding*, antiinflamatory, antioksidan, sitotoksik, dan antitumor. Salah satu spesies dari famili Meliaceae adalah *Lansium domesticum Corr* atau disebut juga dengan duku¹.

Duku merupakan tumbuhan tropis beriklim basah berupa pohon yang berasal dari Malaysia dan Indonesia (Kalimantan Timur). Dari Negara asalnya, duku menyebar ke Vietnam, Myanmar dan India. Sekarang populasi duku sudah tersebar secara luas di seluruh pelosok nusantara. Beberapa bagian tumbuhan digunakan sebagai bahan obat tradisional. Biji duku yang ditumbuk dan dicampur dengan air digunakan untuk obat cacing dan juga obat demam. Kulit kayunya dimanfaatkan sebagai obat disentri dan malaria sementara tepung kulit kayu ini dijadikan tapal untuk mengobati gigitan kalajengking. Kulit buahnya juga digunakan sebagai obat diare dan kulit buah yang dikeringkan, di Filipina biasa dibakar sebagai pengusir nyamuk².

Dari uji pendahuluan kulit batang duku memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu triterpenoid, saponin dan kumarin. Dari hasil penelusuran literatur yang banyak dilaporkan adalah senyawa triterpenoid dari kulit batang duku, sedangkan senyawa kumarin belum dilaporkan.

Mengingat belum adanya laporan ilmiah tentang senyawa kumarin yang terdapat dalam kulit batang duku serta uji aktivitas antioksidannya, maka dilakukanlah isolasi senyawa kumarin dari fraksi etil asetat kulit batang duku serta uji antioksidannya.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan karakterisasi senyawa kumarin dari ekstrak etil asetat dan menentukan aktifitas antioksidan dari fraksi heksan dan fraksi etil asetat kulit batang duku.

1.3. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan diatas, maka permasalahannya adalah metoda isolasi yang digunakan untuk mengisolasi senyawa kumarin dalam kulit batang duku dan metoda uji antioksidan terhadap fraksi tersebut.

1.4. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat terhadap perkembangan ilmu kimia organik bahan alam dalam hal mengungkap kandungan metabolit sekunder pada tumbuhan duku yang mempunyai potensi sebagai antioksidan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Botani Tumbuhan Duku

Duku merupakan salah satu spesies dari famili Meliaceae dan merupakan tanaman bergetah dengan bentuk tanaman berupa pohon yang tingginya 15 - 20 m dan diameter batangnya 35 - 40 cm. Pada batangnya beralur-alur dalam dan menjulur tinggi. Kulit batang duku berwarna coklat kehijau-hijauan atau keabu-abuan, pecah-pecah dan bergetah putih. Selain itu, kulit batang ini juga tipis dan agak sulit dilepaskan dari batangnya. Daunnya merupakan daun majemuk ganjil yang tersusun berselang-seling. Setiap rangkaian daun terdapat 5 - 7 helai anak daun yang berbentuk elips panjang, berpinggir rata, pangkal asimertik dan ujungnya meruncing. Kedua permukaan daun berwarna hijau tua dan kadang agak kekuningan. Sedangkan bunga duku merupakan bunga majemuk tandan. Bentuk bunga seperti mangkuk dan merupakan bunga banci, dalam satu bunga terdapat putik dan benang sari. Kelopak bunga tebal dan berjumlah 5 helai, sedangkan mahkota bunga terdiri dari 4-5 helai dan tebal juga. Bakal buahya terdiri dari 4-5 ruang³.

Habitat duku membutuhkan curah hujan 2000-3000 mm per tahun dengan temperatur 25-35 °C, membutuhkan musim kemarau selama 3-4 minggu untuk merangsang perkembangan bunga. Duku tumbuh pada ketinggian kurang dari 600 m dengan jenis tanah berupa tanah liat yang mempunyai pH 5,5 - 6,6 dan sistem drainasenya baik⁴.

Tumbuhan ini memiliki klasifikasi sebagai berikut ;

Kingdom	: Plantae
Devisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Famili	: Meliaceae
Genus	: <i>Lansium</i>
Spesies	: <i>Lansium domesticum</i>
varietas	: <i>Lansium domesticum</i> Corr ⁵ .

Terdapat 3 varietas dari *L. domesticum* yaitu duku (*L. domesticum* Corr var. *duku*), pisitan (*L. domesticum* Corr var. *piejieten*) dan kokosan (*L. domesticum* Corr var. *kokossan*)².

Manfaat dari bagian-bagian tanaman duku tersebut di atas, antara lain :

1. Sari daun duku dapat mengobati radang mata dan wasir.
2. Di Jawa, batang duku sering dimanfaatkan untuk tiang rumah dan tangkai perkakas. Selain itu biasa digunakan untuk mengobati disentri dan malaria, tepungnya digunakan untuk mengobati racun gigitan kalajengking.
3. Kulit buah duku yang masak dan kering merupakan campuran bahan bakar dupa setinggi dan asapnya cukup ampuh untuk menghalau nyamuk, karena mengandung oleoresin. Kandungan resin juga dapat digunakan untuk menghentikan diare dan kejang pada perut serta digunakan juga sebagai obat malaria dan demam lainnya.
4. Biji buah duku sangat pahit; ekstraknya dapat digunakan sebagai obat cacing bagi anak-anak, penolak demam, dan obat diare².
5. Ekstrak daun, kulit batang, kulit buah, dan biji duku telah diteliti secara *in vitro* dapat menghambat siklus hidup salah satu parasit penyebab penyakit malaria yaitu *Plasmodium falciparum*⁶.

2.2. Tinjauan Kandungan kimia dari Tumbuhan Duku

a). Daun

Komponen mayoritas dari daun duku adalah asam lansiolat, sedangkan komponen minoritasnya adalah asam 3-okso-24-sikloarten-21-olat yang dikarakteristikan sebagai sikloartanoid tipe baru dari asam karboksilat, diduga dapat menjadi inhibitor penyakit tumor pada kulit. Kedua kandungan tersebut termasuk ke dalam senyawa triterpenoid⁷.

b). Batang

Dari batang duku berhasil diisolasi senyawa triterpena pentasiklik yang disebut asam ketonat. Pada ranting tanaman duku telah diisolasi 9 senyawa triterpenoid yang aktif sebagai antibakterial terhadap gam positif yaitu *lamesticum* A, *lamestikum* B-F, asam lansium dan etil lansiolat. Pada kulit batang duku juga telah

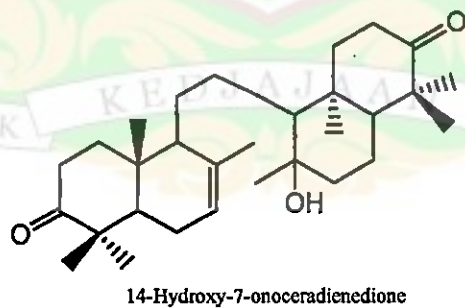
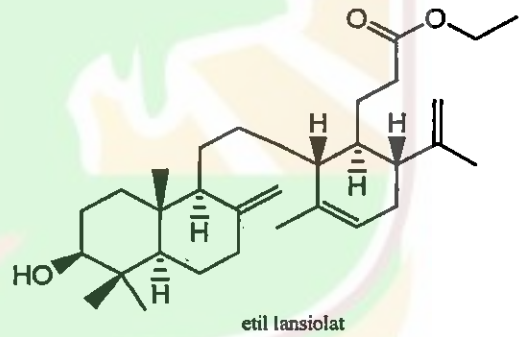
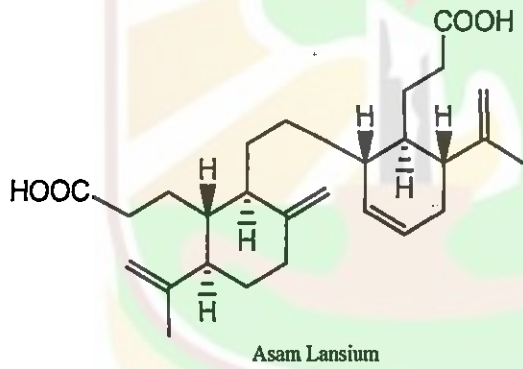
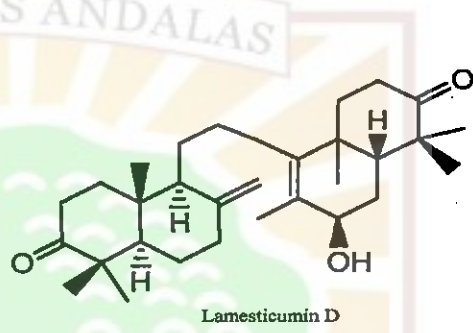
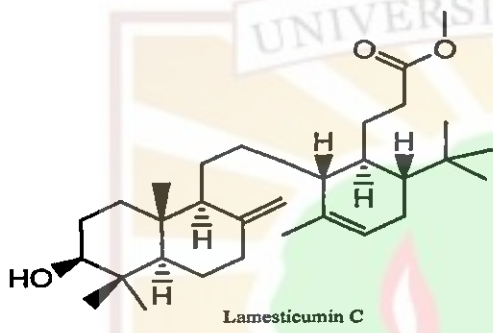
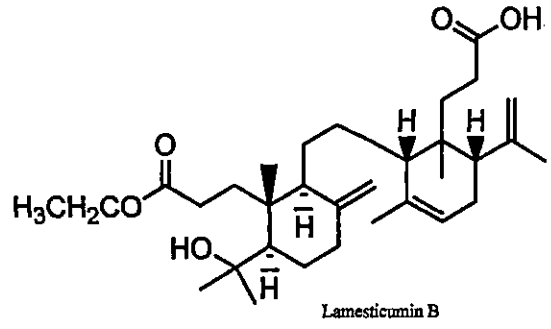
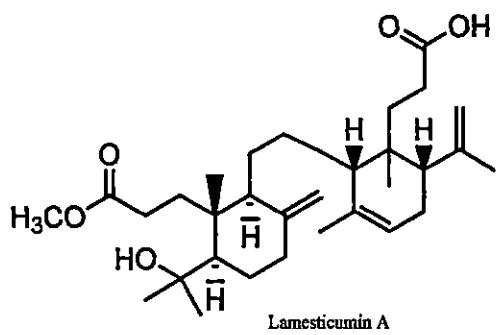
diisolasi satu senyawa terpenoid yang bersifat antibakterial yaitu 14-hidroksi-7-onoceradienedion. Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 1^{8,9}.

c). Biji

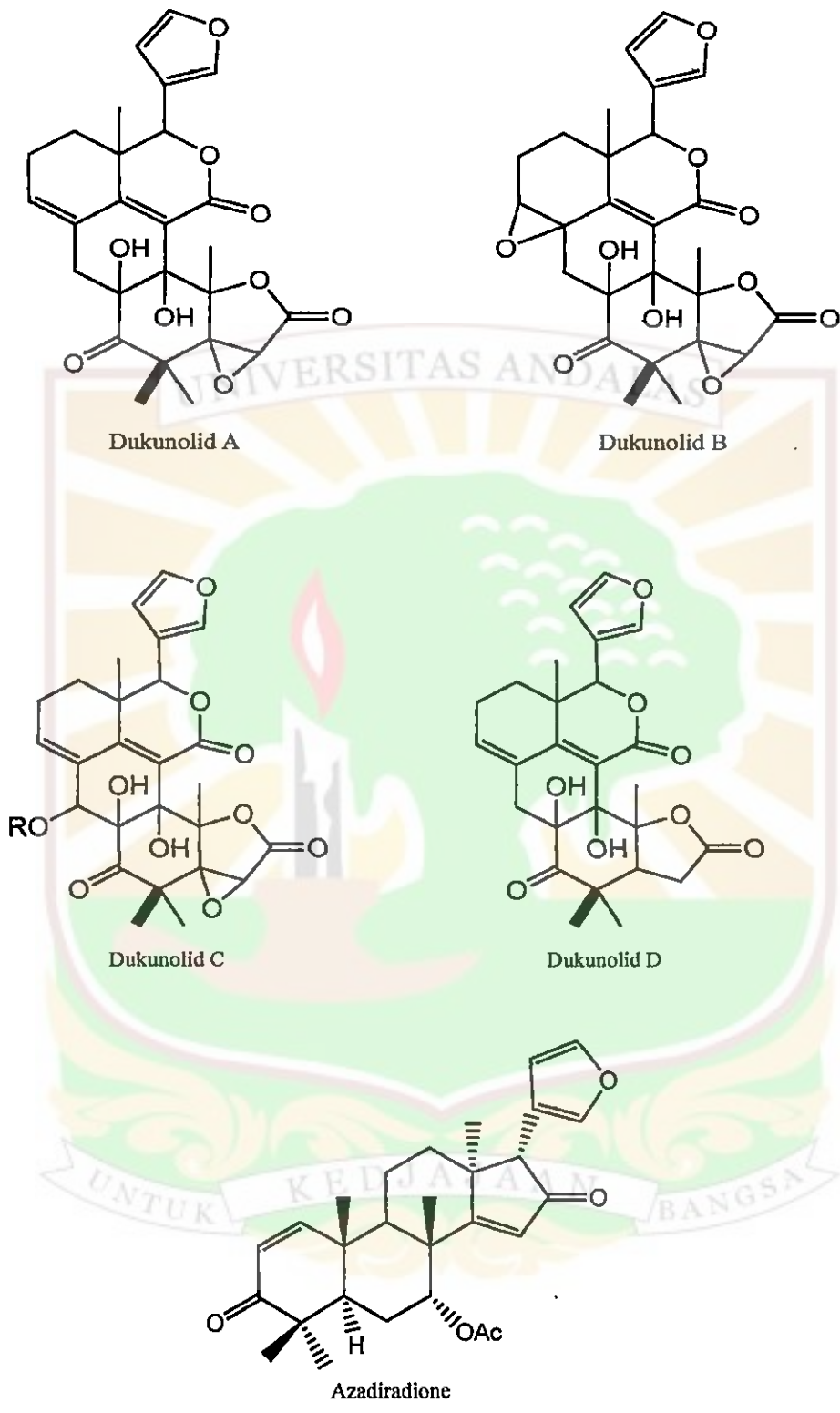
Biji duku mengandung senyawa alkaloid yang belum diketahui jenisnya, 1% resin yang larut dalam alkohol, dan dua senyawa pahit (*bitter*) yang bersifat toksik. Salah satu struktur dari senyawa pahit ini yang diberi nama dukunolid A, B, C, D, E dan F. Semua senyawa dukunolid tersebut termasuk ke dalam kelompok *bitter* tetranortriterpenoid (limonoid atau meliacin). Dukunolid C dan azadiradione menunjukkan aktifitas terhadap antimalaria. Struktur senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 2¹⁰.

d). Buah

Dari 100 g buah duku terkandung : 84 g air; sedikit protein dan lemak; 14,2 g karbohidrat, terutama gula pereduksi seperti glukosa; 0,8 g serat; 0,6 g abu; 19 mg Ca; 275 mg K; sedikit vitamin B1 dan B2; vitamin C, E. Kulit buah duku yang segar mengandung 0,2 % minyak volatil, resin, dan sedikit asam. Sedangkan pada kulit buah yang kering mengandung semiliquid oleoresin yang terdiri dari 0,17 % minyak volatile dan 22 % resin. Kulit buah duku banyak mengandung seco-onoceranoids, lansiosida A, B, dan C yang merupakan salah satu contoh struktur baru dari triterpenoid glikosida-gula amino. Kandungan lain dari kulit buah duku adalah 3-okso- α -bourbonena, termasuk seskuiterpenoid yaitu unsur pokok dari senyawa volatil yang terdiri atas tiga satuan unit isopren atau lima belas atom karbon^{3,11}.



Gambar 1. Senyawa yang diisolasi oleh Shi-Hui Dong dan Mayanti dari duku

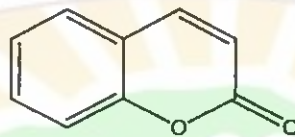


Gambar 2. Senyawa yang diisolasi oleh Nishizawa dari duku

2.3. Kumarin

2.3.1. Tinjauan Umum Kumarin

Kumarin memiliki inti Benzopiran-2-one yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah. Kumarin biasanya terdapat dalam bentuk kompleks dengan gula (glikosida) atau senyawa lainnya. Senyawa glikosida yang dihasilkan dapat dipisahkan dengan asam, aksi enzimatis atau radiasi ultraviolet. Struktur kerangka dasar kumarin dapat dilihat pada Gambar 3 dibawah ini

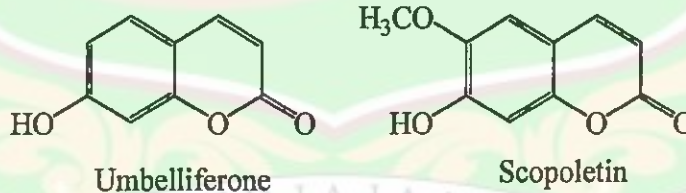


Gambar 3. Kerangka dasar kumarin

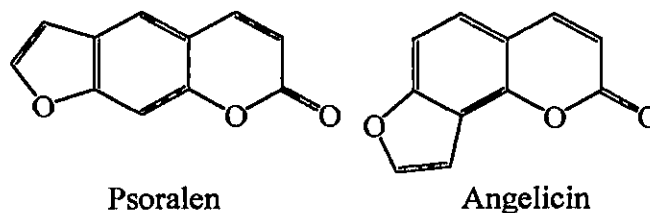
Kumarin dapat dikenal dari baunya. Bila daun yang mengandung kumarin dikeringkan, maka akan menimbulkan bau yang khas dari kumarin. Untuk pembuktian secara kualitatif dilakukan uji berdasarkan sifat fluoresensinya.

Secara umum struktur senyawa-senyawa kumarin diklasifikasikan atas empat kategori, yaitu :

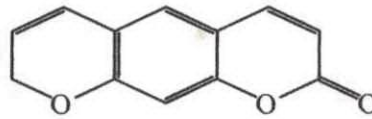
1. Kumarin sederhana, yaitu kumarin dan turunannya berupa alkoksilasi, hidroksilasi, alkilasi, atau glikosida. Contohnya :



2. Furanokumarin, terdiri dari jenis linier (psoralen) dan angular (angelicin) dengan substituen pada posisi benzoid yang tidak terpakai. Contohnya :

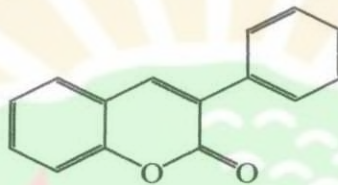


3. Piranokumarin, analog dengan furanokumarin yang memiliki cincin hetero lingkaran enam. Contoh :



Piranokumarin

4. Kumarin tersubstitusi pada cincin piron. Contohnya :



3-fenilkumarin

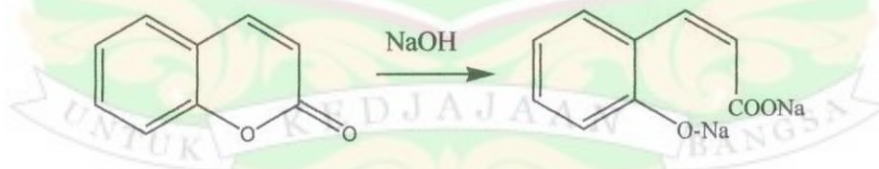
2.3.2 Sifat-sifat Kumarin

Senyawa kumarin sederhana memiliki sifat fisika sebagai berikut :

- Berbentuk kristal
- Titik leleh 68-70 °C
- Titik didih 297-299 °C

Seterusnya sifat-sifat kimia dari senyawa kumarin sederhana adalah :

- Lakton mudah terhidrolisis oleh alkali menjadi garam kumarinat,



- Mudah larut dalam kloroform dan larutan alkali.
- Peleburan Kumarin dengan NaOH menghasilkan asam asetat dan asam salisilat.

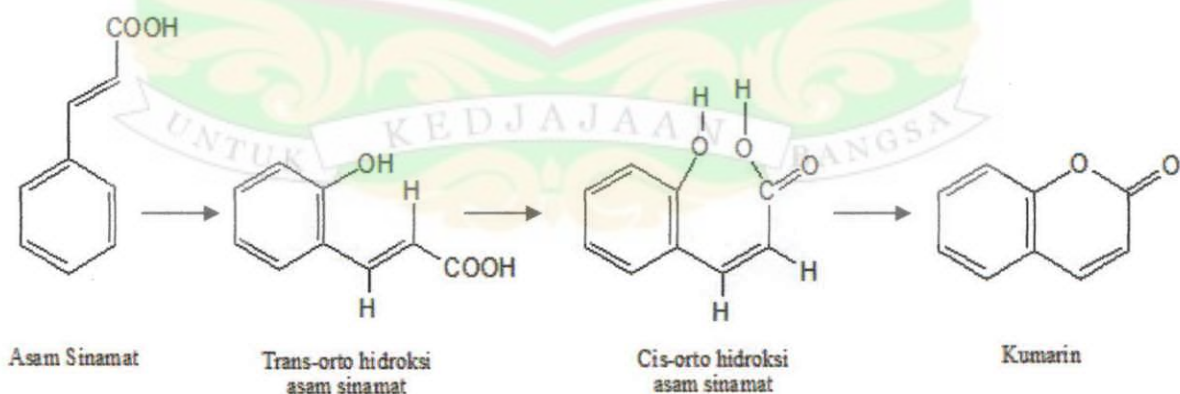
Adanya golongan kumarin yang tidak bisa diidentifikasi dengan pereaksi kimia tetapi bisa diidentifikasi dari warna flourisensinya saja. Maka warna flourisensi dari senyawa kumarin yang diungkapkan dengan sinar ultraviolet (365 nm).

Kebanyakan kumarin alam telah diisolasi dari tumbuhan tingkat tinggi, khususnya famili *Umbelliferae* dan *Rutaceae*, dan juga mikroorganisme. Pada tumbuhan tingkat tinggi kumarin ditemukan pada semua bagian, dari akar sampai daun, bunga dan buah. Sering pula ditemui campuran kompleks dari kumarin tersebut dan kombinasinya dengan gula dalam bentuk glikosida.

2.3.3 Biosintesis Kumarin

Secara struktural inti benzopiran dianggap sebagai turunan dari asam 2-hidroksisinamat, yang terbentuk melalui laktonisasi gugus karboksil dan 2 hidroksi. Dengan demikian inti kumarin sederhana adalah fenilpropanoid yang mempunyai cincin benzen yang berikatan dengan sebuah rantai alifatik C₃.

Senyawa kumarin berupa lakton yang dapat dibuka dengan adanya basa menjadi asam o-hidroksisinamat dan secara spontan mengalami siklisasi kembali pada pengasaman. Radiasi cis-sinamat tersebut mengakibatkan isomerisasi cis-trans. Hal ini membuktikan bahwa kumarin diturunkan dari asam shikimat melalui asam sinamat dan dengan adanya organisme yang mempunyai sistim enzim yang mampu melakukan hidroksilasi sinamat pada posisi orto, sehingga memungkinkan biosintesa kumarin terjadi^{12,13}. Jalur biosintesa kumarin ini ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Jalur biosintesis kumarin

2.4. Metoda Isolasi Senyawa Bahan Alam

2.4.1 Metoda Ekstraksi

Proses awal pengekstraksian adalah tahapan pembuatan serbuk sampel kering. Dari sampel kering dibuat serbuk dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar semakin halus serbuk sampel maka proses ekstraksi semakin efektif dan efisien, namun semakin halus serbuk maka makin rumit teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi (penyaringan).

Ekstraksi merupakan salah satu metoda pemisahan yang digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang terkandung dalam suatu tumbuhan. Dalam pemilihan pelarut untuk ekstraksi, pelarut tersebut harus dapat melarutkan senyawa organik yang terkandung dalam tumbuhan, dapat menguap dengan baik (titik didihnya rendah) dan tidak terjadi reaksi antara pelarut yang digunakan dengan hasil isolasi yang akan dimurnikan.

Metoda ekstraksi banyak jenisnya, tergantung pada tekstur, kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Beberapa jenis metoda ekstraksi diantaranya perkolasi, maserasi dan sokletasi. Prosedur klasik untuk memperoleh kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering adalah dengan ekstraksi pelarut non polar. Proses ekstraksi dilakukan berulang-ulang dengan pelarut beberapa kali.

Teknik ekstraksi yang digunakan diantaranya :

1. Ekstraksi Pelarut

Ekstraksi pelarut digunakan untuk mengekstraksi senyawa organik yang terlarut dalam suatu pelarut lainnya dan antara kedua pelarut tidak saling melarutkan dengan menggunakan corong pisah, sehingga akan membentuk dua lapisan, dan senyawa organik yang diinginkan akan tertarik kepada pelarut yang ditambahkan.

Dalam proses pengekstraksian, jumlah volume yang sama dari suatu pelarut lebih baik dilakukan banyak kali daripada satu kali saja. Dengan pengekstraksian banyak kali akan terjadi pengekstraksian lebih sempurna.

2. Distilasi

Distilasi digunakan untuk menarik senyawa organik yang titik didihnya dibawah 250°C . Pendistilasian senyawa-senyawa yang titik didihnya terlalu tinggi, dikuatirkan akan rusak oleh pemanasan sehingga tidak cocok untuk ditarik dengan teknik distilasi.

Dalam proses distilasi senyawa yang akan ditarik didihkan dan uap yang terjadi diembunkan dalam sebuah pendingin, sehingga mencair kembali. Proses pendidihan erat hubungannya dengan kehadiran udara dipermukaan. Bila suatu cairan dipanaskan, pendidihan akan terjadi pada suhu dimana tekanan uap dari larutan sama dengan tekanan udara di permukaan cairan. Tekanan udara permukaan terjadi oleh adanya udara di atmosfer.

3. Sublimasi

Beberapa zat padat ada yang jika dipanaskan dapat langsung berubah menjadi uap, tanpa harus lewat fase cair, dan ini disebut menyublin. Pemakaian sifat menyublin untuk menarik senyawa organik disebut sublimasi.

Teknik sublimasi dapat digunakan untuk mengekstrak zat padat. Zat padat dapat menyublin bila dipanaskan, dimana uapnya akan naik. Uap yang terjadi ini didinginkan dan akan terbentuk zat pada dipermukaan alat yang telah didinginkan.

4. Maserasi

Maserasi atau perendaman merupakan teknik pengekstraksian yang paling klasik. Sampel yang telah dihaluskan, direndam dalam pelarut organik selama beberapa waktu. Kemudian disaring, dan hasilnya didapat berupa filtrat. Proses maserasi dapat dilakukan tanpa pemanasan atau dengan pemanasan, atau dengan pengocokan menggunakan ultrasonik.

5. Perkolasi

Perkolasi merupakan pengembangan dari maserasi. Sampel disiram dengan pelarut dan sekaligus hasil akan didapat sebagai filtrat. Pelarut yang digunakan bisa dalam keadaan dingin atau dalam keadaan panas.

6. Sokletasi

Sokletasi adalah teknik pengekstraksian yang kontinue. Sokletasi ditujukan untuk menarik zat padat atau cair yang terdapat dalam zat padat dan dapat ditarik dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang digunakan untuk sokletasi adalah pelarut-pelarut yang titik didihnya rendah seperti eter, aseton, metilen klorida, dan petroleum eter. Alat sokletasi terdiri dari tiga bahagian, yaitu labu, soklet, dan pendingin tegak¹⁴.

2.4.2. Metode Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling baik untuk pemurnian senyawa. Hampir setiap campuran kimia dapat dipisahkan dengan metoda ini, mulai dari bobot yang paling besar sampai bobot yang paling kecil. Pemisahan secara kromatografi berdasarkan beberapa kecenderungan sifat fisiknya yaitu ;

1. Kecenderungan molekul untuk larut dalam cairan (partisi).
2. Kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (adsorpsi, penyerapan).

Metoda kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan secara fisika yang menggunakan dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan migrasi yang disebabkan oleh beda koefisien distribusi dari masing-masing komponen. Salah satunya merupakan lapisan stasioner (fasa diam) dengan permukaan yang luas dan fasa yang lain berupa zat alir (fluid) yang mengalir lambat menembus sepanjang lapisan stasioner¹⁵.

2.4.2.1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) fase diamnya berupa lapisan dan fase geraknya mengalir karena kerja kapiler. Dalam kajian analisis kualitatif, kromatografi lapis tipis sangat umum digunakan dalam teknik analisis kimia, antara lain : a. identifikasi suatu senyawa, b. mengetahui berapa banyak jenis senyawa dalam suatu campuran (kemurnian), c. mengetahui pelarut/ perbandingan pelarut yang cocok untuk pemisahan pada kromatografi kolom, d. memonitor pemisahan pada kromatografi kolom.

Visualisasi untuk senyawa yang tidak berwarna harus dideteksi dengan cara penyinaran lampu UV, dengan memasukkan ke dalam uap iodine, atau dengan reaksi penampak noda seperti dragendorff. Noda yang di dapat ditandai dengan pensil untuk menentukan harga Rf yang berkisar 0-1. Harga Rf dapat dihitung dengan membandingkan jarak yang ditempuh komponen dengan jarak yang ditempuh eluen¹⁵.

2.4.2.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metoda kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Penggunaan fase gerak (eluen) disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dipisahkan.

Fase diam ditempatkan dalam tabung kaca berbentuk silinder, pada bagian bawah tertutup dengan katup atau kran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, eluen yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan. Eluen biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar dari kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, sering kali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis¹⁵.

Untuk mengoptimalkan hasil pemisahan dapat pula menggunakan kolom yang dilengkapi dengan aliran tekanan udara yang berasal dari aerator. Dalam hal ini kolom di beri modifikasi yakni, ujung kolom dibagian atas diberi penutup dan lubang saluran udara melalui pipa atau selang aerator. Tekanan udara akan mempercepat proses elusi dalam kolom. Tekanan ini lebih menguntungkan karena memisahkan dengan baik, tidak memakan waktu yang lama, elusi berjalan dengan baik jika dibandingkan dengan tanpa menggunakan tekanan udara¹⁶.

2.4.3. Metoda rekristalisasi

Rekristalisasi adalah metoda yang paling penting untuk memurnikan dan memisahkan senyawa padat. Untuk itu suatu pelarut yang sesuai dijenuhkan dengan jalan pemanasan dengan senyawa padat yang akan dimurnikan, bagian yang tidak larut disaring dalam keadaan panas-panas, kemudian larutan didinginkan pelan-pelan, substansi biasanya dalam bentuk murni akan mengkristal.

Rekristalisasi dapat pula digunakan pelarut campuran. Zat padat akan terlebih dahulu dilarutkan dalam sedikit pelarut yang paling mudah melarutkannya lalu ditambahkan pelarut yang kedua yang tidak melarutkannya sampai jenuh.

2.4.4. Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi

Salah satu pengujian kemurnian senyawa hasil isolasi yaitu berdasarkan titik leleh. Titik leleh merupakan temperatur keadaan suatu kristal mulai meleleh sampai kristal meleleh seluruhnya. Kegunaan penentuan titik leleh suatu senyawa adalah penentuan kemurnian. Pada penentuan titik leleh suatu senyawa, bila harga yang diperoleh memiliki selisih angka yang lebih kecil dari satu atau sama dengan 2°C , maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki kemurnian yang baik, tetapi jika selisihnya lebih besar dari 2°C , maka senyawa tersebut belum murni.

2.5. Metoda Karakterisasi

2.5.1. Spektroskopi ultraviolet

Apabila suatu molekul menyerap radiasi ultraviolet, didalam molekul tersebut terjadi perpindahan tingkat energi elektron-elektron ikatan di orbital molekul paling luar dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi. Untuk mempelajari serapan ultraviolet secara kualitatif berkas radiasi dikenakan pada cuplikan dan intensitas radiasi yang ditransmisikan harus diukur. Penggunaan spektroskopi ultraviolet secara kualitatif berhubungan dengan hukum Lambert-Beer, maka dapat dinyatakan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi dan tebal cuplikan.

Pada umumnya senyawa yang hanya mempunyai transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$ yang mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 150 nm, sedangkan senyawa yang mempunyai transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ (disebabkan oleh kromofor tidak berkonyugasi) mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang sekitar 170-190 nm. Senyawa yang mempunyai transisi $n \rightarrow \pi^*$ mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 280 nm.

Pada sistem berkonyugasi, orbital π dari masing-masing ikatan rangkap berinteraksi membentuk suatu perangkat baru orbital ikatan dan anti ikatan. Untuk transisi $\pi \rightarrow \pi^*$, bila sistim berkonyugasi dalam molekul makin panjang, perbedaan energi antara keadaan dasar dan keadaan tereksitasi makin kecil¹⁷.

2.5.2. Spektroskopi inframerah

Spektroskopi inframerah sangat penting dalam kimia modern, terutama pada kimia organik dan organometalik. Spektrofotometri inframerah lebih banyak digunakan untuk identifikasi suatu senyawa melalui gugus fungsinya. Hal ini mungkin disebabkan spektrum inframerah senyawa organik bersifat khas, artinya senyawa yang berbeda akan mempunyai spektrum yang berbeda pula. Daerah inframerah terletak antara spektrum elektromagnetik cahaya tampak dan spektrum radio yaitu antara 400 dan 4000 cm^{-1} ¹⁸.

Adanya vibrasi molekul dapat memberikan sifat-sifat yang khas dari suatu senyawa dalam spektrofotometri inframerah. Pita absorpsi inframerah akan tampak untuk tiap derajat kebebasan vibrasi asalkan terjadi perubahan momen dwi lainnya. Absorpsi terjadi di daerah inframerah dan intensitas absorpsi cukup kuat untuk dideteksi¹⁷.

Untuk keperluan elusidasi struktur maka daerah dengan bilangan gelombang $1400 - 4000\text{ cm}^{-1}$ yang berada dibagian kiri spektrum IR, merupakan daerah yang khusus berguna untuk identifikasi gugus-gugus fungsional, yang merupakan absorpsi dari vibrasi ulur. Selanjutnya daerah yang berada disebelah kanan bilangan gelombang 1400 cm^{-1} sering kali sangat rumit karena pada daerah ini terjadi absorpsi dari vibrasi ulur dan vibrasi tekuk, namun setiap senyawa organik memiliki absorpsi yang karakteristik pada daerah ini.

Oleh karena itu bagian spektrum ini disebut daerah sidik jari (fingerprint region), meskipun bagian kiri suatu spektrum nampaknya sama untuk senyawa-senyawa yang mirip, daerah sidik jari haruslah cocok agar dapat disimpulkan bahwa kedua senyawa tersebut sama.

2.6. Aktivitas Antioksidan

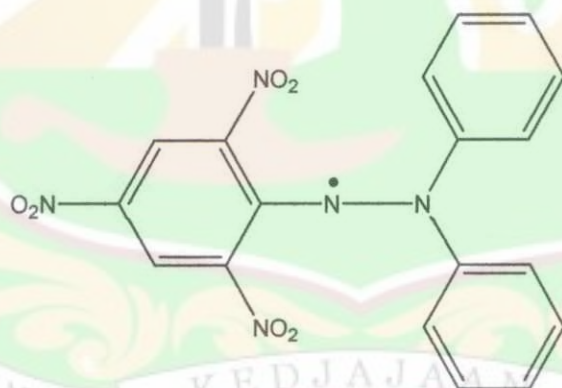
Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan pembentukan ataupun memadukan efek spesies oksigen reaktif . Penggunaan senyawa antioksidan juga anti radikal saat ini semakin meluas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam

menghambat penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, arteriosclerosis, kanker, serta gejala penuaan. Masalah-masalah ini berkaitan dengan kemampuan antioksidan untuk bekerja sebagai inhibitor (penghambat) reaksi oksidasi oleh radikal bebas reaktif yang menjadi salah satu pencetus penyakit-penyakit di atas ¹⁹.

2.7. Metoda DPPH sebagai uji aktifitas antioksidan

Metoda DPPH menggunakan molekul 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang memiliki sifat sebagai radikal bebas yang disebabkan karena delokalisasi elektron pada molekul. Delokalisasi inilah yang menyebabkan senyawa berwarna violet gelap dan memiliki serapan pada panjang gelombang 517 nm.

Metode ini akan memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Penangkapan radikal bebas oleh senyawa yang diuji mengakibatkan elektron pada radikal bebas menjadi berpasangan yang menyebabkan kehilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil. Adapun struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini ¹⁹.



Gambar 5. Struktur DPPH

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2011 sampai Desember 2011 di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam dan Kimia Organik Sintesa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang. Pengukuran spektrofotometer UV, spektrofotometer IR dilakukan dilaboratorium Analisis Terapan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat distilasi pelarut, rotary evaporator Heidolp WB 2000, pipa kapiler, plat KLT (silica gel 60 F₂₅₄), kolom kromatografi terbuka. Lampu UV untuk pengungkap noda model UV GL – 58 UV 254 dan 365 nm, melting point apparatus (fisher john), Spektrofotometer ultraviolet UV-Vis Secomam S 1000 PC, spektrofotometer inframerah FTIR Perkin Elmer 1600 series.

3.2.2. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, metanol teknis, etil asetat teknis, heksana teknis, NaOH, HCl, plat silika gel untuk KLT dan untuk kromatografi kolom digunakan silika gel 60 Art 77733 keluaran Merck, Pereaksi Meyer, pereaksi Liebermann Burchard, Serbuk Magnesium, besi (III) klorida dan DPPH 55,8 µM.

3.2.3. Bahan tumbuhan

Tumbuhan duku diperoleh dari Sicincin Kec 2 X 11 Enam Lingsung Kabupaten Padang Pariaman. Bagian tumbuhan yang diambil adalah kulit batang sebanyak 2,5 Kg kering.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembuatan Pereaksi

a. Pembuatan pereaksi Meyer

Pereaksi Meyer dibuat dengan cara menambahkan 1,36 g Raksa (II) klorida dengan 0,5 g kalium iodida lalu dilarutkan dan diencerkan dengan akuades menjadi 100 ml dengan labu takar.

b. Pembuatan pereaksi Liebermann-Burchard

Untuk membuat pereaksi Liebermann-Burchard sebagai penampak noda pada plat KLT dengan cara mencampurkan sebanyak 5 mL asam sulfat pekat dan 5 g anhidrida asetat, kemudian dicukupkan volumenya menjadi 100 mL dengan metanol.

c. Pembuatan pereaksi Besi (III) klorida 5 %

Pereaksi besi(III) klorida 5 % dibuat dari 5 g besi (III) klorida ditambahkan akuades hingga volumenya 100 mL.

d. Pembuatan pereaksi Natrium hidroksida 1 %

Pereaksi Natrium hidroksida 1 % dibuat dengan melarutkan 1 g Natrium hidroksida dengan akuades hingga volumenya 100 mL.

e. Pembuatan DPPH (1,1-diphenyl-2- picrylhydrazil) 55,8 μ M

Untuk pembuatan larutan DPPH, ditimbang 2,2 mg DPPH yang dilarutkan dalam metanol hingga volume 100 mL dan didapatkan larutan DPPH 55,8 μ M.

f. Pembuatan asam sulfat 2 N

Isi gelas piala 250 mL dengan aquadest kira-kira 100 mL, Lalu tambahkan 13,9 mL asam sulfat pekat secara perlahan. Campuran ditambahkan akuades kembali hingga 250 mL.

3.3.2. Pengujian Profil Fitokimia Kulit Batang Duku

3.3.2.1. Pemeriksaan Kumarin

Untuk menguji adanya senyawa kumarin dalam sampel yaitu kulit batang duku dirajang halus dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada garis awal plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan kering di udara terbuka. Setelah itu dielusi dalam bejana yang berisi 10 mL eluen etil asetat. Noda dimonitor dibawah lampu UV 365 nm.

Hasil KLT disemprot dengan larutan NaOH 1% dan selanjutnya dilihat dibawah lampu UV 365 nm. Adanya fluoresensi yang bertambah terang setelah disemprot dengan NaOH 1% menandakan sampel tersebut mengandung senyawa kumarin.

3.3.2.2. Pemeriksaan Alkaloida

Pemeriksaan alkaloida dilakukan menurut metode Culvenor-Fitzgerald. Sampel segar seberat 4 g dipotong kecil-kecil, digerus dalam lumpang dengan bantuan pasir bersih. Sampel yang sudah digerus ditambah dengan 10 mL kloroform, kemudian tambahkan 10 mL kloroform amoniak 0,05 M dan ditambah asam sulfat 2 N. Campuran dikocok perlahan dan biarkan sehingga terbentuk pemisahan lapisan asam dan kloroform. Ambil lapisan asam sulfat dan pindahkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian tambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer. Reaksi positif ditandai dengan kabut putih hingga gumpalan/endapan putih.

3.3.2.3. Pemeriksaan Steroida, Triterpenoida, Saponin dan Senyawa Fenolik

Metode pemeriksaan kandungan flavonoid, triterpenoid, steroid, dan senyawa fenolik diadopsi dari Simens et.al. Sampel bubuk kering sebanyak 2 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dimaserasi dengan metanol yang telah dipanaskan (di atas penangas air) selama 15 menit. Sampel disaring ke dalam tabung reaksi lain dan biarkan seluruh metanol menguap hingga kering. Lalu ditambahkan kloroform dan air suling dengan volume masing-masingnya sebanyak 5 mL, kocok dengan baik, kemudian pindahkan ke dalam tabung reaksi, biarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan kloroform-air. Lapisan kloroform di bagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa triterpenoid dan steroid.

1. Lapisan air

- a. 1 mL dikocok selama 1 menit. Terbentuk busa yang tidak hilang selama 5 menit menandakan adanya saponin.
 - b. Beberapa tetes ditempatkan dalam tabung reaksi, tambahkan FeCl_3 . timbul warna hijau sampai ungu menandakan adanya fenolik.
 - c. Beberapa tetes ditempatkan dalam tabung reaksi, tambahkan asam klorida pekat dan serbuk magnesium. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya flavonoid.
2. Lapisan kloroform diteteskan pada plat tetes dan dibiarkan kering. Ke dalam lobang pertama ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat. Lobang kedua ditambahkan setetes asam asetat anhidrat dan setetes asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Warna merah, pink atau violet menandakan positif triterpenoid. Sedangkan warna biru atau hijau menandakan positif steroid.

3.4. Isolasi Kumarin dari Kulit Batang Duku

3.4.1. Ekstraksi

Sebanyak 2,5 Kg bubuk kulit batang tumbuhan duku diekstraksi dengan metode ekstraksi bertingkat, mula-mula dimaserasi dengan n-Heksana (1 x 5 L dan 4 x 2,5 L), masing-masing selama 4 hari sambil sesekali diaduk kemudian disaring. Hasil ekstrak digabung dan dipekatkan dengan bantuan rotari evaporator pada suhu 40° sehingga diperoleh ekstrak kental heksana.

Ampas sisa maserasi dengan heksana dimaserasi kembali dengan etil asetat (4 x 2,5 L) masing-masing selama 4 hari kemudian disaring. Hasil ekstrak digabung dan dipekatkan dengan bantuan rotari evaporator pada suhu 40° sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.

3.4.2. Kromatografi Kolom

Fraksi Etil asetat 10 g dipisahkan komponen-komponennya dengan kromatografi kolom. Pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel dan fasa geraknya menggunakan sistem elusi bergradien (Step Gradien Polarity) yaitu pemisahan dengan cara meningkatkan secara bertahap kepolaran dari eluen yang digunakan (heksana – dikloro metan – etil asetat – metanol) .

Kolom silika gel dibuat dengan mensuspensikan silika gel dengan pelarut n-heksana, yang bertujuan untuk menghomogenkannya dan menghilangkan kemungkinan adanya gelembung udara yang akan mengganggu pada proses pemisahan. Kemudian bubuk silika ini dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas sebagai penyaring.

Sampel yang akan diuji dipreadsorpsi terlebih dahulu. Caranya dengan mencampurkan sampel dengan silika gel dengan perbandingan 1 : 1. Preadsorpsi diawali dengan melarutkan ekstrak atau sampel yang akan dikolom dengan pelarut yang melarutkannya lalu dihomogenkan dengan silika dan didiamkan 1 hari agar pelarutnya menguap. Sampel yang telah dipreadsorpsi dimasukkan ke dalam kolom yang telah disiapkan.

Selanjutnya dilakukan elusi dari perbandingan eluen heksana : DCM, DCM : etil Asetat , etil Asetat : metanol. Fraksi-fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan vial 10 mL, kemudian dianalisa pola pemisahan nodanya dengan KLT. Fraksi yang memiliki pola noda dan Rf yang sama digabung sehingga didapatkan fraksi yang lebih besar. Fraksi dimurnikan dapat dengan rekristalisasi berulang-ulang, KLT preparatif dan sampai didapatkan noda yang tunggal dengan berbagai perbandingan eluen.

3.5. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

Untuk menentukan golongan senyawa hasil isolasi maka dilakukan uji kumarin dengan menyemprotkan NaOH 1 % ke atas plat KLT hasil elusi senyawa hasil isolasi. Kira-kira 1 mg kumarin dilarutkan kedalam 100 mL metanol diidentifikasi dengan alat Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Lakukan pula dengan penambahan pereaksi geser yaitu larutan natrium metoksida, aluminium klorida. Masukkan larutan kumarin kedalam kuvet dan tambahkan beberapa tetes pereaksi geser. Aduk larutan kumarin sampai homogen dan tunggu kira-kira 5 menit. Ukur serapan maksimum larutan kumarin dalam metanol tanpa pereaksi geser dan larutan kumarin dalam metanol menggunakan pereaksi geser.

Untuk memperoleh spektrum inframerah digerus 1 mg sampel dengan 100 mg KBr sampai homogen. Kemudian dijadikan pelet dengan memberikan tekanan tinggi. Letakkan pelet pada alat spektrofotometri inframerah dan ukur spektrumnya.

3.6. Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Duku

Sebanyak 50 mg fraksi dilarutkan didalam 50 mL metanol sehingga didapatkan larutan sampel masing-masing fraksi dengan konsentrasi 0,1%. Sebanyak 0,2 mL larutan sampel ditambahkan dengan 3,8 mL DPPH 55,8 μ M. Setelah itu, sampel diletakkan ditempat gelap selama 30 menit dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 515 nm. Sebagai kontrol digunakan 3,8 mL larutan DPPH 55,8 μ M yang ditambahkan 0,2 mL metanol²⁰.

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{A \text{ Kontrol} - A \text{ Sampel}}{A \text{ Kontrol}} \times 100\%$$

Skema kerja dari uji antioksidan ekstrak kulit batang duku ini terdapat pada Lampiran 2.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengujian Profil Fitokimia Kulit Batang Duku

Hasil pengujian kandungan metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, fenolik dan kumarin) terhadap kulit batang duku, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengujian profil fitokimia kulit batang duku

No	Metabolit sekunder	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
1	Alkaloid	Meyer	Tdk terbentuk endapan putih	(-)
2	Flavonoid	Sianidin test	Tdk terbentuk Larutan orange – merah	(-)
3	Steroid	Liebermann -burchard	Tidak terbentuk larutan biru	(-)
4	Triterpenoid	Liebermann -burchard	Larutan merah ungu	(+)
5	Fenolik	FeCl ₃	Tidak terbentuk Larutan ungu	(-)
6	Saponin	H ₂ O	Terbentuk busa	(+)
7	Kumarin	NaOH 1%	Fluorisensi semakin terang/KLT	(+)

(+) : Mengandung senyawa

(-) ; Tidak mengandung senyawa

Dari data diatas dapat diketahui bahwa kulit batang duku mengandung senyawa metabolit sekunder, yaitu triterpenoid, saponin dan kumarin.

4.2. Isolasi Kumarin dari Kulit Batang Duku

4.2.1 Ekstraksi

Proses ekstraksi dimulai dengan mengeringkan kulit batang duku pada temperatur kamar, kemudian dihaluskan dengan mesin penghalus sehingga didapatkan sampel kulit batang berbentuk serbuk halus sebanyak 2,5 kg. Penghalusan ini bertujuan sampel kulit batang memiliki luas permukaan yang besar, sehingga proses isolasi berjalan sempurna karena interaksi sampel dengan pelarut semakin

maksimal. Kulit batang duku yang berbentuk serbuk diekstraksi dengan metoda kenaikan kepolaran dengan menggunakan pelarut heksana dan etil asetat suhu kamar. Maserasi dengan pelarut heksana dilakukan sebanyak 5 kali masing-masingnya selama 4 hari dan untuk pelarut etil asetat proses maserasinya dilakukan sebanyak 4 kali masing-masingnya selama 4 hari dan total volume pelarut terpakai adalah 15 L heksana dan 12,5 L etil asetat. Hasil maserasi dengan heksana dan etil asetat diperoleh dua fraksi seperti tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Maserasi n-heksana dan etilasetat

No	Fraksi	Berat	%	Warna
1.	heksana	63,4 gram	0,025	Hijau Kehitaman
2.	etil Asetat	35,2 gram	0,014	Hijau kehitaman

4.2.2 Kromatografi Kolom

Hasil pemurnian 10 g fraksi etil asetat dengan metoda kromatografi kolom dan pengelusan dilakukan dengan metoda SGP menggunakan pelarut heksana, diklorometena, etilasetat dan metanol diperoleh 201 vial seperti pada Tabel 3.

Tabel 3 . Hasil Kolom Kromatografi terbuka

No	<i>Perbandingan Volume Eluen</i>				<i>Volume terpakai (mL)</i>	No Vial
	n-Heksana	DCM	Etil asetat	Metanol		
1	5	5	0	0	200	0
2	4	6	0	0	200	0
3	3	7	0	0	200	1-3
4	2	8	0	0	200	4-12
5	1	9	0	0	200	13-23
6	0	10	0	0	200	24-30
7	0	9	1	0	200	31-40
8	0	8	2	0	200	41-51
9	0	7	3	0	200	52-64

10	0	6	4	0	200	65-76
11	0	5	5	0	200	77-89
12	0	4	6	0	200	90-104
13	0	3	7	0	200	105-114
14	0	2	8	0	200	115-129
15	0	1	9	0	200	130-141
16	0	0	10	0	200	142-156
17	0	0	8	2	200	157-169
18	0	0	6	4	200	170-182
19	0	0	2	8	200	183-191
20	0	0	0	10	200	192-201

Hasil kromatografi kolom ditampung pada vial dengan volume 20 ml dan dilakukan kromatografi lapisan tipis sehingga diperoleh beberapa kelompok fraksi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Analisis KLT terhadap kelompok fraksi

<i>No</i>	<i>Fraksi</i>	<i>No Vial</i>	<i>Kromatogram</i>	
			<i>UV 365 nm</i>	<i>Liberman-Buchard</i>
1	A	1-40	Tidak ada	Tidak ada
2	B	41-48	Tidak ada	4 noda tailing
3	C	49-60	1 noda (terang)	3 noda tailing
4	D	61-67	1 noda (lemah)	5 noda tailing
5	E	68-76	Tidak ada	4 noda tailing
6	F	77-85	Tidak ada	3 noda tailing
7	G	86-100	Tidak ada	4 noda tailing
8	H	101-106	Tidak ada	3 noda tailing
9	I	107-113	Tidak ada	3 noda tailing
10	J	114-115	Tidak ada	1 noda tailing
11	K	116-128	Tidak ada	3 noda tailing

12	L	129-141	Tidak ada	3 noda tailing
13	M	142-165	Tidak ada	3 noda tailing
14	N	166-173	Tidak ada	4 noda tailing
15	O	174-195	Tidak ada	3 noda tailing
16	P	195-201	Tidak ada	2 noda taling

Fraksi C memberikan 1 noda berfluorisensi biru terang pada UV 365 dan 3 noda berwarna merah dengan Liebermann Burchard. Hal ini berindikasi bahwa fraksi ini berkemungkinan mengandung kumarin karena terdapat 1 noda yang berfluorisensi biru pada UV 365. Setelah disemprotkan NaOH 1% warna biru menjadi terang. Oleh karena itu pemurnian selanjutnya difokuskan pada senyawa yang berfluorisensi biru.

Selanjutnya dilakukan KLT preparatif dengan menggunakan eluen heksana : etil asetat (6 : 4). Hasil dari preparatif kemudian dilarutkan dalam metanol dan didapatkan padatan amorf sebanyak 5 mg. Senyawa murni yang diperoleh dilakukan diuji kembali tingkat kemurniannya dengan cara melakukan elusi dengan eluen heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 6 ; 2 : 8 dan etil asetat. Hasil elusi yang diperoleh memperlihatkan noda tunggal. Nilai Rf yang diperoleh ditunjukkan pada tabel 5.

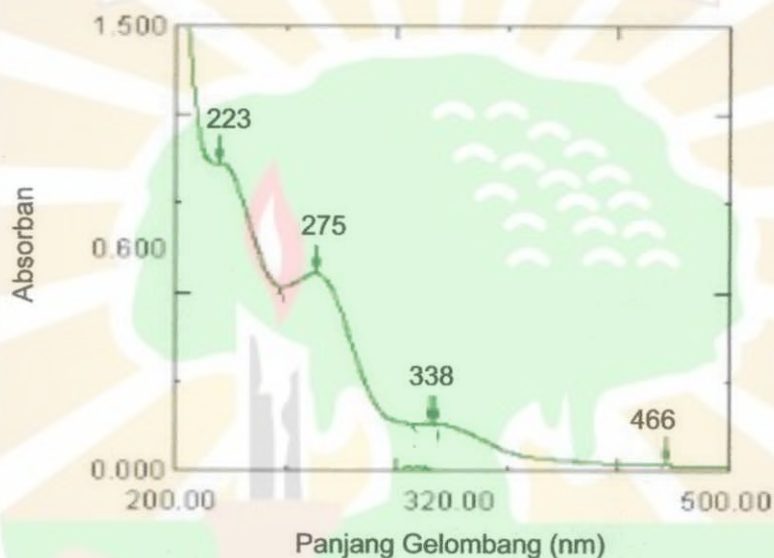
Tabel 5. Nilai Rf senyawa hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen

No	Pengelusi	Rf
1	heksana: etil asetat (4:6)	0,44
2	heksana: etil asetat (2:8)	0,68
3	etil asetat	0,75

Data diatas menunjukkan senyawa murni memiliki tingkat kepolaran yang cukup tinggi karna noda tunggal pada plat KLT memberikan jarak tempuh noda yang jauh seiring meningkatnya kepolaran dari eluen yang digunakan.

4.3. Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

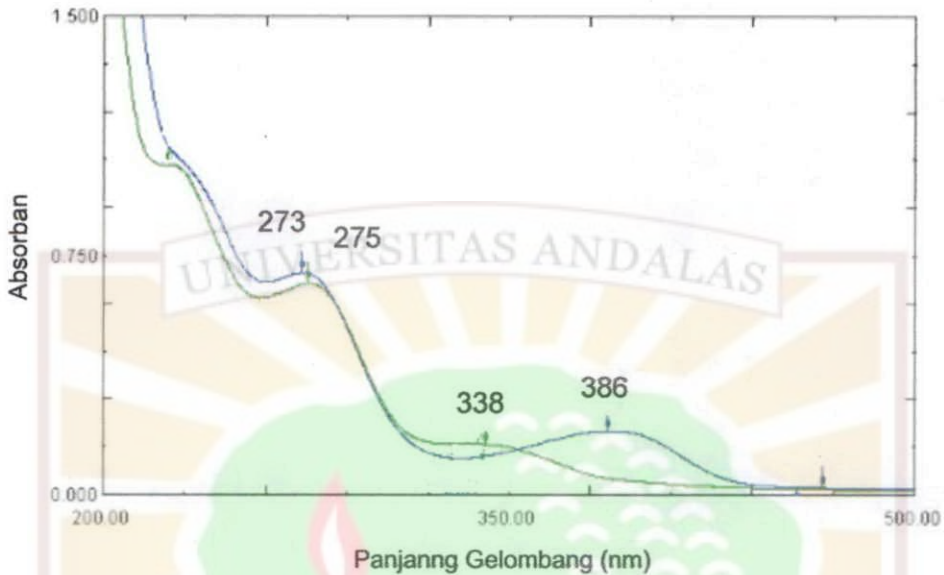
Karakterisasi senyawa hasil isolasi dengan alat spektrofotometer UV-1700 Series. Spektrum UV diperoleh dengan melewatkan cahaya dengan panjang gelombang 200-500 nm melalui larutan encer senyawa tersebut dalam pelarut yang tidak menyerap cahaya pada panjang gelombang tersebut. Spektrum UV yang dihasilkan dari senyawa kumarin yang dilarutkan dengan pelarut metanol ini memberikan serapan maksimum pada λ_{max} ($\log \epsilon$, nm) : 338 (0,158); 275 (0,664); 223 (1,034) nm ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi

Berdasarkan pita serapan maksimum yang diperoleh, adanya serapan pada panjang gelombang 275 nm. Informasi ini menandakan bahwa adanya ikatan rangkap berkonyugasi, karena sistem konyugasi menyerap cahaya > 200 nm. Hal ini disebabkan adanya kromofor yang membentuk transisi dari π ke π^* , yang merupakan kromofor yang khas untuk sistem ikatan rangkap terkonyugasi ($-C=C-C=C-$) atau pada cincin aromatis. Dari spektrum juga terdapat serapan pada panjang gelombang > 300 nm yaitu pada panjang gelombang 338 nm, informasi ini menandakan adanya adanya kromofor yang memberikan transisi dari n ke π^* memperlihatkan adanya heteroatom yang berkonyugasi ($-C=C-C=O$).

Hasil Penambahan pereaksi geser NaOMe terhadap senyawa hasil isolasi ini dapat dilihat pada Gambar 7.

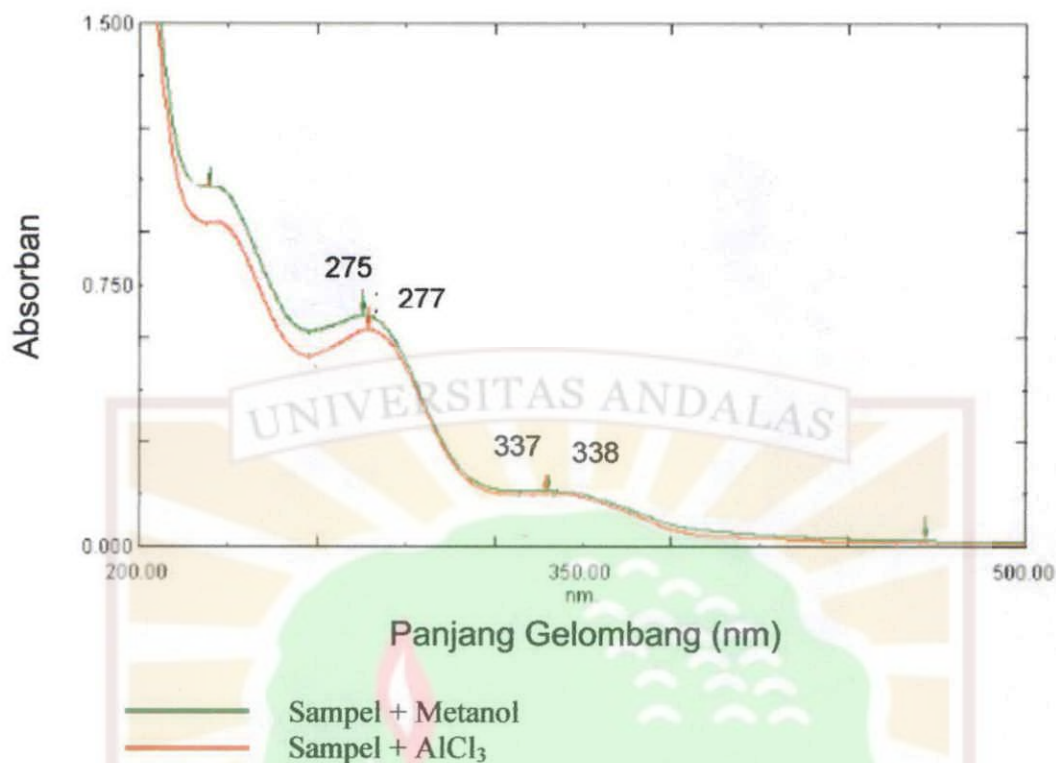


Gambar 7. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi + NaOMe

- Sampel + MeOH
- Sampel + MeOH + NaOMe

Penambahan pereaksi geser NaOMe bertujuan untuk mengetahui pola hidroksilasi dan mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi yang diindikasikan adanya pergeseran batokromik pada spektrum dengan nilai minimal sebesar 5 nm. Pada pengukuran terhadap senyawa hasil isolasi terjadi pergeseran pada spektrum yaitu pada pita I sebesar 48 nm dan pita II sebesar 2 nm, ini berarti pada senyawa hasil isolasi ada gugus hidroksil yang lebih asam pada inti kumarin¹⁸.

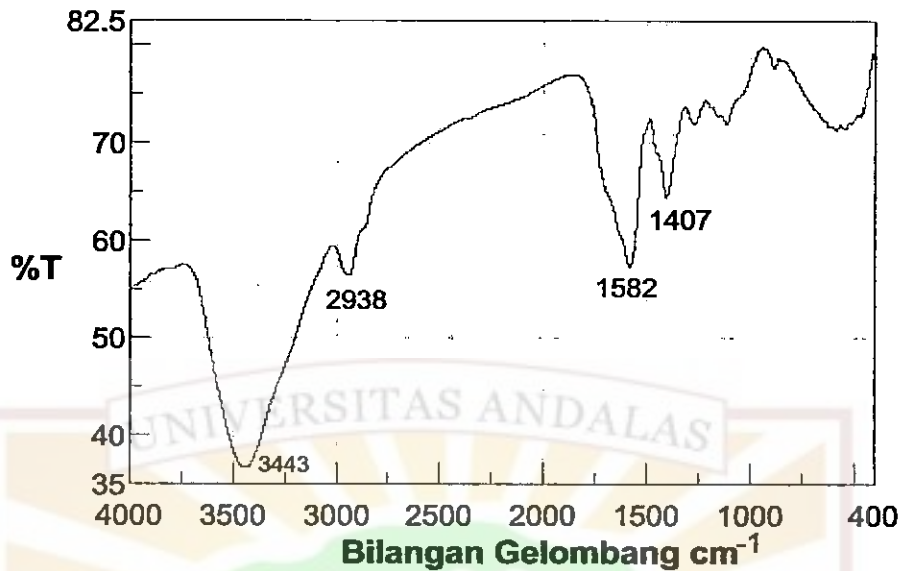
Hasil Penambahan pereaksi geser AlCl₃ terhadap senyawa hasil isolasi ini dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Spektrum UV-Tampak senyawa hasil isolasi + AlCl₃

Penambahan AlCl₃ bertujuan untuk mengamati adanya gugus orto dihidroksi pada cincin benzena. Pada pengukuran terhadap senyawa hasil isolasi tidak memberikan pergeseran panjang gelombang yang berarti (>5nm) dan mengindikasikan tidak adanya gugus orto-dihidroksil pada cincin benzena.

Hasil pengukuran spektroskopi inframerah memperlihatkan beberapa pita serapan penting pada panjang gelombang 3443 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹, 1582 cm⁻¹, 1407 cm⁻¹, 1271 cm⁻¹ dan 1119 cm⁻¹ seperti pada Gambar 9.



Gambar 9. Spektrum Inframerah senyawa hasil isolasi

Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi memberikan indikasi beberapa pita serapan penting yaitu pita serapan OH pada vibrasi regangan di daerah 3443 cm⁻¹. Pita serapan C – H aromatik pada 2938 cm⁻¹ (3300 – 2700 cm⁻¹), menurut literatur hal ini mengindikasikan adanya cincin piron pada benzen. Sedangkan serapan pada daerah 1582 cm⁻¹ dan 1407 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya gugus karbonil dari ester siklik yang khas untuk senyawa kumarin²¹. Pada spektrum IR senyawa hasil isolasi ini juga teramati adanya vibrasi tekukan C – O pada angka gelombang 1119 cm⁻¹

4.4 Uji Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Duku

Pada pengujian awal uji antioksidan ini ditentukan terlebih dulu panjang gelombang maksimum DPPH. Dari hasil pengukuran didapatkan panjang gelombang DPPH λ_{maks} adalah 515,10 nm. Panjang gelombang ini digunakan untuk pengukuran absorban larutan sampel.

Dari hasil pengukuran absorban fraksi heksana dan etil asetat yang dilakukan secara duplo, absorban dari masing-masing sampel yang dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 . Hasil pengukuran absorban dan daya antioksidan dari fraksi n-heksan dan etil asetat, ekstrak kulit batang duku

No	Fraksi	Absorban	Daya Antioksidan (%)	Rata-rata (%)
1	Kontrol	0,432		
2	Heksana 1	0,419	3,009	3,009
3	2	0,419	3,009	
4	Etil asetat 1	0,383	11,34	10,53
5	2	0,390	9,72	

Berdasarkan Tabel 6. diketahui bahwa fraksi heksana memiliki aktivitas antioksidan yang relatif lebih kecil dibandingkan fraksi etil asetat. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa yang memiliki daya antioksidan dalam fraksi etil asetat lebih banyak dibandingkan fraksi heksana.

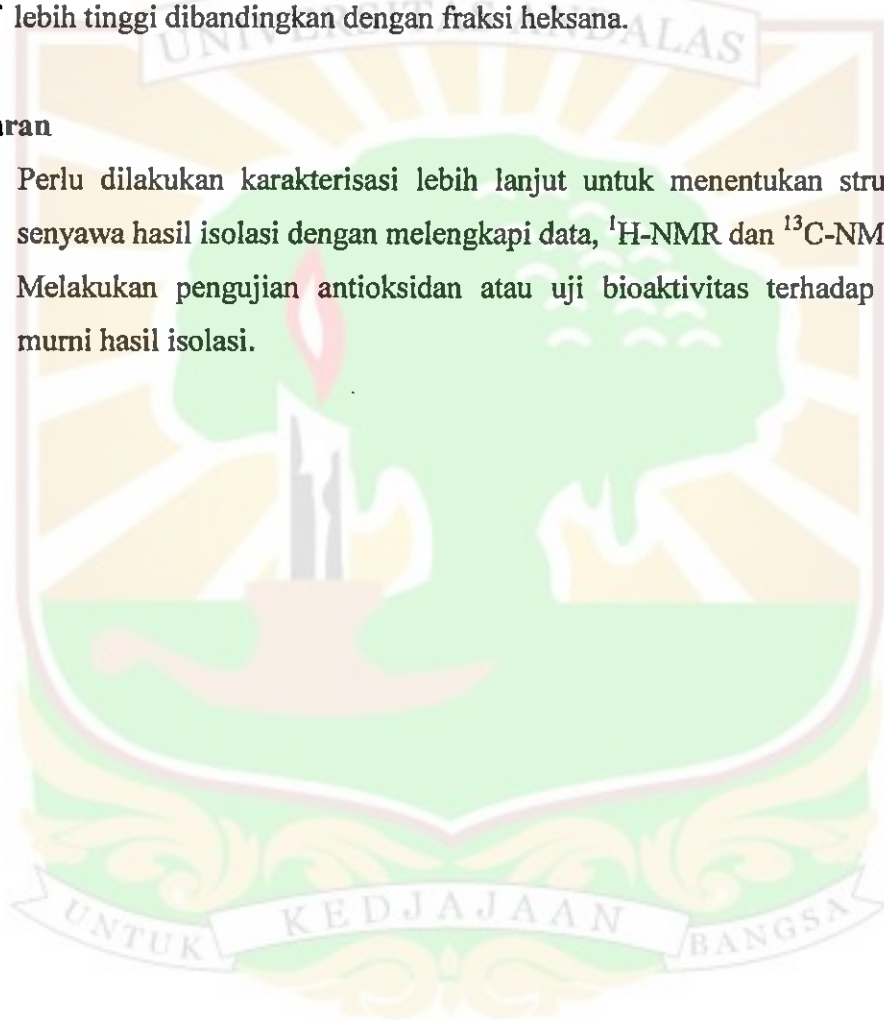
V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil uraian diatas maka hal yang dapat diambil sebagai kesimpulan yaitu senyawa hasil isolasi dari fraksi etil asetat ekstrak kulit batang duku (*Lansium domesticum Corr*) merupakan senyawa golongan hidroksi kumarin. Fraksi etil asetat dari ekstrak kulit batang duku menunjukkan aktivitas antioksidan yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi heksana.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan struktur dari senyawa hasil isolasi dengan melengkapi data, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.
2. Melakukan pengujian antioksidan atau uji bioaktivitas terhadap senyawa murni hasil isolasi.



DAFTAR PUSTAKA

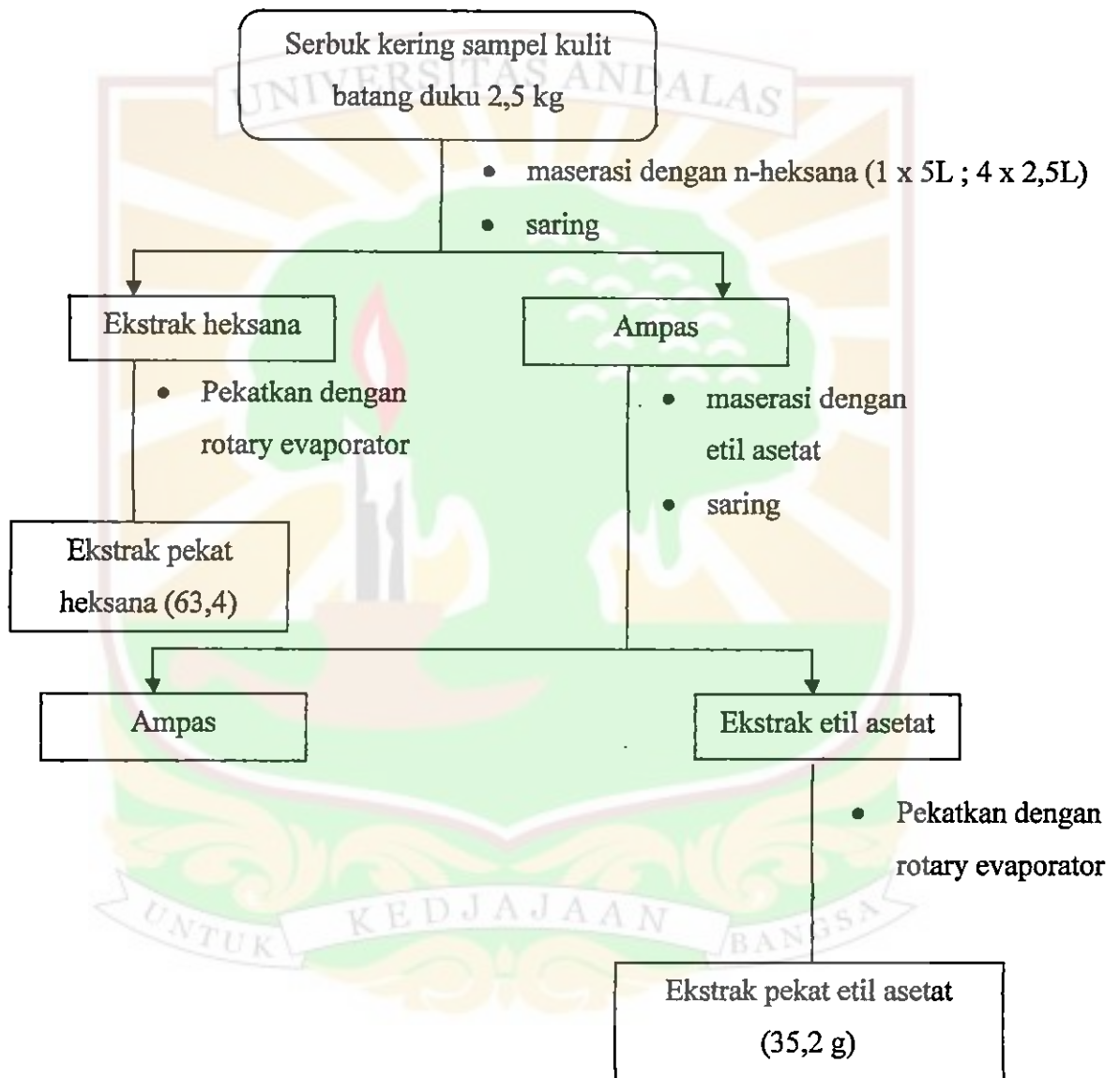
1. Santoni, Adlis. *Elusidasi Stkruktur Senyawa Metabolit Sekunder Kulit Batang Surian (Toona Sinensis) Meliaceae Dan Uji Aktivitas Insektisida*. Padang : Disertasi Pascasarjana Unand. (2009).
2. Mayanti T. *Kandungan Kimia dan Bioaktivitas tanaman Duku*. Unpad Press. 2009 ISBN 978-979-3985-37-4. Hal 1-2.
3. Verheij, E.W.M., dan R.E. Coronel. Edible fruits and nuts. *Lansium domesticum* Correa. *Plant Resources of South-East Asia*. No: 2. Prosea Bogor Indonesia. 1992.
4. Widyastuti, Y.E. dan Regina K. *Duku, Jenis dan Budaya*. Penebar Swadaya Jakarta. 2000.
5. Sunarti, S.. *Anatomi daun dan taksonomi duku, kokosan dan pisitan. Floribunda*. 1987 1(4): 13-16.
6. Yapp, D.T.T. and S.Y. Yap. *Lansium domesticum*:skin and leaf extracts of this fruit lifecycle of Plasmodium falciparum, and are active towards a chloroquine-resistant strain of theparasite (T9) in vitro. *Journal of* . 85:145-50. (2002)
7. Nishizawa, M., M. Emura., H. Yamada., M. Shiro.,Chairul, Y. Hayashi and H. Tozuda. Isolation of a new cycloartanoid triterpenes from leaves *Lansium domesticum*: novel skin-tumor promotion inhibitors. *Tetrahedron Letter*. 30 (41): 5615-18. (1989).
8. Mayanti, T. Antibacterial Terpenoid from The Bark of *Lansium domesticum* Corr cv. *Research artikel International Conference on Medicine and Medical Plants*. Surabaya. 2007
9. Shi-Hui Dong, Chuan-Rui Zhang, Lei Dong, Yan Wu and Jian-Min Yue. Onoceranoid-Type Triterpenoids from *Lansium domesticum*. Shanghai Institute. *Journal Natural Product*. 74 (2011).
10. Nishizawa, M., Y. Nademoto., S. Sastrapradja., M. Shiro and Y. Hayashi. Dukunolide D, E and F: new tetranortriterpenoids from the seeds of *Lansium domesticum*. *Phytochemistry. Pergamon Journal Ltd*. Great Britain. 27(1): 237-39. (1988).
11. Nishizawa, M., H. Nishide., S. Kosela and Y. Hayashi. Structures of lansiosides : biologically active new triterpene glycosides from *Lansium domesticum*. *Journal Organic Chemistry*. 48: 4462-66. (1983).

12. Murray, R.D.H. *The Natural Coumarin*. John Willey : New York. 1982.
13. Day, R. A dan Underwood, A. L. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Terjemahan Dr. Ir. Iis Sopyan, M. Eng. Penerbit Erlangga, Jakarta, 2001, 570-571.
14. Ibrahim, S. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Padang : Pasca Sarjana Universitas Andalas. 1998, 9-21.
15. Gritter, R. J., M. Boobit, and A. E. Schwarting, *Pengantar Kromatografi*, Penerbit ITB, Bandung, 1991.
16. Hostettmann, K., M. Hostettmann, dan A., Marston. *Cara Kromatografi Preparatif: Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam, Terjemahan Kosasih Padmawinata*. Bandung : ITB. 1997.
17. Silverstein, RM., G.C. Bessler and T.C. Moril. *Spektrometric Identification of Organic Compound (Penyidikan Spektroskopi Senyawa Organik)*, terjemahan A.J. Hartono dan Any Victor Purba, Penerbit Erlangga, Jakarta. 1989.
18. Noerdin, D. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik Dengan Cara Ultralembayung dan Inframerah*. Angkasa, Bandung. 1986.
19. Ilham Kuncahyo, Sunardi, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*, L.) terhadap 1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazil (DPPH), *Seminar Nasional Teknologi*, (2007).
20. Kholifatu Rosydah, Siska, Maria Dewi Astuti. Isolation of Antioxidant Compound from Binjai (*Mangifera caesia*). *Publikasi Prodi Kimia UNLAM*. 2005.
21. Chumaidah, Nur. Isolasi dan uji anti bakteri senyawa kumarin dari fraksi polar Mundu alas. *Seminar Nasional Kimia VIII*. 2006.

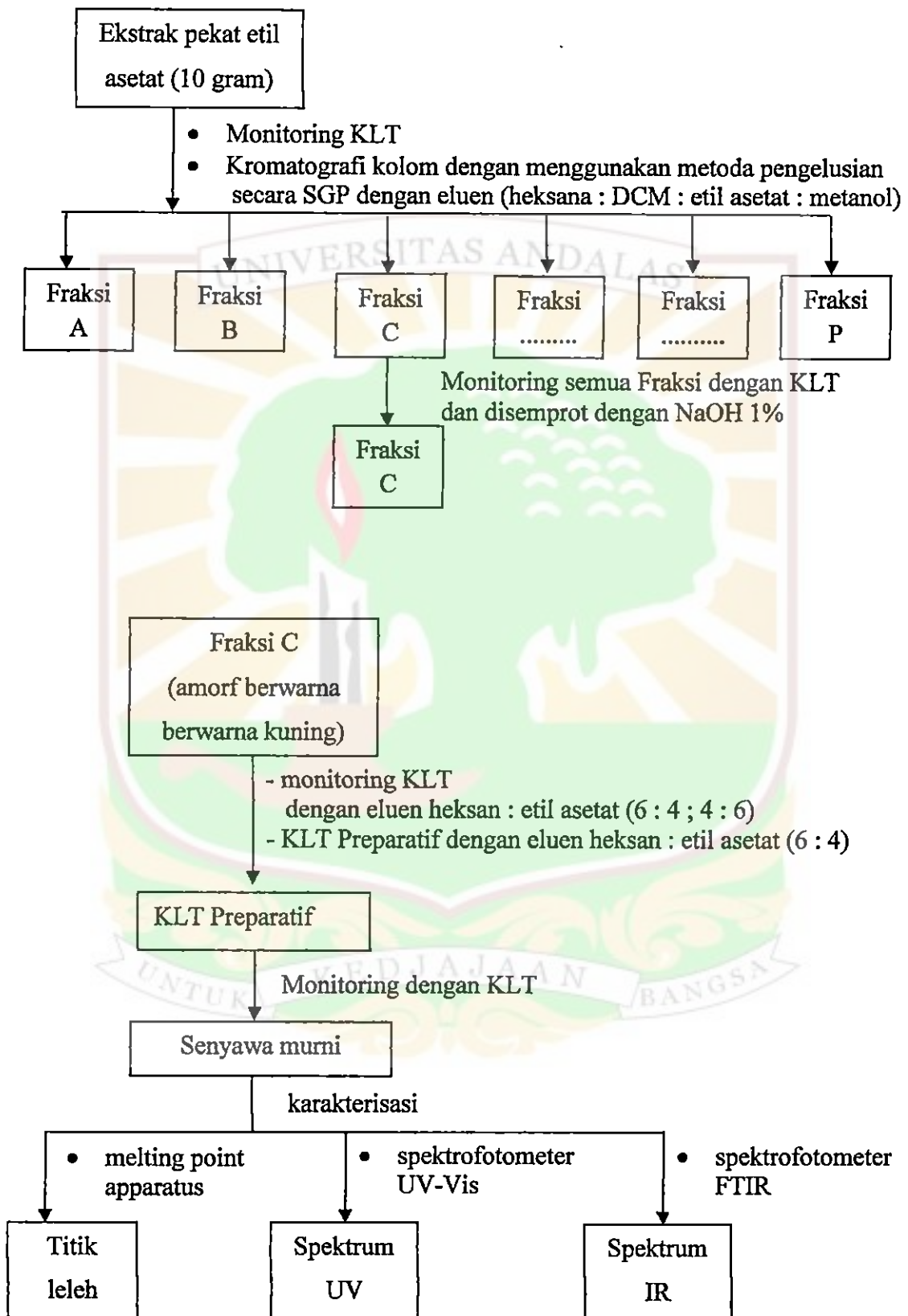
LAMPIRAN

Lampiran 1.

Skema kerja isolasi senyawa kumarin dari fraksi etil asetat ekstrak kulit batang duku

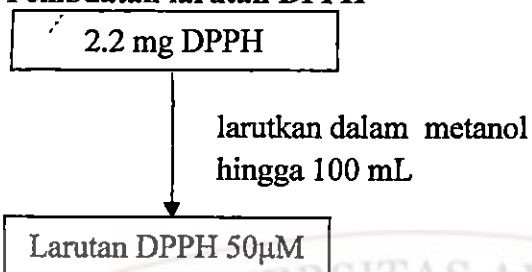


Lanjutan Lampiran 1

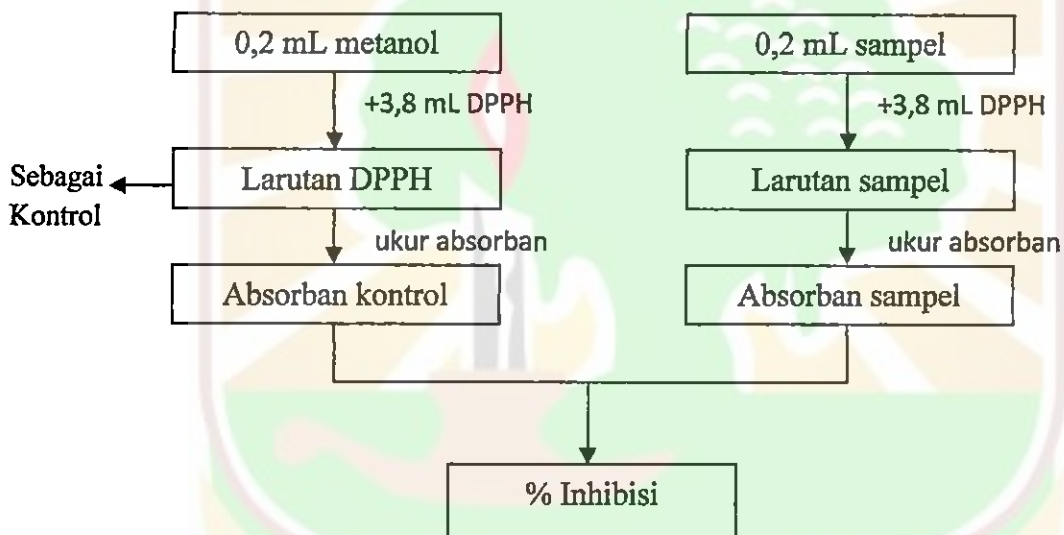


Lampiran 2. Skema Kerja Uji Antioksidan terhadap Ekstrak n-heksan dan etil asetat kulit batang duku

a. Pembuatan larutan DPPH



b. Pengujian antioksidan



Lampiran 3. Perhitungan Persen inhibisi aktivitas antioksidan fraksi heksana dan fraksi etil asetat ekstrak kulit batang Duku

Rumus :

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{\text{A Kontrol} - \text{A Sampel}}{\text{A Kontrol}} \times 100\%$$

a. konsentrasi ekstrak heksana 0,1%

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{0,432 - 0,419}{0,432} \times 100\% = 3,009\%$$

b. konsentrasi ekstrak heksana 0,1%

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{0,432 - 0,419}{0,432} \times 100\% = 3,009\%$$

c. konsentrasi ekstrak etil asetat 0,1%

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{0,432 - 0,383}{0,432} \times 100\% = 11,34\%$$

d. konsentrasi ekstrak etil asetat 0,1%

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{0,432 - 0,390}{0,432} \times 100\% = 9,72\%$$

e. Rata-rata daya Antioksidan ekstrak heksana

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{3,009\% + 3,009\%}{2} = 3,009\%$$

f. Rata-rata daya Antioksidan ekstrak Etil Asetat

$$\text{Daya Antioksidan} = \frac{11,34\% + 9,72\%}{2} = 10,53\%$$