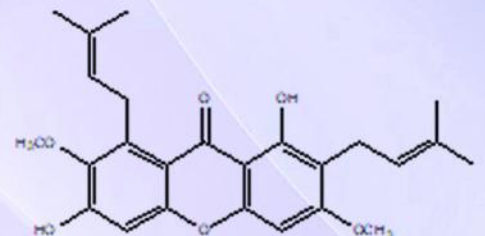
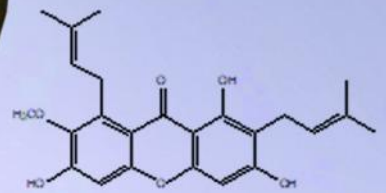
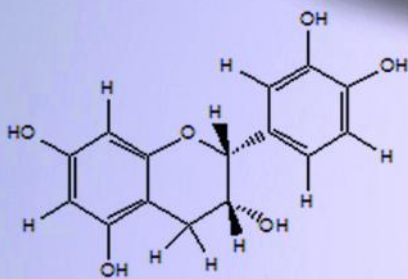
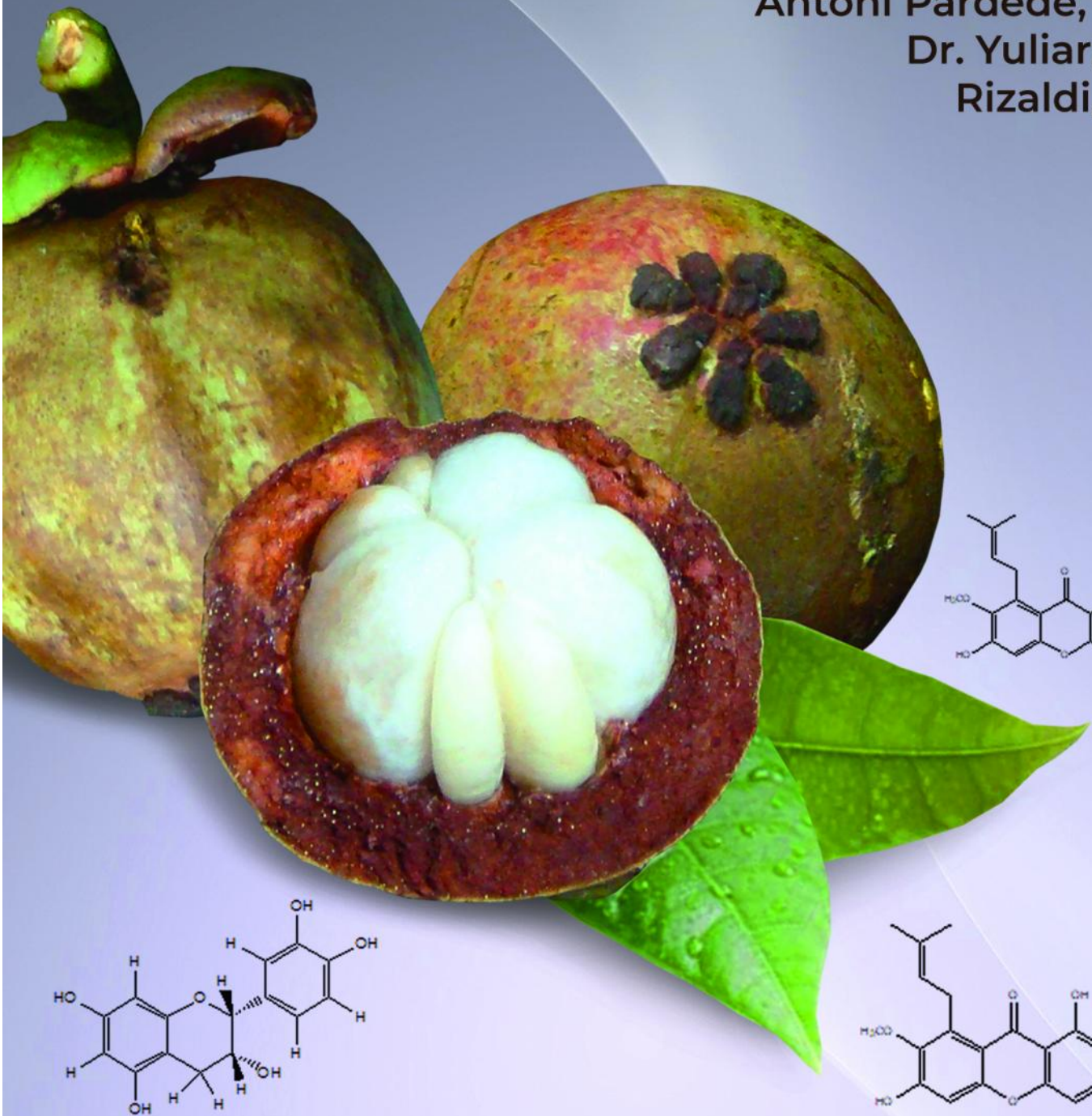


Kimia Bahan Alam

Garcinia Cymosa

Taksonomi, Fitokimia,
Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Antoni Pardede, Ph.D
Dr. Yuliar, M.Si
Rizaldi, M.Si



Kimia Bahan Alam

Garcinia cymosa:

Taksonomi, Fitokimia, Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi

Penulis:

Antoni Pardede, Ph.D

Dr. Yuliar, M.Si

Rizaldi, M.Si

Editor:

Okviyoandra Akhyar, S.Si., M.Si

Penyunting:

Rr. Ariessanty Alicia Kusuma Wardhani, M.Si

Desain Sampul dan Tata Letak :

Abdurrahman Sidik, M.Ds

Penerbit:

Universitas Islam Kalimantan Muhammad Arsyad Al-Banjari Banjarmasin

Redaksi:

Jl. Adhyaksa No.2 Kayutangi

Banjarmasin 70123

Cetakan Pertama 2019

Hak Cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari Penerbit

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan berkah, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan buku ini yang berjudul ***“Kimia Bahan Alam, Garcinia cymosa: taksonomi, fitokimia, ekstraksi, fraksinasi dan isolasi”***

Penulis berharap Buku ini dapat menjadi rujukan bagi akademisi dan peneliti tentang kimia bahan alam, khususnya proses skrining fitokimia, ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan. Di buku ini tumbuhan yang digunakan yaitu *Garcinia cymosa*.

Dalam penyusunan buku ini penulis tidak terlepas dari bantuan dan keterlibatan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, sudah sepantasnya penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada semua pihak yang terlibat.

Banjarmasin, 2019

Penulis

DEWAN REDAKSI	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
BAB I. Taksonomi	1
2.1. Taksonomi <i>Garcinia cymosa</i>	1
2.2. Morfologi <i>Garcinia cymosa</i> secara umum	1
2.3. Keberagaman Buah	3
BAB II. Tinjauan kimia senyawa metabolit sekunder genus <i>Garcinia</i>	4
BAB III. Spektroskopi	14
3.1. Spektroskopi Ultraviolet-Visibel	14
3.2. Spektroskopi Inframerah	15
3.3. Spektroskopi NMR Proton ($^1\text{H-NMR}$)	18
3.4. Spektroskopi NMR Karbon ($^{13}\text{C-NMR}$)	20
3.5. Spektroskopi DEPT	21
3.6. Spektroskopi HMQC	21
3.7. Spektroskopi COSY	22
3.8. Spektroskopi HMBC	22
3.9. Gas kromatografi - Spektroskopi Massa	23
BAB IV. Fitokimia	25
4.1. Bahan tumbuhan	25
4.2. Bahan Kimia	25
4.3. Peralatan Penelitian	25
4.4. Identifikasi profil fitokimia	26
4.4.1. Pengujian Alkaloid	26
4.4.2. Pengujian Flavonoid	26
4.4.3. Pengujian triterpenoid, steroid, saponin dan fenolik	27
4.4.4. Pengujian triterpenoid dan steroid	27
4.4.5. Pengujian fenolik	28
4.4.6. Pengujian saponin	28
4.4.7. Pengujian kumarin	28
BAB V. Ekstraksi	30
5.1. Ekstraksi Kulit batang <i>Garcinia cymosa</i>	30
BAB VI. Fraksinasi	31
6.1. Fraksinasi ekstrak metanol kulit batang <i>Garcinia cymosa</i>	31
BAB VII. Isolasi	34
7.1. Pemisahan dan pemurnian fraksi heksan	34
7.2. Pemisahan dan pemurnian fraksi diklorometan	37
7.3. Pemisahan dan pemurnian fraksi etil asetat	39

BAB VIII. Elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder dari <i>G. cymosa</i>	41
8.1. Elusidasi struktur senyawa dari fraksi heksan	41
8.1.1. Spektroskopi UV-Vis	43
8.1.2. Spektroskopi Inframerah	46
8.1.3. Spektroskopi Massa	47
8.1.4. Spektroskopi ^{13}C -NMR	49
8.1.5. Spektroskopi DEPT	50
8.1.6. Spektroskopi ^1H -NMR	51
8.1.7. Spektroskopi HMQC	53
8.1.8. Spektroskopi ^1H -H COSY	55
8.1.9. Spektroskopi HMBC	56
8.2. Elusidasi struktur senyawa dari fraksi diklorometan	61
8.2.1. Spektroskopi UV-Vis dan inframerah	62
8.2.2. Spektroskopi Massa	67
8.2.3. Spektroskopi ^{13}C -NMR	69
8.2.5. Spektroskopi ^1H -NMR	71
8.2.6. Spektroskopi HMQC	72
8.2.7. Spektroskopi ^1H -H COSY	74
8.2.8. Spektroskopi HMBC	77
8.3. Elusidasi struktur senyawa dari fraksi etil asetat	82
8.3.1. Spektroskopi Inframerah	84
8.3.2. Spektroskopi Massa	85
8.3.3. Spektroskopi ^{13}C -NMR	87
8.3.4. Spektroskopi DEPT	90
8.3.5. Spektroskopi ^1H -NMR	92
8.3.6. Spektroskopi HMQC	96
8.3.7. Spektroskopi ^1H -H COSY	98
8.3.8. Spektroskopi HMBC	101
BAB IX. Senyawa metabolit sekunder dari <i>Garcinia cymosa</i>	105
DAFTAR PUSTAKA	106
Biografi Singkat penulis	110

I. Taksonomi

1.1 Taksonomi *Garcinia cymosa*

Taksonomi adalah salah satu bagian dari ilmu tumbuh-tumbuhan yang mempelajari lebih dalam tentang silsilah keluarga tanaman secara pasti dan teliti, agar jangan sampai terjadi kekeliruan dengan tanaman lainnya sebab keluarga *Clusiaceae* ini terdiri dari beberapa genus dan spesies. Dari hasil identifikasi tumbuhan di Herbarium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, dalam tata nama atau sistematika (taksonomi) tumbuhan ini diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub division	: Angiospermae
Ordo	: Magnoliopsida
Kelas	: Dicotyledonae
Famili	: Clusiaceae
Genus	: <i>Garcinia</i>
Spesies	: <i>Garcinia cymosa</i>

1.2 Morfologi *Garcinia cymosa*

Pohon *Garcinia cymosa* tegak, dengan puncak berbentuk piramida, tinggi pohon sekitar 15 – 25 meter, berwarna coklat gelap atau hampir gelap,

kulitnya berlapis, kulit dalamnya mengandung getah berwarna kuning seperti karet dan terasa pahit. Pohon dapat tumbuh pada daerah ketinggian 500-600 meter di atas permukaan laut, pH tanah ideal yaitu 5-7, temperatur udara 22-32 °C. Pohon hijau sepanjang tahun, opposit, daun berbentuk oval atau elips, keras dan tebal, daun muda berwarna kemerahan dan berubah menjadi warna hijau tua, sedikit mengkilap, berwarna sedikit kekuningan, dan panjang daun berkisar 9-25 centimeter, dengan lebar 4-5 centimeter. Buah berbentuk bola agak lonjong dan bersegi, Biji 1-3, diselimuti oleh selaput biji yang tebal berair, putih, dapat dimakan termasuk biji yang gagal tumbuh sempurna (Dinas Pertanian, 2010), bentuk batang, daun, dan buah dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Batang, daun, dan buah *Garcinia cymosa*

1.3 Keberagaman Buah

Keragaman karakter buah suatu jenis tanaman pada tempat tumbuh yang berbeda dapat terjadi. Dua penyebab utama yang menimbulkan keragaman karakter buah adalah keragaman lingkungan dimana pohon tumbuh dan berkembang serta keragaman susunan genetik yang berbeda diantara pohon. Keragaman lingkungan adalah keragaman yang terjadi

akibat adanya perbedaan faktor lingkungan dimana pohon tersebut tumbuh. Faktor lingkungan meliputi ketinggian tempat di atas permukaan

laut, iklim, kesuburan tanah, persaingan antar pohon dan sebagainya. Sedangkan keragaman genetik adalah keragaman yang disebabkan oleh perbedaan genetik yang diturunkan dari tetua kepada keturunannya.

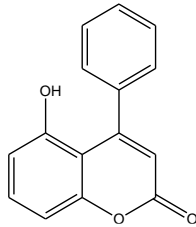
Penampilan tanaman yang dapat diukur dan dilihat merupakan hasil interaksi antara susunan genetik dan lingkungan. Tidak semua jenis tanaman setelah berbunga akan menjadi buah yang baik dengan sendirinya, kondisi lingkungan seperti curah hujan, suhu, dan angin merupakan faktor yang dapat mempengaruhi buah. Cahaya merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang penting bagi tumbuhan berdaun hijau. Cahaya dapat merangsang daun untuk menerima stimulus pembungaan (Mansyah, 2007).

II. Tinjauan kimia senyawa metabolit sekunder genus *Garcinia*

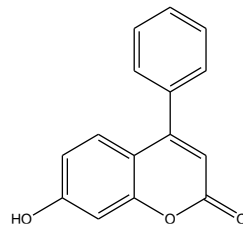
Penelitian untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dari Genus *Garcinia* telah dipaorkan oleh Hartati dan Ersam (2006), mengisolasi senyawa kumarin dari kulit batang Mundu Alas (*Garcinia balica* Miq). Hasilnya pada fraksi nonpolar ekstrak etilasetat didapatkan dua senyawa kumarin yaitu 5-hidroksi-4-fenilkumarin dan 7-hidroksi-4-fenilkumarin.

Chumaidah dan Ersam (2006), juga mendapatkan senyawa kumarin pada fraksi polar ekstrak etil aasetat, senyawa kumarin yang telah diisolasi yaitu 8-(1 hidroksi-1-etilenil)-4-fenil-8,9-dihidro-5,9-dihidroksifurobenzopiran 2-on dan 8-(1,2,3-trihidroksi-3-butenil)-4-fenil-5,7-dihidroksi benzopiran-2-on.

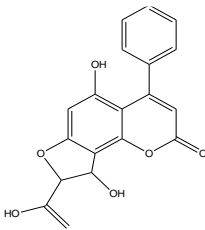
Mudjirahmini dan Ersam (2006), juga mendapatkan kembali satu senyawa kumarin baru turunan 4-fenilkumarin dari fraksi yang sama yaitu fraksi polar ekstrak etilasetat yaitu 5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4-fenilkumarin. Struktur senyawa hasil isolasi dari Genus *Garcinia* dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.



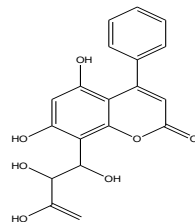
5-hidroksi-4-fenilkumarin



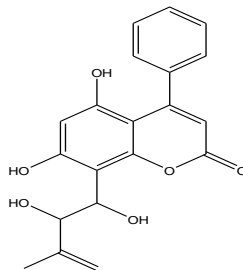
7-hidroksi-4-fenilkumarin



8-(1 hidroksi-1-etilenil)-4-fenil-8,9-dihidro-5,9-dihidroksifuro-benzopiran 2-on



8-(1,2,3-trihidroksi-3-butenil)-4-fenil-5,7-dihidroksi benzopiran-2-on

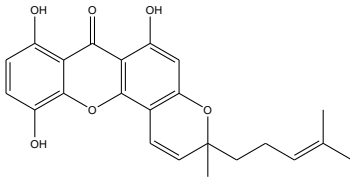


5,7-dihidroksi-8-(1,2-dihidroksi-3-metilbutenil-3)-4-fenilkumarin

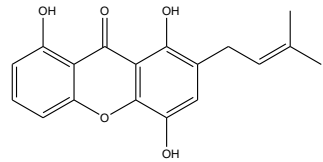
Gambar 2. Struktur senyawa hasil isolasi dari Genus *Garcinia*

Lannang (2005) mendapatkan dua senyawa santon dari ekstrak kloroform kulit batang *Garcinia polyantha* Oliv. yaitu 1,5,8-trihidroksi-6'-metil-6'-(4-metilpent-3-enil)-pirano[2',3':3,4] santon dan 1,4,8-trihidroksi-2-prenilsanton. Sukamat (2006) mendapatkan dua senyawa santon dari fraksi etil asetat kayu batang *Garcinia dulcis* yaitu 1,3,4,5,8-pentahidroksisanton dan 1,4,5,8-tetrahidroksisanton. Ainiyah (2006) juga mendapatkan tiga senyawa santon dari fraksi etil asetat kulit batang *Garcinia dulcis* (Roxb) Kurz yaitu 1,3,4,5,8-pentahidroksisanton, 1,5,8-trihidroksi-6,6-dimetilpirano (2,3:6,7)-6",6"-dimetilpirano (2",3":2,3) santon dan 1,8-dihidroksi-6,6-dimetilpirano (2,3:6,7)-6",6"-dimetilpirano (2",3":3,4) santon. Purwaningsih (2007) mendapatkan dua senyawa santon dari fraksi etil asetat kayu batang *Garcinia tetrandra* Pierre yaitu 1,3,4,5,8-pentahidroksisanton dan 1,3,6,7-tetrahidroksisanton. Hartati (2008) juga mengisolasi senyawa santon dari kulit batang *Garcinia tetrandra* Pierre. Dari ekstrak n-heksana didapatkan kudrasanton dan tawaitesisanton, sedangkan fraksi diklorometana didapatkan tawaitesisanton dan tetrandrasanton (1,3-dihidroksi, 2',2'-dimetil pirano (5',6',5,6) santon. ^aMuharni (2009) melaporkan satu senyawa santon dari fraksi metanol kulit batang *Garcinia bancana* Miq yaitu 1,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2,7-di-(3-metilbutenil) santon. Ee (2009) mendapatkan tiga senyawa santon dari fraksi kloroform kulit batang *Garcinia parvifolia* yaitu 6-deoksijacareubin, daphnifolin dan rubrasanton. Indarti (2009)

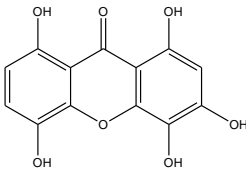
mendapatkan senyawa santon dari kulit kayu batang *Garcinia xanthochymus* (Asam Kandis) yaitu 1,4,6-trihidroksi-5-metoksi-7-prenilsanton. ^bMuharni (2009) mendapatkan senyawa santon dari ekstrak etil asetat kulit batang *Garcinia nigrolineata* yaitu 1,7-dihidroksi-3-metoksi-4-(3-metilbut-2-enil), 6',6'-dimetilpiran (2',3':5,6) santon. Chen (2010) mendapatkan 6 senyawa santon dari kulit batang *Garcinia xanthochymus* yaitu 1,5,6-trihidroksi-7-(3-metil-2-butenil)-8-(3-hidroksi-3-metilbutil) furan (2',3':3,4) santon; 1,5,6-trihidroksi-7-(3-metil-2-butenil)-8-(3-hidroksi-3-metilbutil)-6', 6'-dimetilpiran (2',3':3,4) santon; 1,5,6-trihidroksi-7-(3-metil-2-butenil)-8-(3-hidroksi-3-metilbutil)-5'-(1-hidroksi-1-metiletil)-4',5' dihidrofuran (2',3':3,4) santon; 1, 2, 5, 4'-tetrahidroksi-4-(1,1-dimetilallil)-5'-(2-hidroksipropan-2-il)-4', 5'-dihidrofuran-(2', 3':6,7) santon; 1, 3, 5, 6-tetrahidroksi-7-geranilsanton; 1, 4-dihidroksi-6', 6'-dimetilpiran (2',3':5,6) santon. Elfita (2011) mendapatkan empat senyawa santon dari kulit batang *Garcinia griffithii* T. Anders yaitu 1,7-dihidroksisanton; 1,6,7-trihidroksisanton; 1,6-dihidroksi-3-metoksi-4,7-di-(3-metilbut-2-enil) santon dan 1,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2,7-di-(3-metilbut-2-enil) santon. Struktur senyawa santon hasil isolasi dari kulit batang genus *Garcinia* dapat dilihat pada gambar 3.



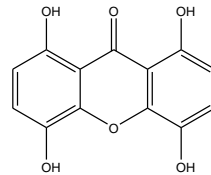
[1,5,8-trihidroksi-6'-metil-6'-(4-metilpent-3-enil)-pirano[2',3':3,4] santon



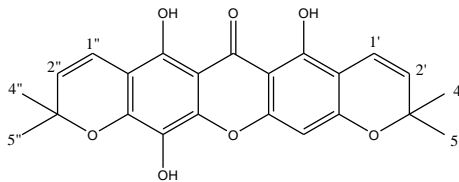
(1,4,8-trihidroksi-2-prenil santon)



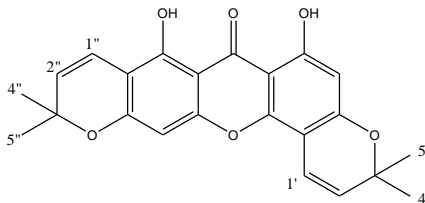
1,3,4,5,8-pentahidroksi santon



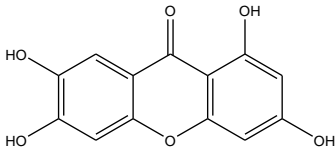
1,4,5,8-tetrahidroksi santon



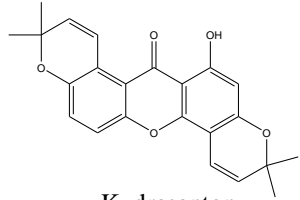
1,5,8-trihidroksi-6,6-dimetilpirano
(2,3:6,7)-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':2,3) santon



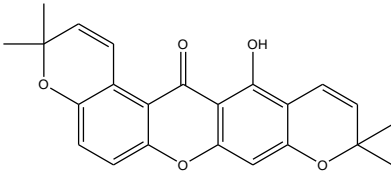
1,8-dihidroksi-6,6-dimetilpirano(2,3:6,7)-
6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3,4) santon



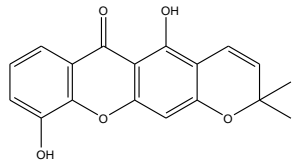
1,3,6,7-tetrahidroksisanton



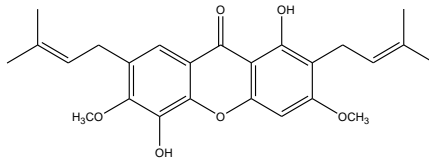
Kudrasanton



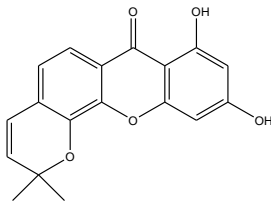
Tawaitesi santon



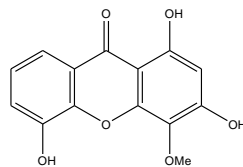
Tetrاندrasanton



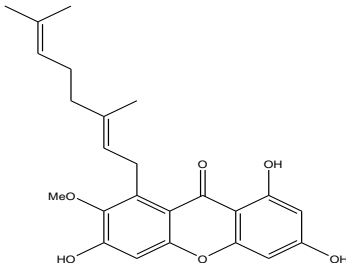
1,5-dihidroksi-3,6-dimetoksi-2,7-di-(3-metilbutenil) santon



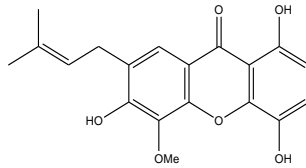
6-deoksijacareubin



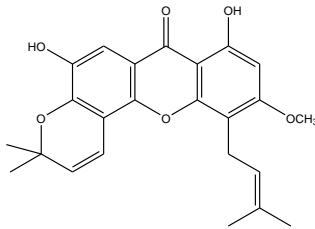
Daphnifolin



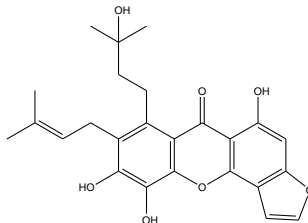
Rubrasanton



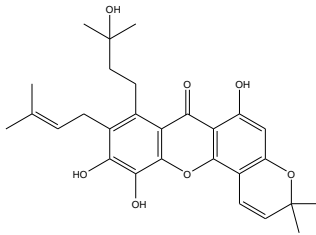
1,4,6-trihidroksi-5-metoks
Prenil santon



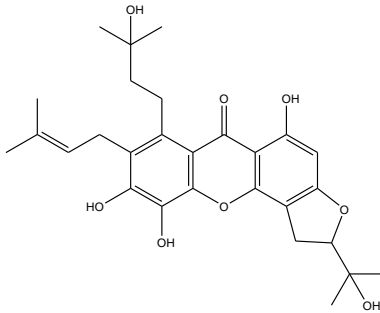
1,7-dihidroksi-3-metoksi-4-(3metilbut-2-enil),6',6'-
dimetilpirano(2',3':5,6) santon



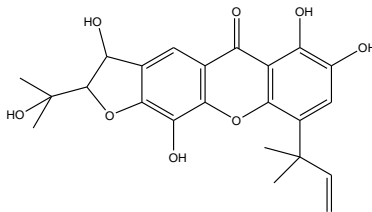
1,5,6-trihidroksi-7-(3-metil-2-butenil)-8-(3-hidroksi-3-metilbutil)-
metilbutil)-6',6'-furan (2',3':3,4) dimetilpiran (2',3':3,4) santon



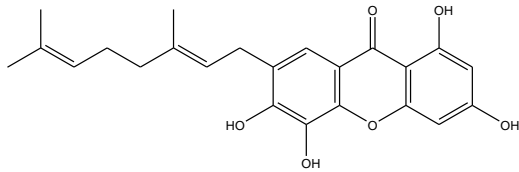
1,5,6-trihidroksi-7-(3-metil-2-butenil)-8-3-hidroksi-3-santon



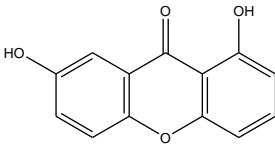
1,5,6-trihidroksi-7-(3- metil-2-butenil)-8-(3-hidroksi-3-metilbutil)-5'-(1 hidroksi-1-metiletil)-4',5'-dihidrofuran(2',3':3,4) santon



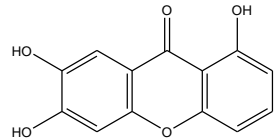
1, 2, 5, 4'-tetrahidroksi-4-(1,1- dimetilallil)-5'-(2-hidroksipropan-2-il)-4', 5'- dihidrofuran-(2', 3' : 6, 7) santon



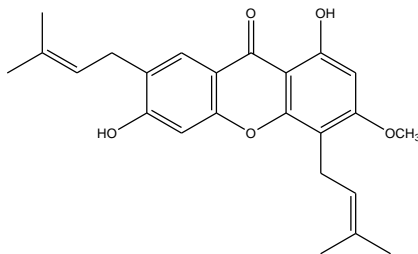
1, 3, 5, 6-tetrahidroksi-7-geranil santon



1,7-dihidroksisanton



1,6,7-trihidroksisanton



1,6-dihidroksi-3-metoksi-4,7-di-(3-metilbut-2-enil) santon

Gambar 3. Struktur senyawa santon hasil isolasi dari kulit batang *Garcinia*

III. Spektroskopi

3.1 Spektroskopi Ultraviolet-Visible

Pemakaian spektroskopi UV-Vis dalam penentuan struktur molekul senyawa organik prinsipnya berdasarkan kepada transisi elektron dari orbital yang memiliki tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi. Elektron-elektron dalam molekul pada keadaan biasa berada pada tingkat energi dasar. Adanya energi yang berasal dari energi elektromagnetik dapat berinteraksi dengan molekul organik, akibatnya elektron yang berada pada keadaan dasar dapat berpindah ke orbital yang lebih tinggi elektronnya (terekstisasi).

Pada sistem yang terkonjugasi orbital π dan masing-masing ikatan rangkap berinteraksi membentuk suatu perangkat baru orbital ikatan dan anti ikatan. Bila sistem terkonjugasi ini bertambah panjang, energi yang diberikan untuk transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ makin kecil absorpsi akan terjadi pada panjang gelombang yang lebih panjang. Kenyataan juga menunjukkan bahwa dalam larutan polar akan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang yang lebih panjang pada pelarut nonpolar yang disebut efek bathokromik (Pavia, 2009).

Senyawa kumarin dengan spektroskopi UV-Vis dapat memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 274 nm dan 311 nm. Serapan

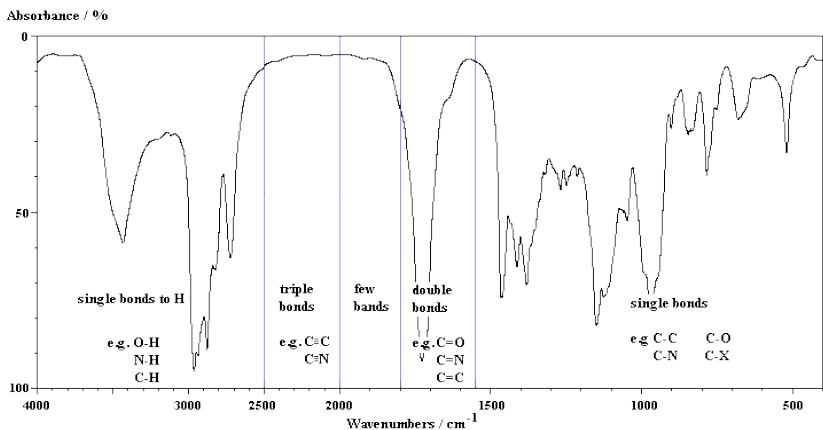
ini menunjukkan adanya cincin benzen dan cincin piron. Senyawa linier furanokumarin (psoralen) memberikan serapan maksimum sekitar 205–255 nm, 240–255 nm, 260–270 nm dan 298–316 nm. Angular furanokumarin (angelicin) memberikan serapan pada 242 – 245 nm dan 260 – 270 nm (Rashamuse, 2008).

3.2 Spektroskopi Inframerah

Analisis spektroskopi IR didasarkan pada absorpsi radiasi elektromagnetik suatu zat pada daerah panjang gelombang 2 - 15 mikron atau bilangan gelombang 4000 - 650 cm^{-1} . Molekul yang menyerab radiasi elektromagnetik pada daerah ini akan mengalami vibrasi ulur (*stretching vibration*) dan vibrasi tekuk (*bending vibration*). Untuk keperluan elusidasi struktur maka daerah dengan bilangan gelombang 1400 – 4000 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. Selanjutnya untuk mengetahui daerah-daerah vibrasi dari masing-masing ikatan yang dimiliki oleh senyawa organik pada spektrum inframerah dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Daerah vibrasi pada spektrum Inframerah

Untuk mengetahui gugus fungsi yang ada dalam senyawa organik dapat dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektroskopi IR. Tidak seperti spektroskopi UV-Vis, pada spektroskopi IR energi yang diberikan oleh sinar inframerah tidak cukup untuk mengeksitasi elektron dari suatu orbital ke orbital lain. Bila sinar inframerah melewati suatu cuplikan senyawa

organik, maka sejumlah frekuensi akan diserap, sedang sisanya diteruskan. Sesuai dengan besar energi inframerah, ia hanya mampu mengadakan perubahan vibrasi dalam molekul. Karena terjadi vibrasi pada hampir seluruh senyawa organik yang menghasilkan spektrum absorpsi yang kompleks dan karakteristik maka tidak akan ada dua senyawa organik yang mempunyai spektrum IR yang sama kecuali dua senyawa itu merupakan isomer optik. Berdasarkan sifat inilah, penggunaan spektroskopi IR ini dapat merupakan cara yang paling sederhana untuk mengidentifikasi senyawa organik.

Sebagian dari gugus fungsi yang diidentifikasi tidak berhubungan dengan cincin kumarin, spektroskopi IR digunakan dalam menampakkan fungsi lakton terkonyugasi. Kumarin berisomer dengan kromon, tetapi keduanya mempunyai spektrum IR yang berbeda. Frekwensi rentang karbonil dalam kumarin (α -piron) menyerap dalam daerah $1700 - 1750 \text{ cm}^{-1}$ sedangkan kromon (σ -piron) ditemukan pada daerah sekitar 1650 cm^{-1} .

- Frekuensi rentang C-H

Dua atau tiga pita dengan intensitas lemah sampai medium teramati pada daerah $3025 - 3175 \text{ cm}^{-1}$ dalam spektrum kumarin. Penyerapan ini disebabkan adanya vibrasi regangan C-H dari α -piron, benzena dan cincin furan.

- Frekuensi rentang C=O

Rentang karbonil α -piron dari kumarin biasanya ditemukan pada daerah $1700\text{ cm}^{-1} - 1750\text{ cm}^{-1}$. Harga yang pasti bergantung pada kondisi yang digunakan, frekuensi yang lebih tinggi $1742\text{ cm}^{-1} - 1748\text{ cm}^{-1}$ dalam karbon tetra klorida.

- Frekuensi rangkap C=C

Umumnya terdapat tiga puncak serapan kuat dalam daerah $1600\text{ cm}^{-1} - 1660\text{ cm}^{-1}$ untuk spektra inframerah kumarin. Pola ini dengan mudah dapat dibedakan dari kromon, yang biasanya penyerapannya lebih sederhana (Rashamuse, 2008).

3.3 Spektroskopi NMR proton ($^1\text{H-NMR}$)

Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ cukup banyak digunakan oleh kimiawan organik. Spektroskopi ini didasarkan pada kenyataan bahwa setiap kelompok proton (H) dalam molekul organik akan beresonansi pada frekuensi yang tidak identik atau beresonansi pada frekuensi spesifik. Hal ini disebabkan kelompok proton suatu molekul organik dikelilingi elektron yang berbeda (lingkungan elektroniknya berbeda). Makin besar kerapatan elektron yang mengelilingi inti maka makin besar pula medan magnet yang digunakan. Karena setiap atom H (proton) suatu molekul organik mempunyai

lingkungan elektronik (kimia) yang berbeda maka akan menyebabkan frekuensi resonansi yang berbeda.

Pergeseran kimia, dilambangkan dengan δ , menyatakan seberapa jauh (satuan ppm) proton tersebut digeser dari proton standar Tetrametilsilana (TMS) ($\delta = 0$ ppm), terhadap frekuensi spektrometer yang digunakan. Pada skala δ maka untuk TMS didefinisikan sebagai (0,0 ppm) dengan skala (0-14) ppm. Beberapa spektroskopi menggunakan skala τ (tau) yang besarnya adalah (14-0) ppm. Pada spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, maka skala δ dan τ dicatat dari kiri ke kanan pada kertas spektrum. Secara sederhana lokasi pergeseran kimia suatu proton terletak di daerah



a = daerah proton COOH atau ikatan hidrogen

b = daerah CHO proton

c = daerah proton aromatik

d = daerah proton sp^2 (olefenik)

e = daerah proton metoksi

f = daerah proton sp dan karbon terikat amina

g = daerah proton terikat sebelah karbonil

h = daerah proton sp^3

(Connolly & Hill dalam santoni, 2009).

3.4 Spektroskopi NMR Karbon (^{13}C -NMR)

Spektroskopi karbon-13 atau ^{13}C memberikan gambaran karbon-karbon dalam sebuah molekul organik. Spektre karbon-13 tidak digunakan meluas seperti spektra proton. Dalam spektroskopi proton yang dilibatkan adalah isotop yang lazim dan alamiah dari hidrogen, 99,985% atom hidrogen adalah ^1H . Tetapi karbon-13 hanya 1,1% dari atom karbon yang terdapat di alam, karena 98,9% atom karbon adalah ^{12}C , suatu nukleotida yang tidak punya spin. Transisi inti ^{13}C dari keadaan paralel ke antiparalel hanyalah transisi berenergi rendah.

Karena kelimpahannya di alam hanya 1,1% maka sensitifitas ^{13}C -NMR jauh lebih kecil dari ^1H yang mempunyai kelimpahan 99,98% di alam. Pergeseran kimia ^{13}C antara 0 sampai dengan 230 ppm yang terbagi atas sp^3 antara 0 – 60, alkohol 60 – 80 ppm, sp antara 70 – 80 ppm, sp^2 antara 100 – 160 ppm, gugus karbonil dari gugus karboksilat, ester, lakton, amida, anhidrida, antara 160-180 ppm sedangkan aldehid antara 180 – 200 ppm dan keton antara 190 – 230 ppm. Bentuk sinyal dari gugus metil (CH_3) berbentuk quartet, metilen (CH_2) berbentuk triplet, metin berbentuk doublet sedangkan karbon kuartener berbentuk singlet (Connolly & Hill dalam Santoni, 2009).

3.5 Spektroskopi Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT)

Percobaan DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) dapat membedakan signal karbon metil, metilen, metin dan karbon kuarterner. Karbon metil dan metin menunjuk ke atas, karbon metilen ke bawah dan karbon quarterner hilang.

Spektroskopi NMR DEPT memiliki 3 sub-spektrum yang berbeda: 45 MHz, 90 MHz dan 135 MHz. Pada DEPT-45 akan menunjukkan seluruh puncak atom karbon yang mengemban proton (hidrogen). Pada DEPT-90, puncak yang ditunjukkan hanya untuk atom karbon gugus metin (CH). Sementara pada DEPT-135 karbon metin dan metil memberikan puncak ke atas (positive peaks), sedangkan karbon metilen puncaknya mengarah ke bawah (Pavia, 2009).

3.6 Spektroskopi ^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC)

HMQC merupakan salah satu jenis H-NMR dua dimensi yang digunakan untuk membantu dalam penentuan struktur suatu senyawa. Melalui data HMQC ini dapat diketahui proton-karbon dengan jarak satu ikatan, sehingga secara tidak langsung dapat mengetahui karbon yang mengikat proton dan karbon yang tidak mengikat proton. Selain itu, juga

untuk menentukan nilai geseran kimia karbon yang memiliki proton (Mitchell, 2007).

3.7 Spektroskopi ^1H - ^1H Homonuclear Correlated Spectroscopy (COSY)

Spektrum H-H COSY adalah satu dari beberapa jenis spektroskopi NMR dua dimensi. Percobaan pertama untuk NMR dua dimensi diusulkan oleh Jean Jenner, seorang professor di Université Libre de Bruxelles pada tahun 1971. Spektrum H-H COSY dapat memberikan korelasi H dengan H tetangga melalui kontur yang muncul pada spektrum. Dari spektrum ini dapat diketahui proton-proton yang berdekatan pada suatu senyawa. Spektroskopi H-H COSY adalah metode yang paling mudah pada 2D NMR (Supratman, 2010).

3.8 Spektroskopi ^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC)

HMBC merupakan salah satu jenis NMR dua dimensi yang digunakan untuk pembuktian struktur molekul (struktur dua dimensi) senyawa. Melalui data HMBC ini dapat diketahui proton-karbon dengan jarak dua atau tiga ikatan sehingga secara tidak langsung dapat digunakan untuk mengetahui karbon-karbon tetangga yang memiliki jarak dua sampai tiga ikatan dengan suatu proton tertentu (Mitchell, 2007).

3.9 Gas Chromatography - Massa Spectroscopy (GC-MS)

Kromatografi gas menggunakan fasa stasioner berupa cairan dan fasa gerak berupa gas. Berbagai gas telah digunakan dalam kromatografi gas, misalnya hidrogen, helium, nitrogen, argon, karbon dioksida, dan bahkan uap air. Gas yang lebih ringan, hidrogen dan helium memungkinkan lebih banyak difusi longitudinal zat terlarut, yang cenderung menurunkan efisiensi kolom, terutama pada laju alir yang rendah. Jadi nitrogen bisa menjadi pilihan gas pembawa yang lebih baik untuk melakukan pemisahan yang sangat sulit. Disamping itu, nitrogen ini lebih murah daripada helium dan lebih aman didalam laboratorium dibandingkan hidrogen.

Adapun GC-MS adalah metode yang mengkombinasikan kromatografi gas dan spektrometri massa untuk mengidentifikasi senyawa yang berbeda dalam analisis sampel. GC-MS adalah terdiri dari dua blok komponen utama: kromatografi gas dan spektrometer massa . Kromatografi gas menggunakan kolom kapiler yang tergantung pada dimensi kolom itu (panjang, diameter, ketebalan film) serta sifat fase Perbedaan sifat kimia antara molekul-molekul yang berbeda dalam suatu campuran dipisahkan dari molekul dengan melewati sampel sepanjang kolom. Molekul-molekul memerlukan jumlah waktu yang berbeda untuk keluar dari kromatografi gas, dan ini memungkinkan spektrometer massa untuk menangkap, ionisasi,

mempercepat, membelokkan, dan mendeteksi molekul terionisasi secara terpisah.

Spektrometer massa melakukan hal ini dengan memecah masing-masing molekul menjadi terionisasi mendeteksi fragmen menggunakan massa untuk mengisi rasio. Kedua komponen, yang digunakan bersama-sama, memungkinkan tingkat lebih baik dari identifikasi substansi dari pada unit yang digunakan secara terpisah. Dalam Instrumen ini tidak memungkinkan untuk membuat identifikasi akurat dari molekul tertentu dengan kromatografi gas atau spektrometri massa sendirian. Proses spektrometri massa murni biasanya membutuhkan sampel yang sangat murni sementara kromatografi gas menggunakan detektor tradisional mendeteksi beberapa molekul yang terjadi untuk mengambil jumlah waktu yang sama untuk melakukan perjalanan melalui kolom yang hasil dalam dua atau lebih molekul untuk bersama-elute. Kadang-kadang dua molekul yang berbeda juga dapat memiliki pola yang sama fragmen terionisasi dalam spektrometer massa. Menggabungkan dua proses membuatnya sangat tidak mungkin bahwa dua molekul yang berbeda akan berperilaku dengan cara yang sama di kedua kromatografi gas dan spektrometer massa (Sitorus, 2009).

IV. Fitokimia

4.1 Bahan tumbuhan

Tumbuhan *Garcinia cymosa* diperoleh di Kebun Raya Bukit Sari Tebo Propinsi Jambi, Bagian tumbuhan yang diambil sebagai sampel adalah kulit batang sebanyak 2 kg kering.

4.2 Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini yaitu pelarut teknis yang didestilasi (metanol, diklorometana, etil asetat, dan n-heksana), natrium hidroksida 10%, akuades, natrium klorida, silika gel 60 (0,0063 – 0,200 mm, merck KGaA Darmstadt Germany).

4.3 Peralatan penelitian

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas yang umum dipakai pada penelitian kimia bahan alam, seperangkat alat destilasi pelarut, rotari evaporator Heidolp WB 2000, oven, plat KLT (silika gel 60 F₂₅₄, merck KGaA Darmstadt Germany), aluminium foil, kromatografi kolom, pipa kapiler, melting point apparatus (fisher Jhon), Spektrofotometer UV-Vis 1700 series, spektrofotometer IR Parkin Elmer 1600 Series, GC-MS QP 2010 plus Shimadzu, Lampu UV untuk pengungkap noda model UV GL – 58 UV

254 dan 365 nm, spektrofotometer JEOL 400 MHz JNM-ECS400 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ dan 2D-NMR (DEPT, HMBC, HMQC, dan COSY).

4.4. Identifikasi Profil Fitokimia

4.4.1. Pengujian alkaloid

Pemeriksaan alkaloid digunakan metoda Culvenor-Fizgerald dimana sampel kulit batang tumbuhan *Garcinia cymosa* sebanyak 5 gram dirajang dan digerus dalam lumpang porselen. Tambahkan 10 mL larutan kloroform amoniak 0,05 M, diaduk kemudian disaring. Ke dalam tabung reaksi tambahkan 1 mL asam sulfat 2 N, kocok selama 2 menit, biarkan terbentuk dua lapisan, ambil lapisan asam tambahkan pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya kabut sampai endapan putih.

4.4.2. Pengujian flavonoid

Pemeriksaan flavonoid digunakan metoda Sianidin test, sebanyak 5 gr sampel kulit batang *Garcinia cymosa* yang sudah dihaluskan ditambah 25 mL metanol, kemudian dididihkan dan disaring selagi panas, tambahkan aquades dan petroleum eter dikocok dan didiamkan. Ambil lapisan metanol dan uapkan, setelah kering residu dilarutkan dengan etilasetat dan disaring. Filtratnya diuapkan dan sisanya dilarutkan dalam etanol, kemudian

tambahkan asam klorida pekat dan beberapa butir bubuk magnesium, terbentuknya warna orange sampai merah menunjukkan adanya flavonoid (kecuali untuk flavon).

4.4.3. Pengujian triterpenoid, steroid, saponin, dan fenolik

Metoda yang digunakan untuk pemeriksaan ini adalah metoda Simess yang telah dimodifikasi. Sampel kulit batang *Garcinia cymosa* sebanyak 5 gr ditambahkan 25 mL metanol dan panaskan selama 15 menit, disaring selagi panas, filtrat diuapkan sampai kering di atas penangas air. Ekstrak kering ditambahkan kloroform dan air masing-masing sebanyak 5-10 mL, kocok, diamkan, terbentuk dua lapisan dan pisahkan. Lapisan kloroform digunakan untuk pengujian steroid dan terpenoid serta lapisan air digunakan untuk pengujian fenolik dan saponin.

4.4.4. Pengujian triterpenoid dan steroid

Pemeriksaan steroid dan terpenoid dilakukan dengan pereaksi Liebermann–Burchard. Pemeriksaan dilakukan dengan cara mengambil lapisan kloroform tambahkan norit dan disaring, hasil saringan ditampung pada plat tetes, dibiarkan kering. Kemudian tambahkan satu-dua tetes asam anhidrida asetat, diaduk dan tambahkan satu tetes asam sulfat pekat.

Terbentuknya warna biru menandakan adanya steroid dan timbulnya warna merah atau merah ungu menandakan adanya triterpenoid.

4.4.5. Pengujian Fenolik

Pemeriksaan fenolik dilakukan dengan peraksi FeCl_3 . Pemeriksaan dilakukan dengan cara diambil lapisan air, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil dan tambahkan pereaksi FeCl_3 , terbentuknya warna biru/ungu menandakan adanya kandungan senyawa fenolik.

4.4.6. Pengujian Saponin

Pemeriksaan dilakukan dengan cara mengambil lapisan air masukkan ke dalam tabung reaksi dan kocok kuat-kuat, biarkan 15 menit dan terbentuknya busa yang tidak hilang dengan penambahan beberapa tetes HCl pekat menunjukkan adanya saponin.

4.4.7. Pengujian Kumarin

Kulit batang *Garcinia cymosa* sebanyak 3 gr dihaluskan dan diekstrak dengan pelarut metanol. Hasil ekstrak ditotolkan pada batas bawah plat KLT dengan kapiler, dibiarkan kering pada udara terbuka. Kemudian dielusi dalam bejana yang berisi 10 ml eluen etilasetat. Noda yang dihasilkan

dimonitor dengan lampu UV panjang gelombang 365 nm dan terlihat fluoresensi, kemudian noda pada KLT tersebut disemprot dengan NaOH 10% dalam metanol dimonitor kembali dengan lampu UV maka terlihat fluoresensi yang semakin terang menunjukkan adanya kumarin.

V. Ekstraksi

5.1. Ekstraksi Kulit Batang *Garcinia cymosa*

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metoda maserasi, sebanyak 2 Kg serbuk kering kulit batang *Garcinia cymosa* direndam dalam maserator dengan metanol diaduk dan dibiarkan selama 5 hari pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dan ditampung. Ekstrak metanol hasil maserasi dikumpulkan, kemudian diuapkan pelarutnya dengan rotari evaporator Heidolp WB 2000 seperti terlihat pada Gambar 5 hingga diperoleh ekstrak kental metanol.



Gambar 5. Penguapan pelarut dari ekstrak metanol

VI. Fraksinasi

6.1. Fraksinasi ekstrak metanol kulit batang *Garcinia cymosa*

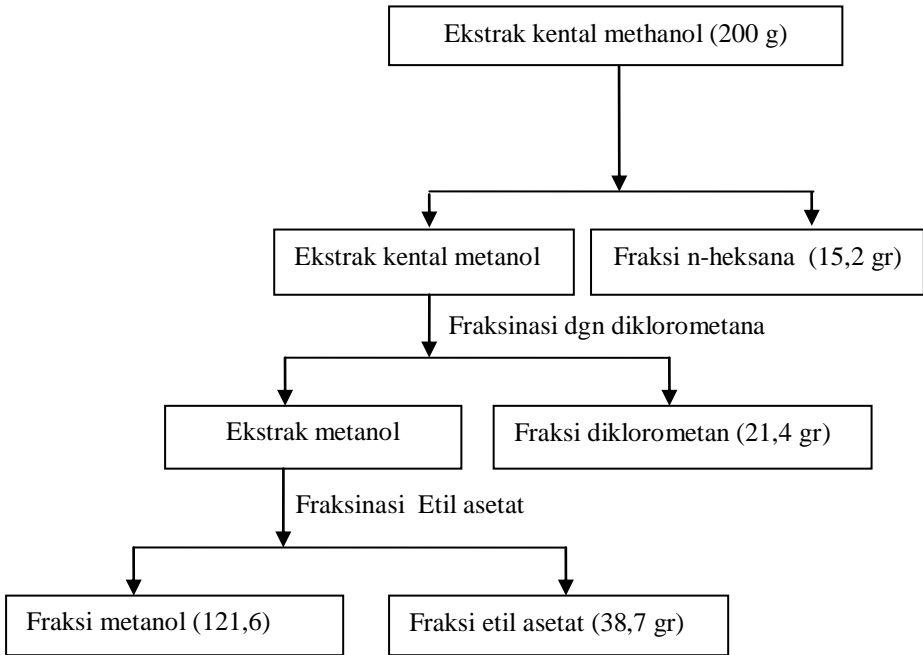
Untuk memisahkan senyawa yang diinginkan dari senyawa-senyawa nonpolar, maka ekstrak kental metanol ditambahkan akuades, dimasukkan ke dalam corong pisah difraksinasi dengan pelarut n-heksana, kocok hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan atas yang merupakan fraksi n-heksana dan lapisan bawah yang merupakan fraksi metanol/berair dan dipisahkan. Fraksi n-heksana selanjutnya diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat fraksi n-heksana.

Fraksi metanol/berair yang sudah difraksinasi dengan n-heksana, dilanjutkan fraksinasinya dengan pelarut diklorometana, kocok hingga terbentuk dua lapisan lapisan atas yang merupakan fraksi metanol/berair dan lapisan bawah merupakan fraksi diklorometana seperti terlihat pada Gambar 6, dan dipisahkan. Fraksi diklorometana selanjutnya diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat fraksi diklorometana.



Gambar 6. Proses Fraksinasi dengan diklorometana

Pada tahap selanjutnya fraksi metanol/berair difraksinasi kembali dengan etil asetat, fraksi etilasetat berada pada lapisan bagian atas dan fraksi metanol/berair berada pada bagian bawah. Selanjutnya fraksi etil asetat diuapkan pelarutnya dan diperoleh ekstrak fraksi etil asetat. Fraksi n-heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol/berair kembali diuji kandungan kumarinnya. Bagan kerja fraksinasi tersebut ditunjukkan pada Gambar 7.



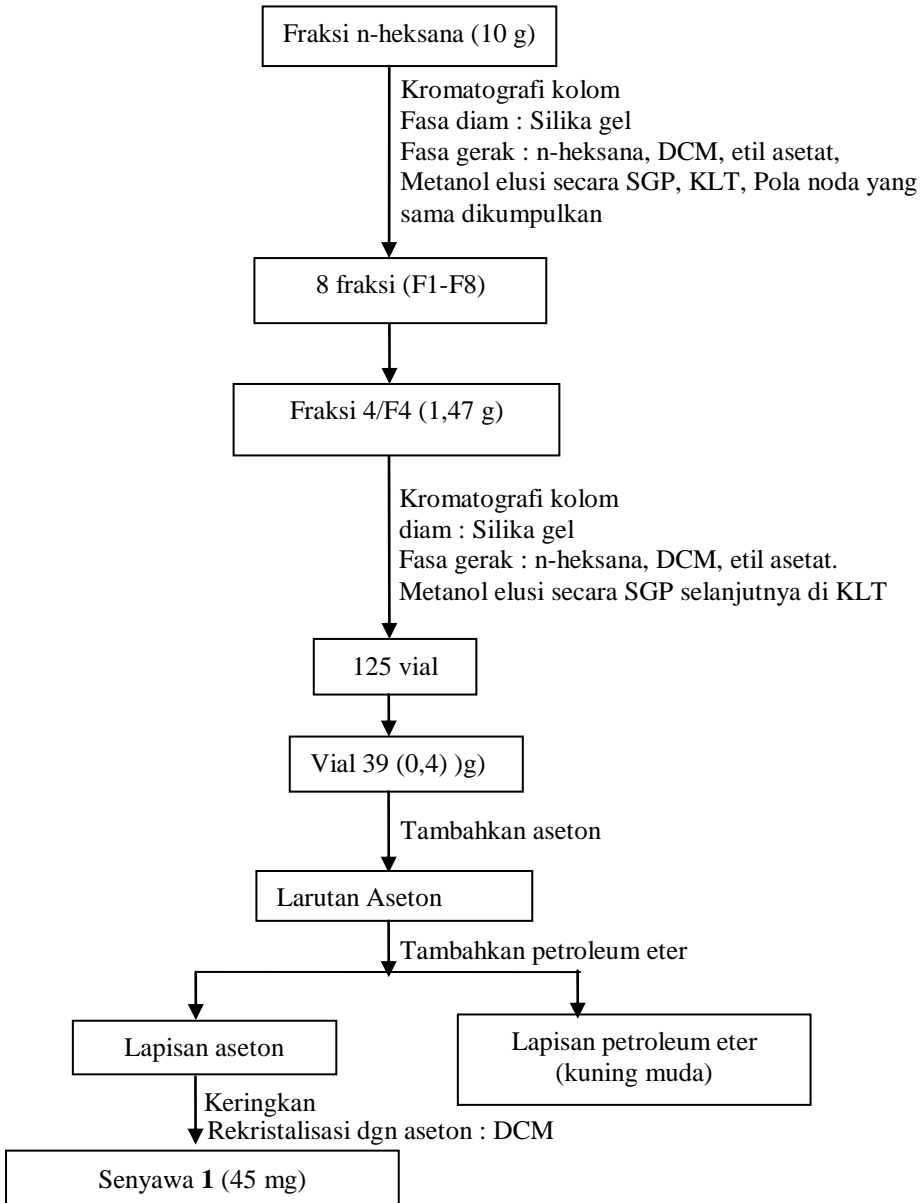
Gambar 7. Fraksinasi ekstrak metanol

VII. Isolasi

7.1 Pemisahan dan Pemurnian Fraksi heksan

Fraksi n-heksana sebanyak 10 gram dimurnikan dengan cara kromatografi kolom. Ekstrak dipreadsopsi, selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom yang sudah terdapat silika gel sebagai adsorben. Kemudian dilakukan pengelusian yang dilakukan secara bergradient dimulai dari pelarut yang bersifat non polar terus ditingkatkan ke pelarut polar. Eluen yang digunakan adalah n-heksan, diklorometana, etil asetat, dan metanol yang dibuat perbandingan n-heksan 100% sampai metanol 100 % yang masing-masing volumenya 200 mL. Eluat ditampung dalam botol vial 20 mL dan didapatkan sebanyak 356 vial. Selanjutnya dilakukan analisis KLT dengan menggunakan penampak noda lampu UV. Eluat dengan pola noda yang sama digabungkan menjadi satu fraksi, sehingga didapatkan 8 fraksi yaitu F1-F8. Fraksi 4 (F4) sebanyak 1,47 gram dikromatografi kolom ulang dengan menggunakan adsorben silika gel dan eluen n-heksana, diklorometana, etil asetat, dan metanol. Pengelusian dilakukan dengan sistem kenaikan kepolaran yang dimulai n-heksana-diklorometana (5 : 5) sampai etil asetat : metanol (4 : 6) yang masing-masing volumenya 100 mL. Eluat ditampung dalam botol vial 20 mL dan didapatkan jumlah eluat 125 vial. Selanjutnya pada vial 39 sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam aseton, kemudian ke dalam aseton

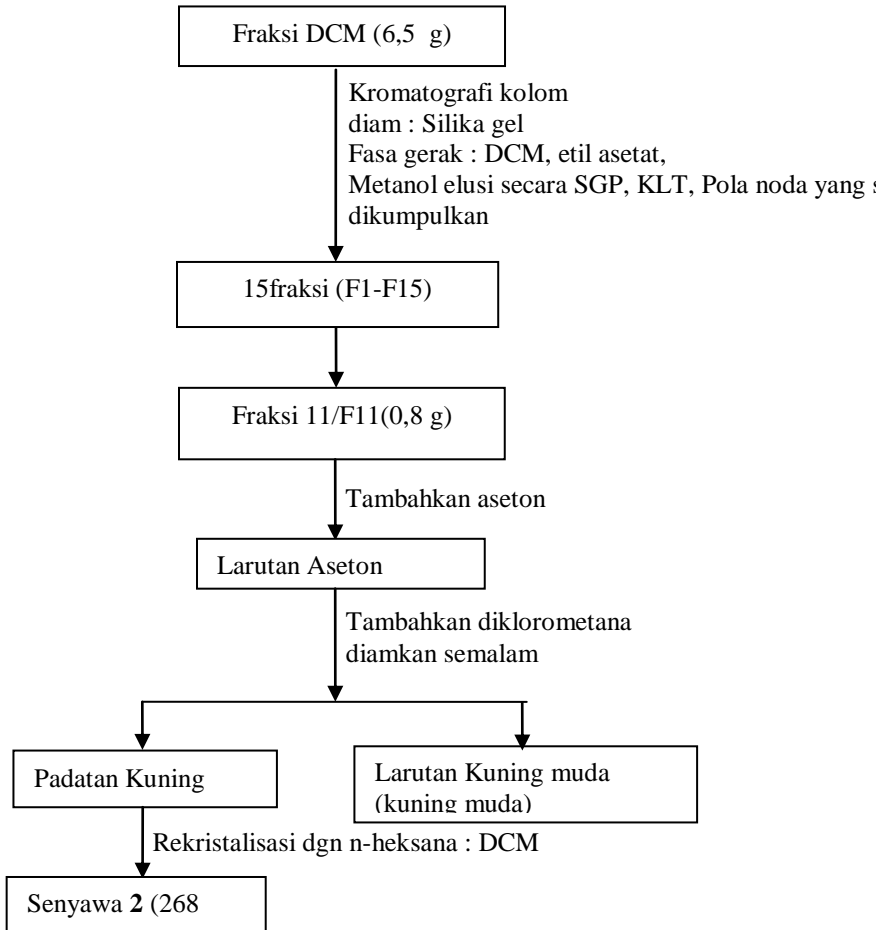
ditambahkan petroleum eter sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan aseton dipisahkan dan diuapkan sehingga didapatkan padatan berwarna kuning. Padatan tersebut dilakukan rekristalisasi dengan menggunakan 2 pelarut yaitu aseton dan diklorometana sehingga didapatkan padatan berwarna kuning sebanyak 45 mg (**1**). Senyawa hasil isolasi yang diperoleh dikarakterisasi dengan pengukuran titik leleh. Kemudian dilakukan penentuan struktur molekul berdasarkan data spektroskopi yang meliputi spektrum UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 90, 135 MHz, HMQC, HMBC, COSY serta HR-TOF-MS dengan membandingkan dari data spektrum senyawa yang telah diketahui dan dilaporkan dari literatur. Skema pemurnian fraksi n-heksana tertera pada Gambar 8 di bawah ini.



Gambar 8. Skema pemurnian dan elusidasi struktur dari fraksi *n*-heksana

7.2 Pemisahan dan pemurnian fraksi diklorometana

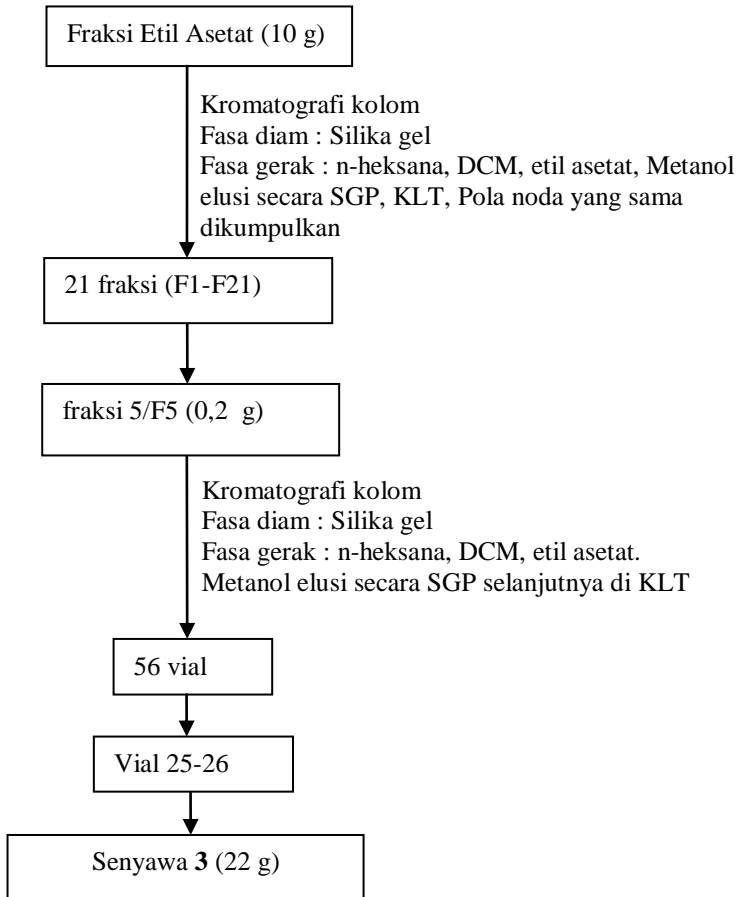
Terhadap fraksi diklorometana diambil sebanyak 6,5 gram dilakukan kromatografi kolom dengan menggunakan adsorben silika gel dan eluen diklorometana, etil asetat dan metanol. Pengelusian dilakukan dimulai dari perbandingan diklorometana : Etil asetat (9:1) hingga metanol 100%. Selanjutnya dilakukan analisis KLT dengan menggunakan penampak noda lampu UV. Eluat dengan pola noda yang sama digabungkan menjadi satu fraksi, sehingga didapatkan 15 fraksi yaitu F1-F15. Fraksi 11 (F11), diambil sebanyak 0,8 gram dilarutkan dalam aseton. Kemudian larutan aseton ditambahkan diklorometana dan didiamkan semalam. Endapan yang terbentuk direkristalisasi dengan menggunakan pelarut diklorometana dan n-heksana dan didapatkan padatan berwarna kuning sebanyak 268 mg (2). Senyawa hasil isolasi yang diperoleh dikarakterisasi dengan pengukuran titik leleh. Kemudian dilakukan penentuan struktur molekul berdasarkan data-data spektroskopi yang meliputi spektrum UV, IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT 90, 135 MHz, HMQC, HMBC, COSY serta HR-TOF-MS dengan membandingkan dengan spektrum hasil senyawa yang telah diketahui dari literatur. Skema pemurnian fraksi diklorometana tertera pada Gambar 9 di bawah ini.



Gambar 9. Skema pemurnian dan elusidasi struktur fraksi diklorometana

7.3 Pemisahan dan pemurnian fraksi etil asetat

Fraksi etil asetat sebanyak 10 gram dilakukan kromatografi kolom dengan menggunakan silika gel sebagai adsorben. Pengelusian dilakukan dengan sistem kenaikan kepolaran yang dimulai dari perbandingan n-heksana - diklorometana (4:6) sampai metanol 100%. Selanjutnya dilakukan analisis KLT dengan menggunakan penampak noda lampu UV. Eluat dengan pola noda yang sama digabungkan menjadi satu fraksi, sehingga didapatkan 21 fraksi yaitu F1-F21. Fraksi 5 (F5) sebanyak 0,2 gram dikromatografi kolom ulang dengan menggunakan silika gel sebagai adsorben dan diklorometana, etil asetat dan metanol sebagai eluen. Pengelusian dimulai dari n-heksana - diklorometana (5 : 5) sampai metanol dengan volume 50 mL. Eluat ditampung dalam vial 20 mL dan didapatkan 56 vial. Selanjutnya dilakukan analisis KLT dengan menggunakan penampak noda lampu UV. Vial 25-26 menunjukkan noda tunggal dikumpulkan dan didapatkan padatan warna putih sebanyak 22 mg (3). Selanjutnya dilakukan elusidasi struktur dengan spektroskopi IR, NMR dan MS. Skema pemurnian fraksi etil asetat dapat dilihat pada Gambar 10 di bawah ini.



Gambar 10. Skema pemurnian dan elusidasi struktur dari fraksi etil asetat

VIII. Elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder dari kulit batang *Garcinia cymosa*

8.1 Elusidasi struktur senyawa dari fraksi heksana

Hasil pemurnian 10 gram fraksi *n*-heksana dengan metoda kromatografi kolom dan pengelusan dilakukan secara bergradien menggunakan pelarut *n*-heksana, diklorometana, etil asetat dan metanol diperoleh 8 Fraksi. Fraksi 4 dilakukan kromatografi kolom ulang dengan eluen *n*-heksana-diklorometana (5 : 5) sampai etil asetat : metanol (4 : 6) didapatkan 125 vial. Vial 39 kemudian dimurnikan dengan rekristalisasi dengan pelarut aseton, petroleum eter dan dikloro metana dihasilkan padatan kuning muda sebanyak 45 mg (**1**).

Pengujian kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis dengan berbagai variasi komposisi eluen memperlihatkan noda tunggal, disamping itu juga dilakukan secara berulang pada setiap komposisi. Nilai R_f senyawa hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen terhadap senyawa **1** hasil isolasi ditunjukkan pada Tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Nilai Rf senyawa **1** hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen

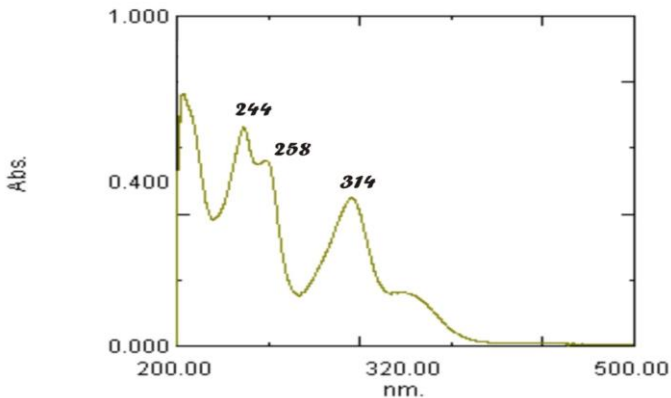
No	Eluen	Rf
1	n-heksana : diklorometana (8 : 2)	0,03
2	n-heksana : diklorometana (6 : 4)	0,23
3	n-heksana : diklorometana (4 : 6)	0,68
4	n-heksana : diklorometana (2 : 8)	0,82
5	n-heksana : etil asetat (8 : 2)	0,61
6	n-heksana : etil asetat (6 : 4)	0,91

Berdasarkan percobaan diatas, dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi relatif murni selanjutnya senyawa **1** hasil isolasi terlebih dahulu dilakukan identifikasi dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 . Hasil identifikasi menunjukkan warna biru-keunguan. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa **1** hasil isolasi adalah senyawa golongan fenolik. Pengukuran titik leleh terhadap senyawa hasil isolasi yang memberikan nilai 193 -194°C, dengan jarak titik leleh yang kecil dari 2°C dan didukung oleh hasil analisis kromatografi lapisan tipis menunjukkan bahwa senyawa **1** hasil isolasi relatif murni dan selanjutnya dilakukan analisis spektroskopi. Selanjutnya penentuan struktur senyawa **1** hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri Ultraviolet (UV), Infrared (IR), Massa (MS), *Nuclear Magnetic Resonance* (^{13}C -NMR dan ^1H -NMR), *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC) dan ^1H - ^1H *Homonuclear*

Correlated Spectroscopy (COSY) serta ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (HMBC).

8.1.1 Spektroskopi UV-Vis

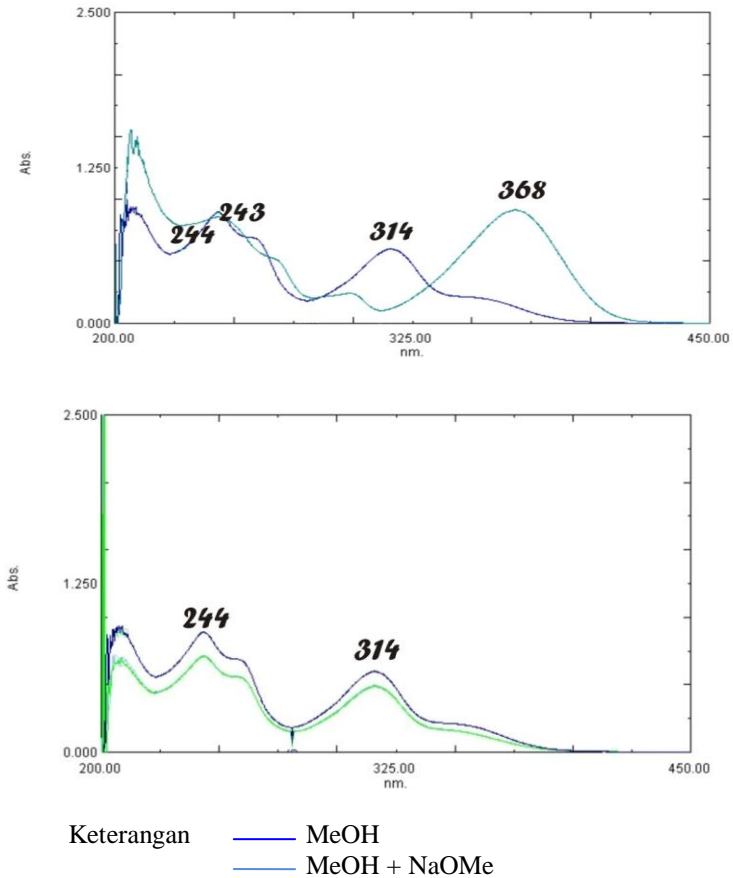
Pengukuran spektrofotometri ultraviolet dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV 1700 series) dengan pelarut metanol. Penggunaan metanol sebagai pelarut dikarenakan senyawa golongan alkohol yang akan menyerap $\lambda < 185$ nm sehingga tidak mengganggu interpretasi spektrum pada daerah ultraviolet. Spektrum UV senyawa **1** hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 10 di bawah ini.



Gambar 10. Spektrum ultraviolet senyawa **1**

Hasil pengukuran spektroskopi ultraviolet pada senyawa **1** hasil isolasi memberikan λ_{maks} 314 , 258 dan 244 nm. Interpretasi spektrum ultraviolet pada λ_{maks} 244 dan 258 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari orbital $\pi \rightarrow \pi^*$ (C=C-C=C) serta λ_{maks} 314 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari orbital $n \rightarrow \pi^*$. Pengukuran spektrum ultraviolet ini mengindikasikan bahwa senyawa **1** hasil isolasi mempunyai kerangka atau karakteristik senyawa santon.

Untuk melengkapi data spektrum UV, maka terhadap senyawa **1** hasil isolasi dilakukan pengukuran dengan menggunakan pereaksi geser. Penambahan pereaksi geser bertujuan untuk mengetahui pola oksigenasi dari senyawa hasil isolasi. Penambahan pereaksi geser NaOMe memberikan pergeseran λ_{maks} 368 ; 314 ; 244 dan 243 nm. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 11 sebagai berikut:



Gambar 11. Spektrum UV senyawa **1** dengan penambahan NaOMe

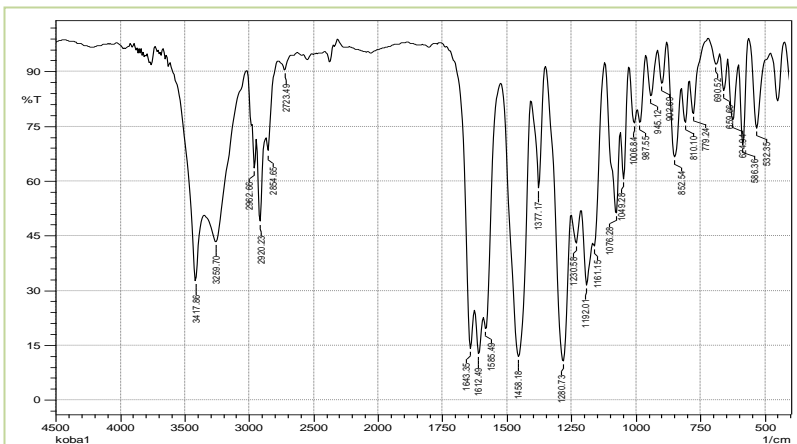
Selanjutnya penambahan pereaksi geser NaOMe bertujuan untuk mengetahui pola hidrosilasi dan mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubstitusi yang diindikasikan adanya pergeseran batokromik

pada spektrum dengan nilai minimal sebesar 5 nm. Hal ini berarti bahwa senyawa **1** hasil isolasi mengandung gugus fenol pada senyawa santon.

Pada spektrum AlCl_3 memberikan λ_{max} 244 dan 314 nm sehingga tidak terjadi pergeseran batokromik dan penambahan $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ memberikan λ_{max} 244 dan 314 nm.

8.1.2 Spektroskopi Inframerah

Inframerah Selanjutnya pengukuran dengan menggunakan spektrum inframerah menunjukkan adanya serapan yang khas dan tajam pada beberapa panjang gelombang. Hasil identifikasi spektrum inframerah senyawa **1** hasil isolasi diperlihatkan pada Gambar 12 di bawah ini.

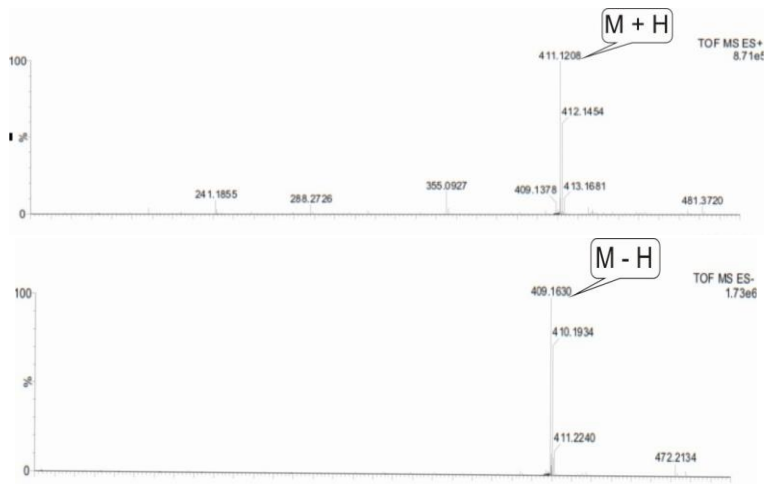


Gambar 12. Spektrum inframerah senyawa **1**

Spektrum inframerah menunjukkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil (v_{maks} 3417 cm^{-1}), gugus =C-H (v_{maks} 2962 cm^{-1}), gugus -C-H (v_{maks} 2920 dan 2854 cm^{-1}), gugus karbonil berkonyugasi (v_{maks} 1643 cm^{-1}), gugus C=C aromatis (v_{maks} 1612 ; 1558 dan 1458 cm^{-1}), dan gugus C-O eter (v_{maks} 1076 cm^{-1}) yang merupakan ciri khas senyawa golongan santon (Elfita, 2008)

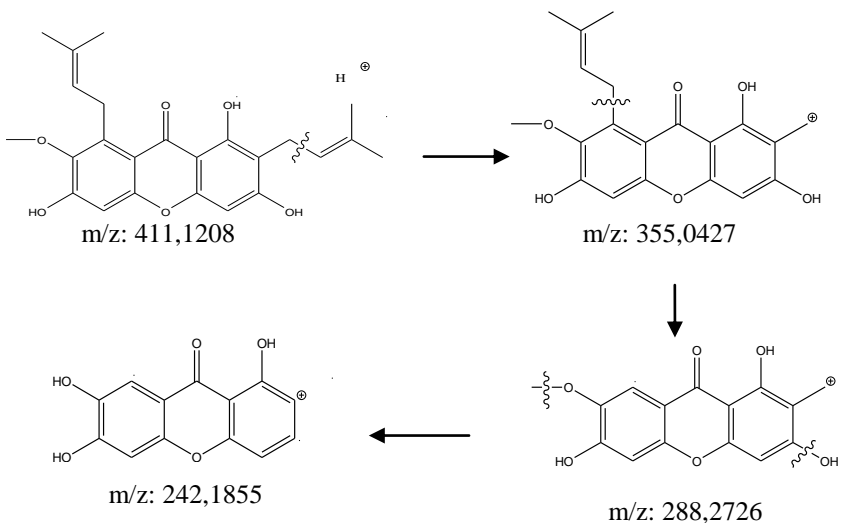
8.1.3 Spektroskopi massa

Spektrum massa dari senyawa **1** dilakukan dengan metode *high resolution* TOF MS (*Time of Flight Mass Spectroscopy*) diberikan pada Gambar 13 di bawah ini.



Gambar 13. Spektroskopi Massa TOF ES (-) (atas) dan TOF ES (+) (bawah) senyawa **1**

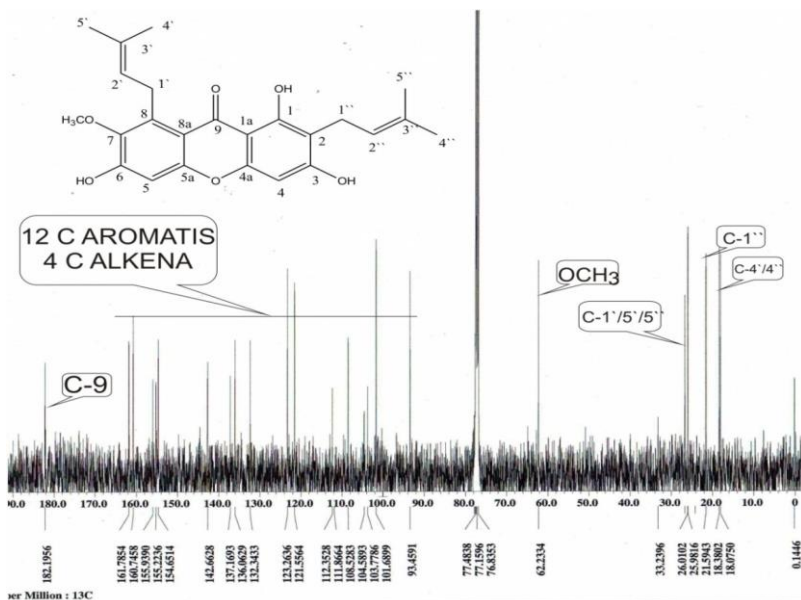
Pada spektrum TOF ESI- memberikan puncak pada 409,1630 yang menunjukkan ion molekul $[M-H]$ dan TOF ES+ memberikan puncak pada 411, 1208 yang menunjukkan ion molekul $[M+H]$. Kedua spektrum diatas menunjukkan bahwa massa molekul senyawa **1** hasil isolasi adalah 410,1709. Massa molekul ini sesuai (mendekati dari) rumus molekul $C_{24}H_{26}O_6$ yang mempunyai massa molekul 410,1729. Dengan demikian, senyawa **1** merupakan golongan santon yang mempunyai rumus molekul $C_{24}H_{26}O_6$. Pola fragmentasi pada TOF ES+ menunjukkan fragmen 355,0427; 288,2726 dan 242,1855 sehingga usulan fragmentasi senyawa hasil isolasi sebagaimana Gambar14 berikut ini



Gambar 14. Pola fragmentasi senyawa **1**

8.1.4 Spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$ ($^{13}\text{C-Nuclear Magnetic Resonance}$)

Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan data pergeseran kimia senyawa **1** hasil isolasi menggunakan CDCl_3 dengan frekuensi 100 MHz menunjukkan adanya sinyal 27 sinyal karbon. Didukung oleh spektrum DEPT 135 dan spektrum HMQC ternyata senyawa hasil isolasi ini memiliki 24 atom karbon. Jadi terdapat tiga sinyal sebagai pengotor. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ ditunjukkan pada Gambar 15 dibawah ini.



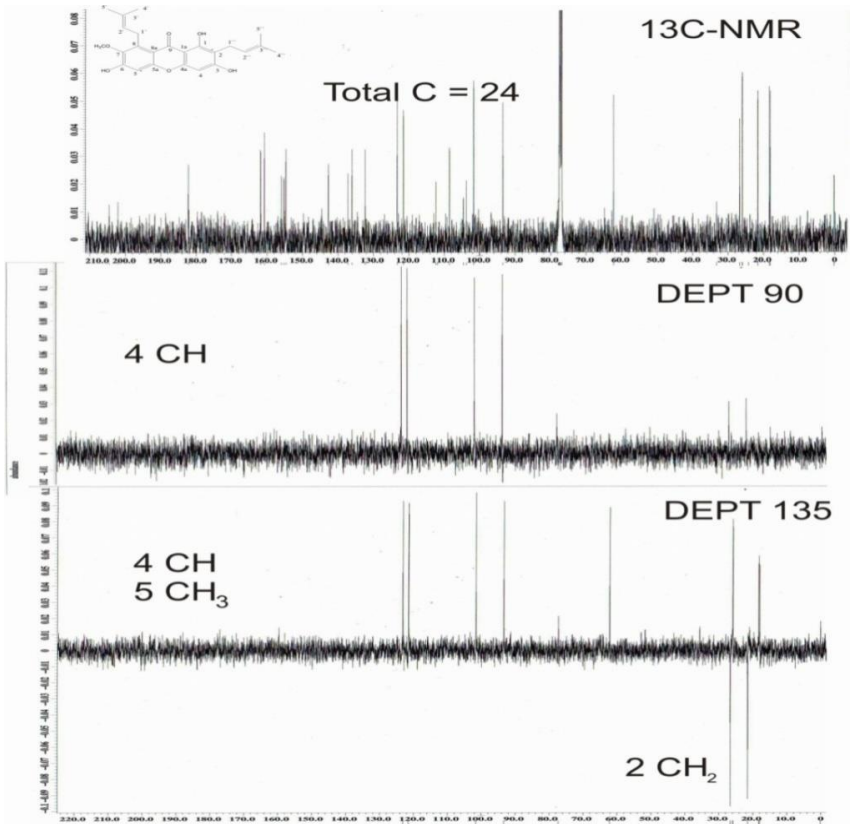
Gambar 15. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ senyawa **1**

Diantara ke-24 karbon yang dimiliki oleh senyawa hasil isolasi terdapat empat karbon metil yaitu pada δ_{C} 18,0 (C-4''); 18,3 (C-4''); 25,8 ($\text{C-$

5') dan 25,9 ppm (C-5''), satu karbon metoksil pada δ_C 62,2 ppm, dua karbon metilen alilik pada δ_C 21,5 (C-1'') dan 26,7 ppm (C-1'), dua karbon metin vinilik yaitu pada δ_C 121,5 (C-2'') dan 123,2 ppm (C-2'), dua karbon metin aromatis yaitu pada δ_C 93,4 (C-4) dan 101,6 ppm (C-5), dan 13 karbon kuartener yaitu pada δ_C 103,7 (C-1a) ; 111,8 (C-2) ; 112,3 (C-8a) ; 132,3 (C-3'') ; 136,0 (C-3') ; 137,1 (C-8) ; 142,6 (C-7) ; 154,6 (C-3) ; 155,2 (C-6) ; 155,9 (C-5a) ; 160,7 (C-1) ; 161,7 (C-4a); 182,1 (C-9). Sinyal yang khas untuk kerangka santon yaitu munculnya δ_C 182,1 untuk C karbonil.

8.1.5 Spektroskopi DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)

Spektrum NMR karbon DEPT dilakukan pada frekuensi 90 dan 135 MHz dari senyawa hasil isolasi. Spektrum DEPT 90 menunjukkan adanya empat sinyal ke atas, hal ini menunjukkan bahwa terdapat empat karbon CH. Spektrum DEPT 135 menunjukkan sembilan sinyal menunjukkan keatas dan dua sinyal menghadap ke bawah. Sembilan sinyal tersebut yang muncul keatas menunjukkan adanya karbon CH dan CH₃ sebanyak sembilan buah. Dengan mengingat jumlah CH ada empat buah, maka jumlah karbon CH₃ sebanyak lima buah. Sedangkan spektrum DEPT 135 yang menghadap ke bawah, menunjukkan adanya dua karbon CH₂. Sehingga karbon kuartener sebanyak 13 buah. Spektrum DEPT ditunjukkan pada Gambar 16 di bawah ini.

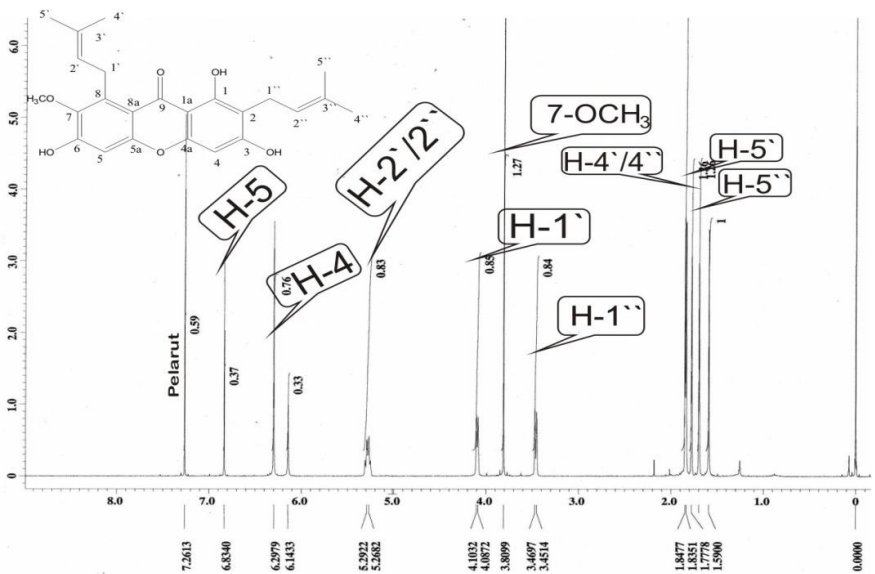


Gambar 16. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT 90 dan DEPT 135 senyawa **1**

8.1.6 Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$)

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa **1** hasil isolasi diperoleh dengan menggunakan pelarut CDCl_3 pada frekuensi 400 MHz. Pada spektrum ini terdapat dua proton aromatis singlet yaitu pada δ_{H} 6,29 ppm (H-4) dan 6.83

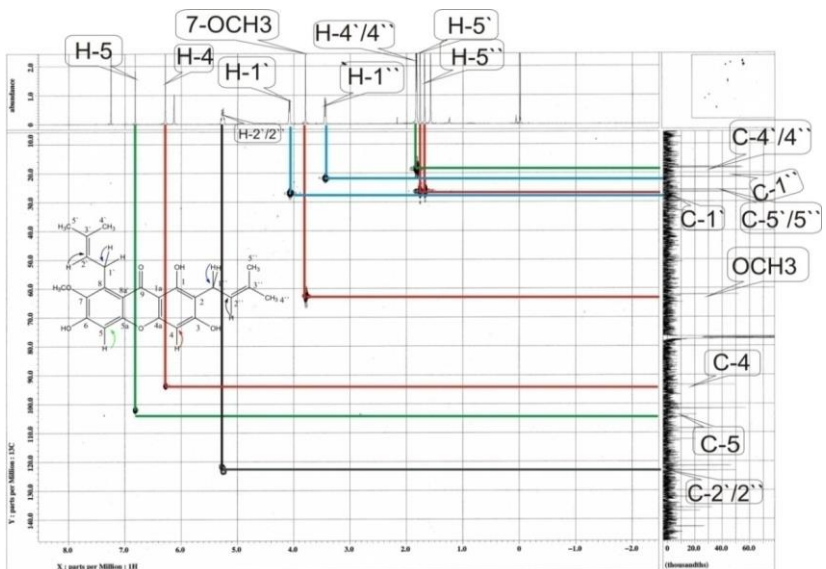
ppm (H-5), satu kelompok proton metoksi (3H) pada δ_H 3,80 ppm dan dua gugus prenil yang dikarakterisasi dengan munculnya sinyal untuk dua proton alilik pada δ_H 3,45 ppm (2 H, d, $J = 7,3$ Hz ; H-1'') dan pada δ_H 4,09 ppm (2 H, d, $J = 6,4$ Hz ; H-1'), dua proton vinilik yaitu pada δ_H 5,26 ppm (1H, t) dan 5,29 ppm (1H, t) dan empat gugus metil yaitu δ_H 1,56 ppm (3H, s H-4''); 1,77 ppm (3H, s H-4'); 1,83 ppm (3H, s, H-5'') dan 1,84 ppm (3H, s, H-5'). Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **1** hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 17 di bawah ini.



Gambar 17. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa **1** hasil isolasi

8.1.7 Spektroskopi HMQC (^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)

HMQC merupakan salah satu jenis H-NMR dua dimensi yang digunakan untuk membantu dalam penentuan struktur suatu senyawa. Melalui data HMQC ini dapat diketahui proton-karbon dengan jarak satu ikatan, sehingga secara tidak langsung dapat mengetahui karbon yang mengikat proton dan karbon yang tidak mengikat proton. Spektrum ^1H - ^{13}C -NMR HMQC dari senyawa santon hasil isolasi menunjukkan adanya korelasi yang terbentuk antara proton dan karbon yang ditunjukkan pada Gambar 18 di bawah ini.



Gambar 18. Spektrum HMQC senyawa **1** hasil isolasi

Spektrum HMQC mengidentifikasi sinyal-sinyal karbon yang mengikat proton, sehingga data ini memperkuat pola substitusi hidroksi pada cincin santon. Setelah diperhatikan spektrum HMQC dari senyawa hasil isolasi dapat diketahui bahwa pada cincin C terdapat proton H-4 pada pergeseran kimia δ_H 6,29 ppm berkorelasi dengan C-4 pada pergeseran kimia δ_C 93,4 ppm dan pada cincin A terdapat proton H-5 pada pergeseran kimia δ_H 6,83 ppm yang berkorelasi dengan C-4 pada pergeseran kimia δ_C 101,6 ppm. Dari keterangan tersebut dapat disimpulkan bahwa pada cincin santon senyawa **1** hanya ada dua proton yang terikat. Hal ini juga mendukung bahwa senyawa **1** hasil isolasi adalah senyawa golongan santon dengan nama α -mangostin. Data korelasi proton dan karbon senyawa **1** hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah ini.

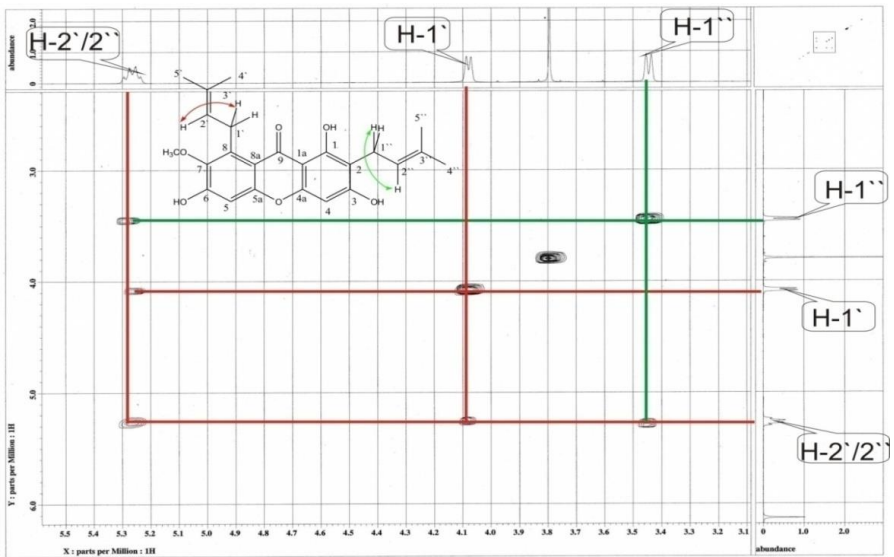
Tabel 3. Data korelasi proton dan karbon senyawa **1** hasil isolasi

Posisi C	Pergeseran kimia (δ , ppm)	Posisi H	Pergeseran kimia (δ , ppm)
C-4	93,4	H-4	6,29
C-5	101,6	H-5	6.83
C-1`	26,7	H-1`	4,09
C-2`	123,2	H-2`	5,29
C-4`	18,3	H-4`	1,84
C-5`	25,8	H-5`	1,69
C-1``	21,5	H-1``	3,45

C-2''	121,5	H-2''	5,26
C-4''	18,0	H-4''	1,77
C-5''	25,9	H-5''	1.83
7-OCH ₃	62,2	7-OCH ₃	3,80

8.1.8 Spektroskopi COSY (¹H-¹H Homonuclear Correlated Spectroscopy)

Spektrum COSY pada daerah pergeseran 3,3 - 5,5 ppm dari senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 19 di bawah ini.

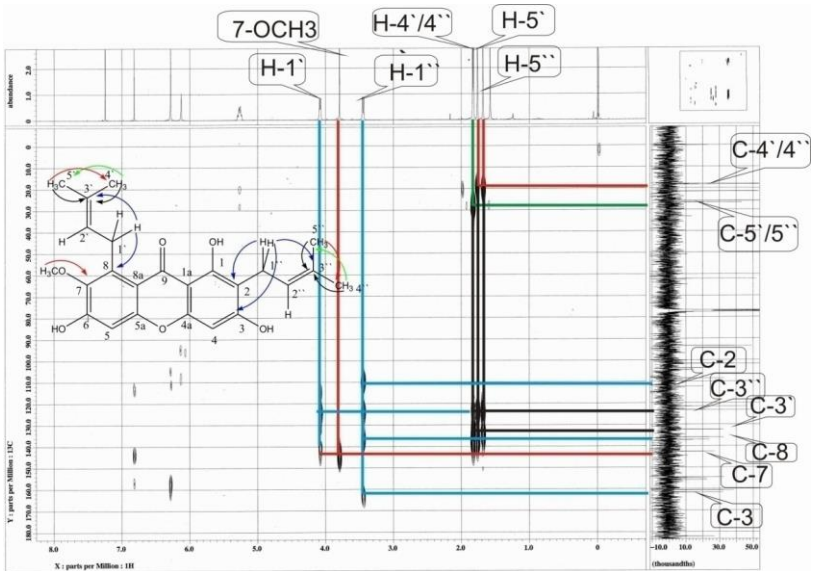


Gambar 19. Spektrum COSY senyawa 1 hasil isolasi

Spektrum COSY pada daerah pergeseran kimia δ_H 3,3 - 5,5 ppm dari senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya korelasi yang terjadi antara H-1' dengan H-2' dan antara H-1'' dan H-2''. Hal tersebut menjelaskan bahwa proton H-1' bertetangga dengan proton H-2' dan proton H-1'' bertetangga dengan H-2''. Proton-proton yang saling berkorelasi tersebut berada pada dua gugus isoprenil yang terikat pada cincin santon. Berdasarkan data dari COSY tersebut, kembali ditegaskan bahwa senyawa hasil isolasi tersebut adalah senyawa **1** santon dengan nama α -mangostin

8.1.7 Spektroskopi HMBC (1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*)

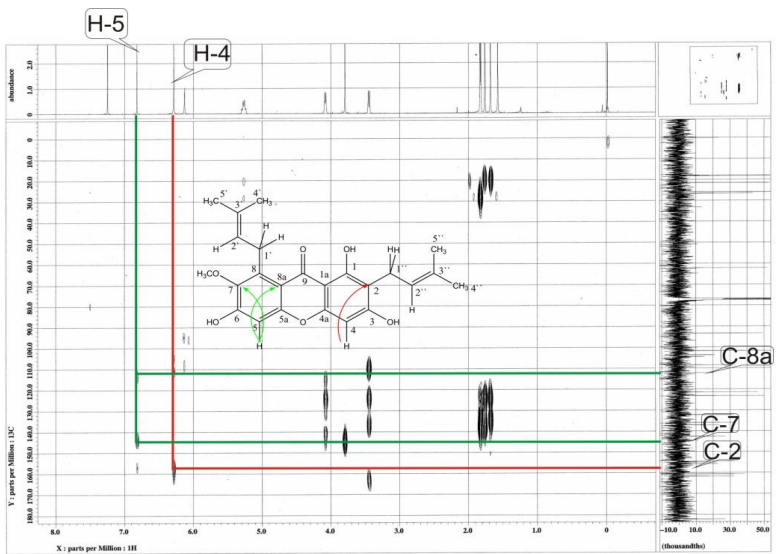
Spektrum HMBC senyawa **1** hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 20 di bawah ini.



Gambar 20. Spektrum HMBC senyawa **1** hasil isolasi

Spektrum HMBC memberikan informasi tentang letak proton terhadap karbon mempelajari korelasi yang terjadi sepanjang dua atau tiga ikatan antara proton dan karbon sehingga dapat diketahui pola substitusi struktur santon hasil isolasi. Spektrum yang ditampilkan pada Gambar 21 di atas menunjukkan terdapat korelasi antara proton H-1'' dengan C- 2 dan C- 3'', sementara proton H-1' berkorelasi dengan C-8 dan C-3'. Dari kedua data tersebut dapat dinyatakan bahwa kedua isoprenil tersebut terikat pada C-2 dan C-8 pada cincin santon. Proton OCH₃ berkorelasi dengan C-7 yang mengindikasikan bahwa gugus metoksi terikat pada C-7 pada cincin santon.

Selain informasi tersebut, spektrum HMBC juga memberikan korelasi proton isoprenil yang lain yaitu adanya korelasi antara H-4'' dengan C-5''; H-5'' dengan C-4''; H-4' dengan C-5'; H-5' dengan C-4'. Spektrum HMBC selanjutnya dapat dilihat pada Gambar 21 di bawah ini



Gambar 21. Spektrum HMBC senyawa **11** hasil isolasi

Spektrum yang ditampilkan pada Gambar 21 di atas menunjukkan terdapat korelasi antara proton H-4 dengan C-3, sementara proton H-5 berkorelasi dengan C-8a dan C-7. Kedua data tersebut memperkuat pernyataan proton H terletak pada cincin A dan proton H-5 pada cincin A senyawa santon. Berdasarkan analisis tersebut di atas spektrum HMBC

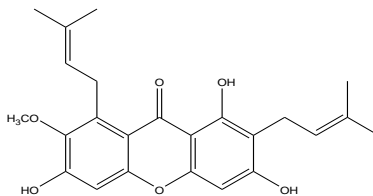
mendukung bahwa senyawa hasil isolasi merupakan α -mangostin. Selanjutnya untuk mendukung analisis spektroskopi terhadap senyawa hasil isolasi diatas dan senyawa ini merupakan senyawa yang sudah dikenal, maka dilakukan perbandingan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ dengan senyawa α -mangostin yang dilaporkan oleh Chen (2007) seperti terlihat pada Tabel 4 berikut ini.

Tabel 4. Perbandingan data $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ senyawa 1 hasil isolasi dengan α -mangostin

C	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)		H	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	
	Senyawa 1	α -Mangostin		Senyawa 1	α -Mangostin
1	160,7	161,7			
2	111,8	111,1			
3	154,6	155,7			
4	93,4	93,2	4	6,29	6,38
4a	161,7	162,9			
5a	155,9	157,3			
5	101,6	102,7	5	6.83	6,80
6	155,2	156,2			
7	142,6	144,5			
8	137,1	138,1			
8a	112,3	112,0			
9	182,1	182,8			
1a	103,7	103,6			

1'	26,7	26,9	1'	4,09	4,12
2'	123,2	124,8	2'	5,29	5,27
3'	136,0	131,4			
4'	18,3	18,3	4'	1,84	1,82
5'	25,8	25,9	5'	1,69	1,64
1''	21,5	22,0	1''	3,45	3,34
2''	121,5	124,8	2''	5,26	5,27
3''	132,3	131,4			
4''	18,0	17,9	4''	1,77	1,77
5''	25,9	25,8	5''	1,83	1,63
7-			7-		
OCH ₃	62,2	61,3	OCH ₃	3,80	3,78

Dari Tabel 4 di atas diketahui bahwa spektrum ¹³C-NMR dan ¹H-NMR senyawa hasil isolasi identik dengan senyawa α-mangostin seperti yang dilaporkan oleh Chan (2007). Dengan demikian data tersebut mendukung pengusulan senyawa **1** hasil isolasi merupakan senyawa santon dengan nama α-mangostin



α-Mangostin

8.2 Elusidasi struktur senyawa dari fraksi diklorometana.

Hasil Pemurnian terhadap 6,5 gram fraksi diklorometana dengan metode kromatografi kolom dengan eluen diklorometana : etil asetat (9:1) hingga metanol 100 % diperoleh 15 fraksi. Fraksi 11 sebanyak 0,8 gram pada rekristalisasi dengan menggunakan pelarut aseton, diklorometana dan n-heksana dan menghasilkan senyawa 2 (Y2) berupa padatan berwarna kuning sebanyak 268 mg

Pengujian kemurnian terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan dengan metode kromatografi lapisan tipis dengan berbagai variasi komposisi eluen memperlihatkan noda tunggal, disamping itu juga dilakukan secara berulang pada setiap komposisi. Nilai Rf senyawa 2 hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen ditunjukkan pada Tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Nilai Rf senyawa 2 hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen

No	Eluen	Rf
1	n-heksana : dikloro metana (4 : 6)	0,12
2	n-heksana : dikloro metana (2 : 8)	0,28
3	n-heksana : etil asetat (8 : 2)	0,30
4	n-heksana : etil asetat (4 : 6)	0,82
5	diklorometana : etil asetat (8 : 2)	0,90
6	diklorometana : etil asetat (6 : 4)	0,92

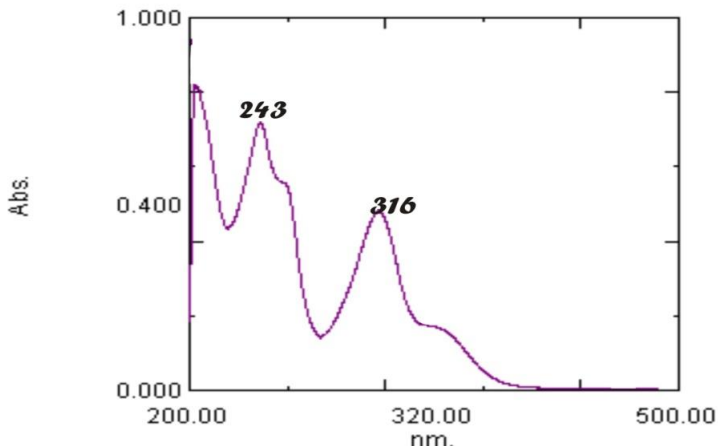
Berdasarkan percobaan di atas, dapat disimpulkan bahwa senyawa **2** hasil isolasi relatif murni. Selanjutnya senyawa **2** hasil isolasi terlebih dahulu diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 , dan hasil identifikasi menghasilkan warna biru-keunguan, yang menunjukkan bahwa senyawa **2** hasil isolasi adalah senyawa golongan fenolik. Pengukuran titik leleh terhadap senyawa hasil isolasi adalah 184°C - 185°C , dengan jarak titik leleh yang kecil dari 2°C dan didukung oleh hasil analisis kromatografi lapisan tipis menunjukkan bahwa senyawa **2** hasil isolasi relatif murni untuk keperluan analisis spektroskopi.

Selanjutnya penentuan struktur senyawa **2** hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan teknik spektroskopi ultraviolet (UV), inframerah (IR), Massa (MS), *Nuclear Magnetic Resonance* (^{13}C -NMR dan ^1H -NMR), *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence* (HMQC) dan ^1H - ^1H *Homonuclear Correlated Spectroscopy* (COSY) serta ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (HMBC).

8.2.1 Spektroskopi ultraviolet dan inframerah senyawa **2**

Pengukuran spektrofotometer Ultraviolet dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV 1700

series) dengan pelarut metanol. Penggunaan metanol sebagai pelarut dikarenakan senyawa golongan alkohol yang akan menyerap $\lambda < 185 \text{ nm}$ sehingga tidak mengganggu interpretasi spektrum pada daerah ultraviolet. Spektrum UV senyawa **2** hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 22 di bawah ini.



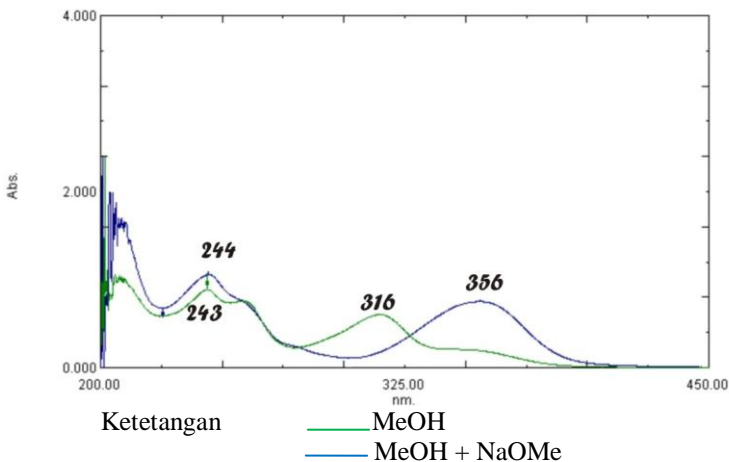
Gambar 22. Spektrum UV senyawa **2**

Hasil pengukuran spektroskopi ultraviolet pada senyawa **2** hasil isolasi memberikan λ_{maks} 316 dan 243 nm. [Interpretasi spektrum ultraviolet pada λ_{maks} 243 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari orbital π ke π^* ($\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}$) serta λ_{maks} 316 nm menunjukkan adanya transisi elektronik dari orbital n ke π^* ($\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$)]. Pengukuran spektrum ultraviolet ini

mengindikasikan bahwa senyawa **2** hasil isolasi memiliki kemiripan dengan senyawa **1** yang mempunyai kerangka santon.

Berdasarkan kesimpulan ini, data spektroskopi ini dan data spektroskopi lainnya (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2D-NMR) dianalisis fokus ke kerangka santon dan posisi substituen.

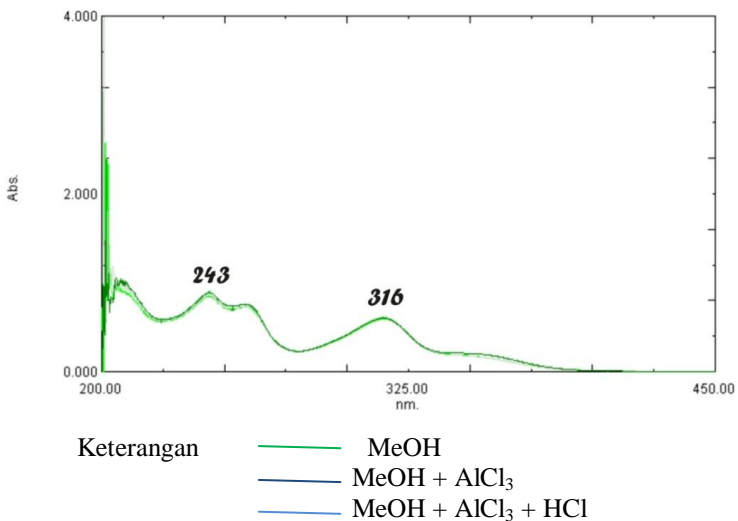
Untuk melengkapi data spektrum UV, maka terhadap senyawa **2** hasil isolasi dilakukan pengukuran dengan menggunakan pereaksi geser. Penambahan pereaksi geser bertujuan untuk mengetahui pola oksigenasi dari senyawa hasil isolasi. Penambahan pereaksi geser NaOMe memberikan pergeseran λ_{maks} 244 dan 356 nm. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 23. sebagai berikut



Gambar 23. Spektrum UV senyawa **2** dengan penambahan NaOMe

Penambahan pereaksi geser NaOMe bertujuan untuk mengetahui pola hidroksilasi dan mendeteksi gugus hidroksil yang lebih asam dan tidak tersubsitusi yang diindikasikan adanya pergeseran batokromik pada spektrum dengan nilai minimal sebesar 5 nm. Hal ini berarti pada senyawa **2** hasil isolasi ada gugus hidroksil yang lebih asam pada senyawa santon.

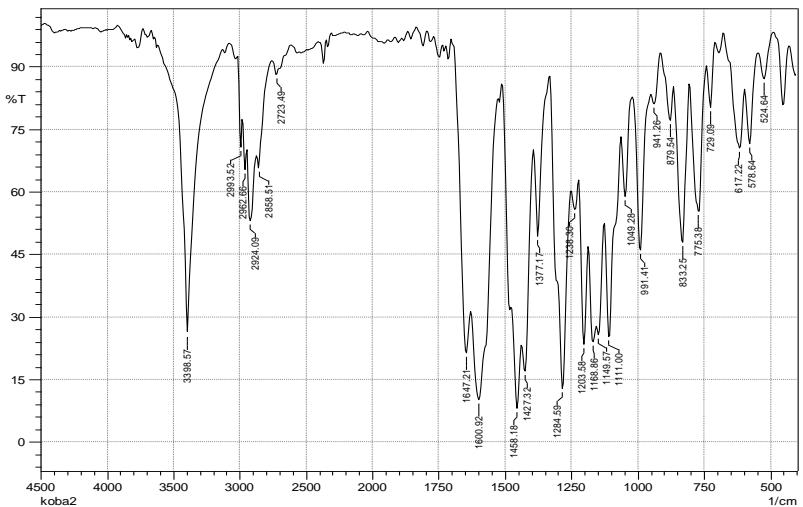
Pada spektrum AlCl_3 memberikan λ_{max} 243 dan 316 nm sehingga tidak terjadi pergeseran batokromik dan penambahan $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ memberikan λ_{max} 243 dan 316 nm. Pada spektrum $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ juga tidak mengalami pergeseran. Spektrum UV pereaksi geser $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ditunjukkan pada Gambar 24 sebagai berikut.



Gambar 24. Spektrum UV senyawa **2** dengan penambahan $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$

Penambahan AlCl_3 bertujuan untuk mengamati adanya gugus orto dihidroksi pada cincin benzena. Pada pengukuran terhadap senyawa hasil isolasi tidak memberikan pergeseran panjang gelombang batokromik sehingga mengindikasikan tidak adanya gugus orto-dihidroksil pada kerangka santon.

Data spektrum inframerah menunjukkan adanya serapan yang khas dan tajam pada beberapa panjang gelombang. Hasil identifikasi spektrum inframerah senyawa **2** hasil isolasi diperlihatkan pada Gambar 25 di bawah ini.

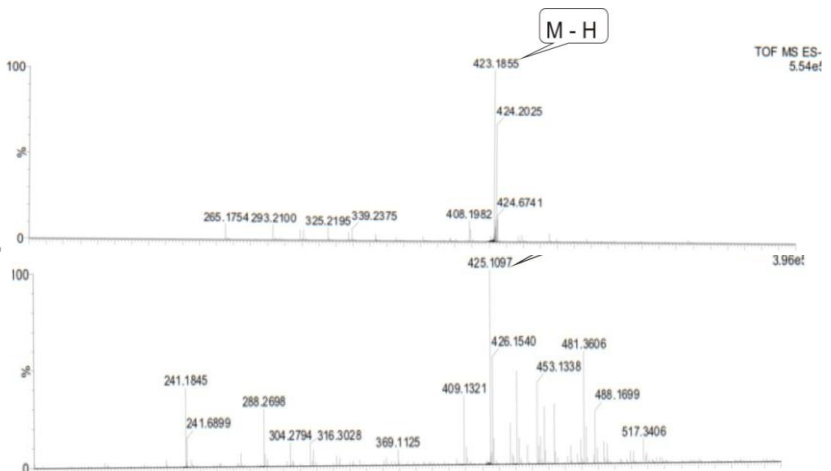


Gambar 25. Spektrum inframerah senyawa **2**

Sama seperti senyawa 1 senyawa 2 spektrum inframerah menunjukkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil (ν_{maks} 3398 cm^{-1}), gugus =C-H (ν_{maks} 2993 cm^{-1}), gugus -C-H (ν_{maks} 2924 dan 2858 cm^{-1}), gugus karbonil berkonyugasi (ν_{maks} 1647 cm^{-1}), gugus C=C aromatis (ν_{maks} 1600 ; 1558 dan 1427 cm^{-1}), dan gugus C-O eter (ν_{maks} 1111 cm^{-1}) yang merupakan ciri khas senyawa golongan santon (Elfita, 2008)

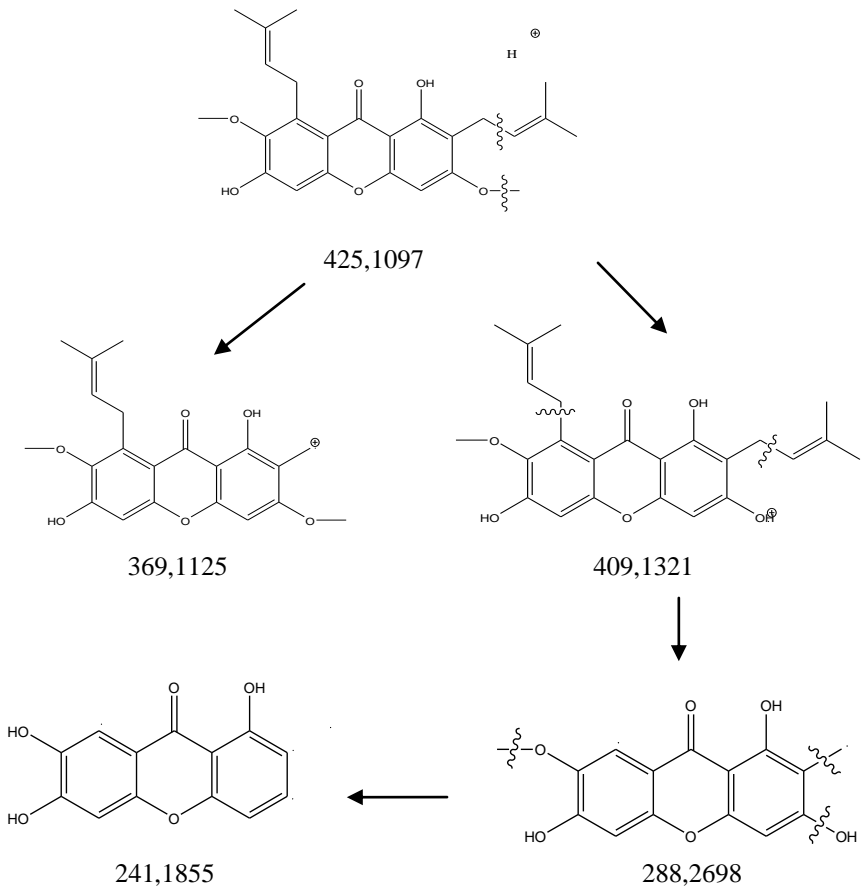
8.2.2 Spektroskopi massa senyawa 2

Spektrum massa dari senyawa 2 dengan metode *high resolution* TOF MS (*Time of Flight Mass Spectroscopy*) diberikan pada Gambar 26 di bawah ini.



Gambar 26. Spektroskopi massa TOF ES- (atas) dan TOF ES+ (bawah) Senyawa 2

Pada spektrum TOF ES- memberikan puncak pada 423,1855 yang menunjukkan ion molekul [M-H] dan TOF ES+ memberikan puncak pada 425,1097 yang menunjukkan ion molekul [M+H]. Kedua spektrum di atas menunjukkan bahwa massa molekul senyawa **2** hasil isolasi adalah 424,1855. Massa molekul ini sesuai dengan rumus molekul $C_{25}H_{28}O_6$ yang mempunyai massa molekul 424,1855. Dengan demikian, senyawa **2** merupakan golongan santon yang mempunyai rumus molekul $C_{25}H_{28}O_6$. Pola fragmentasi pada TOF ES+ menunjukkan fragmen 409,1321 ; 369,1125 ; 288,2698 dan 241,1855 sesuai dengan fragmentasi senyawa **2** hasil isolasi sebagaimana tercantum pada Gambar 27 berikut ini.

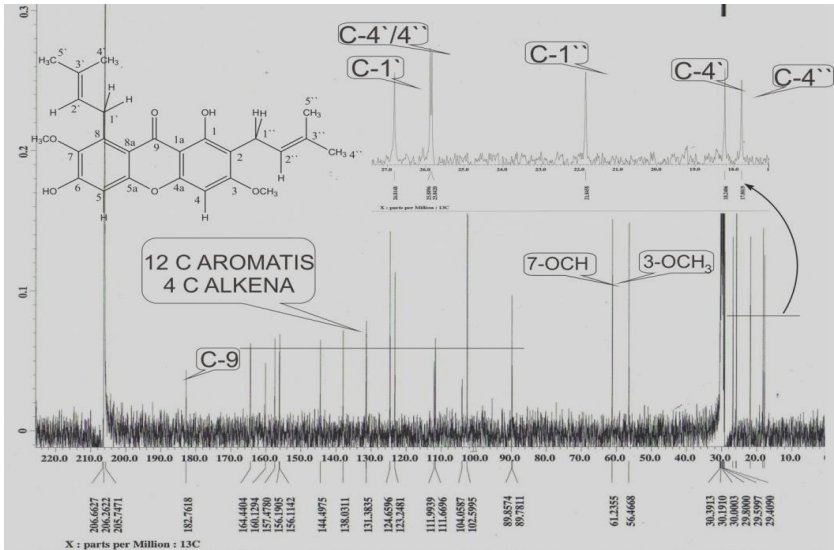


Gambar 27. Pola fragmentasi senyawa 2

8.2.3 Spektroskopi ^{13}C -NMR (*^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance*) senyawa 2

Spektrum ^{13}C -NMR dan data pergeseran kimia senyawa 2 hasil isolasi menggunakan CDCl_3 dengan frekuensi 100 MHz menunjukkan 25

sinyal karbon. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2** ditunjukkan pada Gambar 28 di bawah ini.



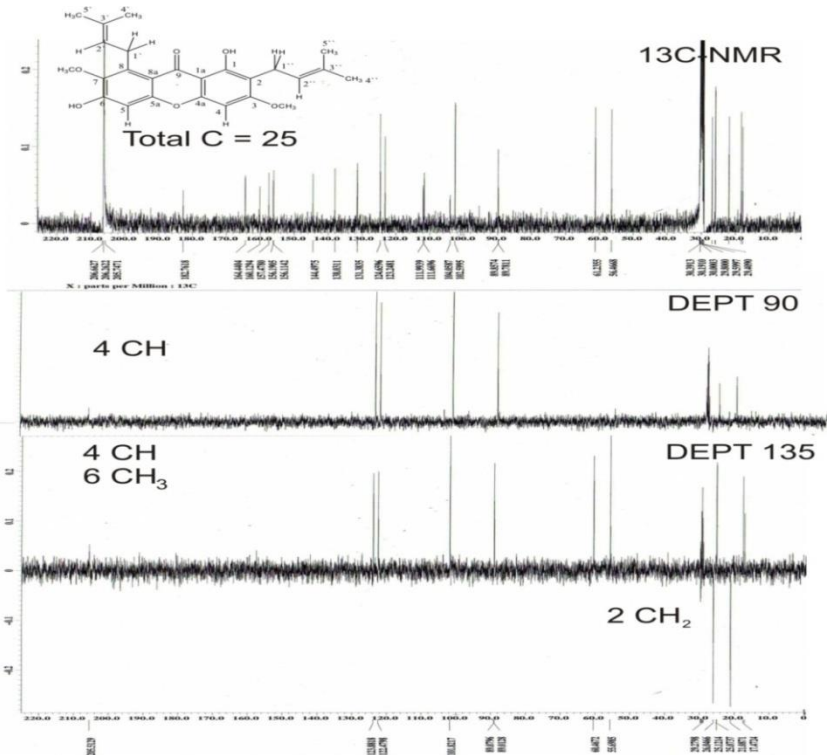
Gambar 28. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **2** hasil isolasi

Diantara ke-25 karbon yang dimiliki oleh senyawa **2** hasil isolasi terdapat empat karbon metil yaitu pada δ_{C} 17,8 (C-4''); 18,2 (C-4''); 25,84 (C-5') dan 25,88 ppm (C-5''), dua karbon metoksil pada δ_{C} 56,4 (C-7) dan 62,2 ppm (C-3), dua karbon metilen alilik pada δ_{C} 21,8 (C-1'') dan 26,8 ppm (C-1'), dua karbon metin vinilik yaitu pada δ_{C} 123,2 (C-2'') dan 124,6 ppm (C-2'), dua karbon metin aromatis yaitu pada δ_{C} 89,7 (C-4) dan 89,8 ppm (C-5), dan 13 karbon kuartener yaitu pada δ_{C} 102,5 (C-1a); 111,6 (C-2); 111,9

(C-8a); 131,3 (C-3^{''}); 131,4 (C-3[']); 138,0 (C-8); 144,4 (C-7); 156,11 (C-4a); 156,19 (C-6); 157,4 (C-5a); 160,1 (C-1); 164,4 (C-3), 182,7 (C-9). Sinyal yang khas untuk kerangka santon yaitu munculnya δ_C 182,7 untuk C karbonil.

8.2.4. Spektroskopi DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) senyawa 2

Spektrum NMR karbon DEPT dilakukan pada frekuensi 90 dan 135 MHz dari senyawa hasil isolasi. Spektrum DEPT 90 menunjukkan adanya empat sinyal ke atas, hal ini menunjukkan bahwa terdapat empat karbon CH. Spektrum DEPT 135 menunjukkan sembilan sinyal menunjukkan keatas dan dua sinyal menghadap ke bawah. Sembilan sinyal tersebut yang muncul keatas tersebut menunjukkan adanya karbon CH dan CH₃ sebanyak sembilan buah. Dengan mengingat jumlah CH ada empat buah, maka jumlah karbon CH₃ sebanyak enam buah. Sedangkan spektrum DEPT 135 yang menghadap ke bawah, menunjukkan adanya dua karbon CH₂. Sehingga jumlah karbon kuartener sebanyak 13 buah. Spektrum DEPT ditunjukkan pada Gambar 29 di bawah ini.

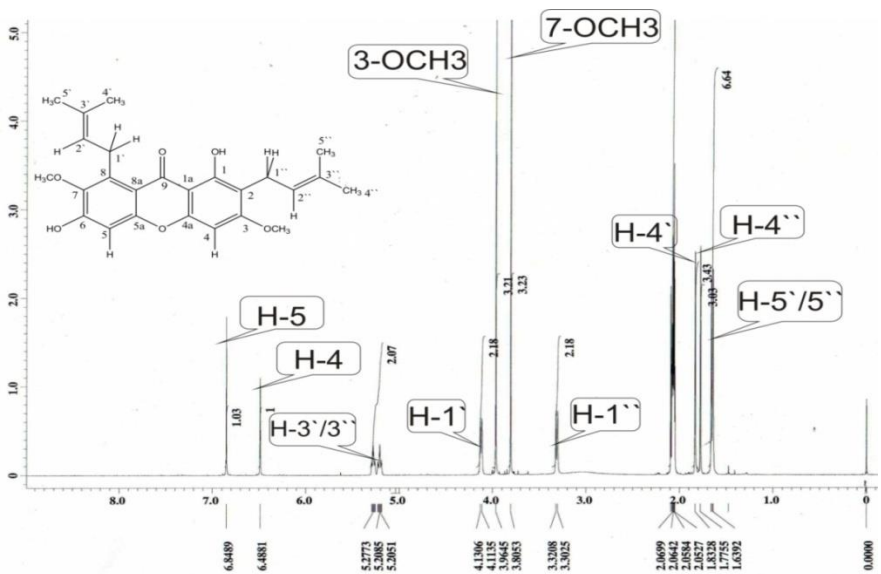


Gambar 29. Spektrum ^{13}C -NMR DEPT 90 dan 135 senyawa 2

8.2.5. Spektroskopi ^1H -NMR (^1H - Nuclear Magnetic Resonance) Senyawa 2

Spektrum ^1H -NMR dari senyawa 2 hasil isolasi dengan menggunakan pelarut CDCl_3 pada frekuensi 400 MHz. Pada spektrum ini terdapat dua proton aromatis singlet yaitu pada δ_{H} 6,48 ppm (H-4) dan 6,84 ppm (H-5), dua kelompok proton metoksi (3H) pada δ_{H} 3,80 ppm (7-OCH₃);

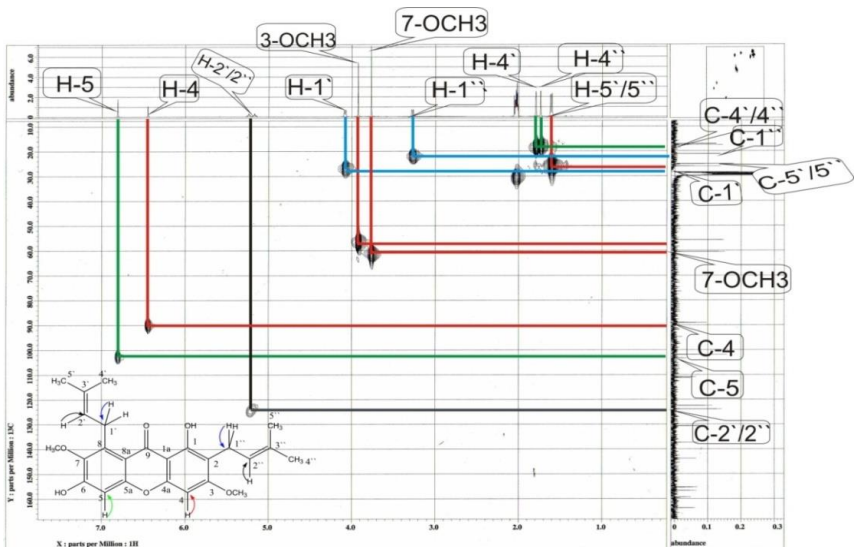
3,96 ppm (3-OCH₃), dua gugus prenil yang dikarakterisasi dengan munculnya sinyal untuk dua proton alilik pada δ_H 3,31 ppm (2 H, d, J = 7,3 Hz ; H-1'') dan pada δ_H 4,12 ppm (2 H, d, J = 6,4 Hz ; H-1'), dua proton vinilik yaitu pada δ_H 5,20 ppm (1H, t, H-2') dan 5,27 ppm (1H, t, H-2'') dan empat gugus metil yaitu δ_H 1,63 ppm (3H, s, H-4') ; 1,77 ppm (3H, s, H-5') ; 1,65 ppm (3H, s, H-4'') dan 1,83 ppm (3H, s, H-5''). Spektrum ¹H-NMR senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 30 di bawah ini.



Gambar 30. Spektrum ¹H-NMR senyawa 2 (Y2) hasil isolasi

8.2.6. Spektroskopi HMQC (^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) senyawa 2

Spektrum ^1H - ^{13}C -NMR HMQC dari senyawa 2 santon hasil isolasi menunjukkan korelasi antara proton dan karbon seperti yang terlihat pada Gambar 31 di bawah ini.



Gambar 31. Spektrum HMQC senyawa 2 hasil isolasi

Spektrum HMQC mengidentifikasi sinyal-sinyal karbon yang mengikat proton, sehingga data ini memperkuat pola substitusi hidroksi pada cincin santon. Setelah diperhatikan spektrum HMQC dari senyawa hasil isolasi dapat diketahui bahwa pada cincin C terdapat proton H-4 pada

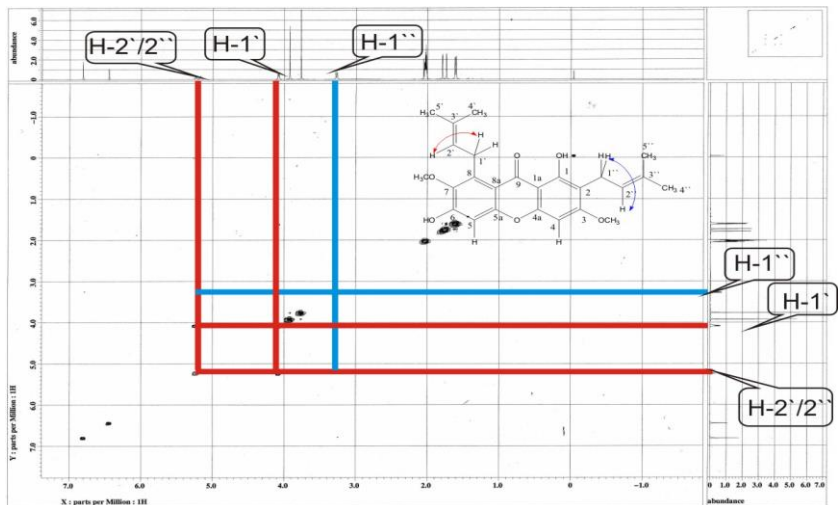
pergeseran kimia δ_H 6,48 ppm berkorelasi dengan C-4 pada pergeseran kimia δ_C 93,4 ppm dan pada cincin A terdapat proton H-5 pada pergeseran kimia δ_H 6,84 ppm berkorelasi dengan C-5 pada pergeseran kimia δ_C 101,6 ppm. Dari keterangan tersebut dapat disimpulkan bahwa pada cincin santon hanya ada dua proton yang terikat. Hal ini juga mendukung bahwa senyawa hasil isolasi adalah senyawa santon. Data korelasi proton dan karbon senyawa isolasi terlihat pada Tabel 6 di bawah ini.

Tabel 6. Data korelasi proton dan karbon senyawa **2** hasil isolasi

Posisi C	Pergeseran kimia (δ , ppm)	Posisi H	Pergeseran kimia(δ , ppm)
C-4	89,7	H-4	6,48
C-5	102,5	H-5	6.84
C-1`	21,8	H-1`	3,31
C-2`	124,6	H-2`	5,20
C-4`	131,4	H-4`	1,63
C-5'	17,8	H-5'	1,77
C-1``	26,8	H-1``	4,12
C-2``	123,2	H-2``	5,27
C-4``	18,2	H-4``	1,65
C-5``	25,88	H-5``	1,83
3-OCH ₃	56,4	3-OCH ₃	3,96
7-OCH ₃	62,2	7-OCH ₃	3,80

8.2.7 Spektroskopi COSY (^1H - ^1H Homonuclear Correlated Spectroscopy) Senyawa 2

Spektrum COSY pada daerah pergeseran 3,3 - 5,5 ppm dari senyawa 2 hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 32 di bawah ini.



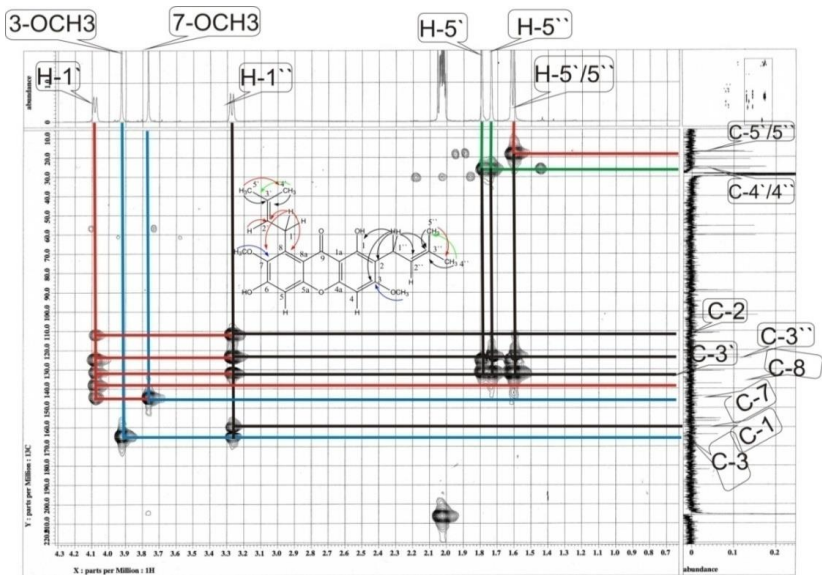
Gambar 32. Spektrum COSY senyawa 2

Spektrum COSY pada daerah pergeseran kimia δ_{H} 0.0 - 7,5 ppm dari senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya korelasi yang terjadi antara H-1' dengan H-2' dan antara H-1'' dan H-2''. Hal tersebut menjelaskan bahwa proton H-1' bertetangga dengan proton H-2' dan proton H-1'' bertetangga dengan H-2''. Proton-proton yang saling berkorelasi tersebut berada pada dua gugus isoprenil yang terikat pada cincin santon. Berdasarkan data dari COSY

tersebut, kembali ditegaskan bahwa senyawa hasil isolasi tersebut adalah senyawa santon yang mempunyai kemiripan dengan senyawa **1**, akan tetapi terdapat perbedaan adanya gugus fungsi metoksi pada atom C-3 dengan nama β -mangostin

8.2.8. Spektroskopi HMBC (^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) senyawa **2**

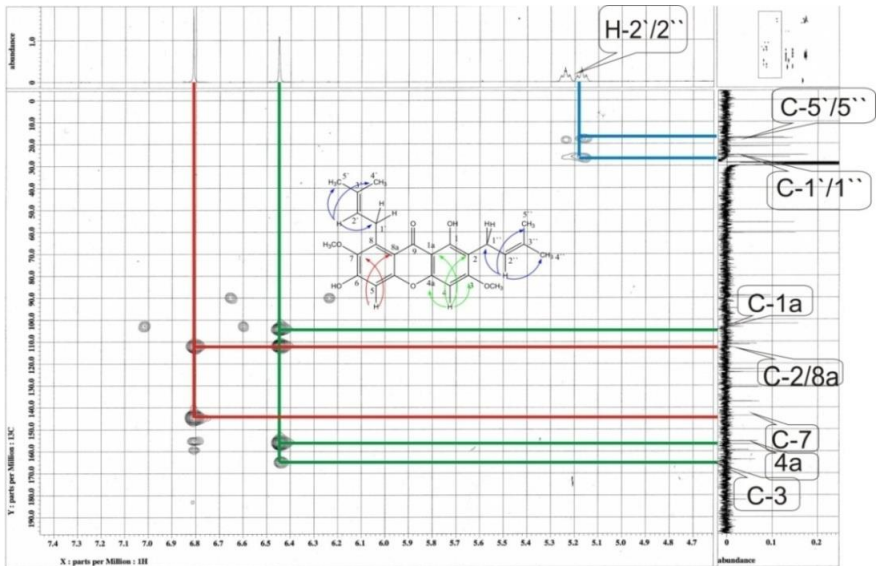
Spektrum HMBC senyawa **2** santon hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 33 dibawah ini.



Gambar 33. Spektrum HMBC senyawa **2** hasil isolasi (0,7- 4,3 ppm)

Spektrum HMBC memberikan informasi tentang letak proton terhadap karbon mempelajari korelasi yang terjadi sepanjang dua atau tiga ikatan antara proton dan karbon sehingga dapat diketahui pola substitusi struktur santon hasil isolasi. Spektrum yang ditampilkan pada gambar di atas menunjukkan terdapat korelasi antara proton H-1'' dengan C-1, C-2, C-3, C-2'' dan C-3'', sementara proton H-1' berkorelasi dengan C-7, C-8 dan C-2'. Dari kedua data tersebut dapat dinyatakan bahwa kedua isoprenil tersebut terikat pada C-2 dan C-8 pada cincin santon. Proton OCH₃ berkorelasi dengan C-3 dan C-7 yang mengindikasikan bahwa gugus metoksi terikat pada C-3 dan C-7.

Selain informasi tersebut, spektrum HMBC juga memberikan korelasi proton isoprenil yang lain yaitu adanya korelasi antara H-4'' dengan C-5'' dan H-3''; H-5'' dengan C-4'' dan H-3''; H-4' dengan C-5' dan C-3'; H-5' dengan C-4' dan C-3'. Selanjutnya spektrum HMBC pada δ_H 4,7 - 7,4 ppm dapat dilihat pada Gambar 34 di bawah ini.



Gambar 34. Spektrum HMBC senyawa **2** hasil isolasi pada δ_{H} 4,7 - 7,4 ppm

Spektrum yang ditampilkan pada gambar diatas menunjukkan terdapat korelasi antara proton H-4 dengan C-7 dan C-8a, sementara proton H-5 berkorelasi dengan C-1a, C-4a, C-3 dan C-2. Dari kedua data tersebut memperkuat pernyataan proton H terletak pada cincin A dan proton H-5 pada cincin A senyawa santon.

Berdasarkan analisis tersebut di atas spektrum HMBC mendukung bahwa senyawa hasil isolasi merupakan β -mangostin. Selanjutnya untuk

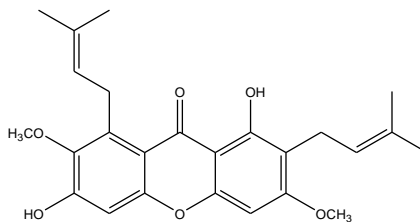
mendukung analisis spektroskopi terhadap senyawa hasil isolasi di atas dan senyawa ini merupakan senyawa yang udah dikenal, maka dilakukan perbandingan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ dengan senyawa β -mangostin yang dilaporkan oleh Lukis (2011) seperti terlihat pada Tabel 7 berikut ini.

Tabel 7. Perbandingan data $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ senyawa 2 hasil isolasi dengan β -mangostin

C	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)		H	$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	
	Senyawa 2	β -mangostin		Senyawa 2	β -mangostin
1	160,1	160,6			
2	111,6	111,1			
3	164,4	162,9			
4	89,7	89,9	4	6,48	6,36
4a	156,1	155,7			
5a	157,4	157,3			
5	102,5	102,7	5	6,84	6,39
6	156,2	156,2			
7	144,4	144,5			
8	138,0	138,1			
8a	111,9	112,2			
9	182,7	182,8			
1a	104,0	103,6			
1`	21,8	21,9	1`	3,31	3,34

2`	124,6	123,5	2`	5,20	5,27
3`	131,4	132,4			
4`	17,8	17,9	4`	1,63	1,63
5`	25,8	25,9	5`	1,77	1,77
1``	26,8	26,9	1``	4,12	4,12
2``	123,2	123,32	2``	5,27	5,27
3``	131,3	131,4			
4``	18,2	18,3	4``	1,65	1,69
5``	25,9	25,9	5``	1,83	1,82
3-OCH ₃	56,4	56,5	3-OCH ₃	3,96	3,93
7-OCH ₃	62,2	61,3	7-OCH ₃	3,80	3,83

Dari Tabel 8 di atas diketahui bahwa spektrum ¹³C-NMR dan ¹H-NMR senyawa **2** hasil isolasi identik dengan senyawa β-mangostin seperti yang dilaporkan oleh Lukis (2010). Dengan demikian data tersebut mendukung pengusulan senyawa **2** hasil isolasi merupakan senyawa santon dengan nama β-mangostin.



β-mangostin

8.3. Elusdiasi struktur dari fraksi etil asetat

Hasil pemurnian 10 gram fraksi etil asetat dengan metode kromatografi kolom dengan eluen yang digunakan n-heksana, diklorometana, etil asetat dan metanol menghasilkan 21 fraksi. Fraksi 5 sebanyak 0,2 gram dikromatografi kolom ulang dengan pengelusan dimulai dari n-heksana - diklorometana (5 : 5) etil asetat dan metanol dengan volume 50 mL. Eluat ditampung dalam vial 20 mL dan didapatkan 56 vial. Vial 25-26 dikumpulkan dan didapatkan padatan warna putih sebanyak 22 mg (senyawa **3**).

Pengujian kemurnian terhadap senyawa **3** hasil isolasi dilakukan dengan metode kromatografi lapisan tipis dengan berbagai variasi komposisi eluen memperlihatkan noda tunggal, disamping itu juga dilakukan secara berulang pada setiap komposisi. Nilai Rf senyawa **3** hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen ditunjukkan pada Tabel 8 di bawah ini.

Tabel 8. Nilai Rf senyawa **3** hasil isolasi dengan berbagai komposisi eluen

No	Eluen	Rf
1	n-heksana : dikloro metana (8 : 2)	0,03
2	n-heksana : dikloro metana (6 : 4)	0,23
3	n-heksana : dikloro metana (4 : 6)	0,68
4	n-heksana : dikloro metana (2 : 8)	0,82
5	n-heksana : etil asetat (8 : 2)	0,61
6	n-heksana : etil asetat (6 : 4)	0,91

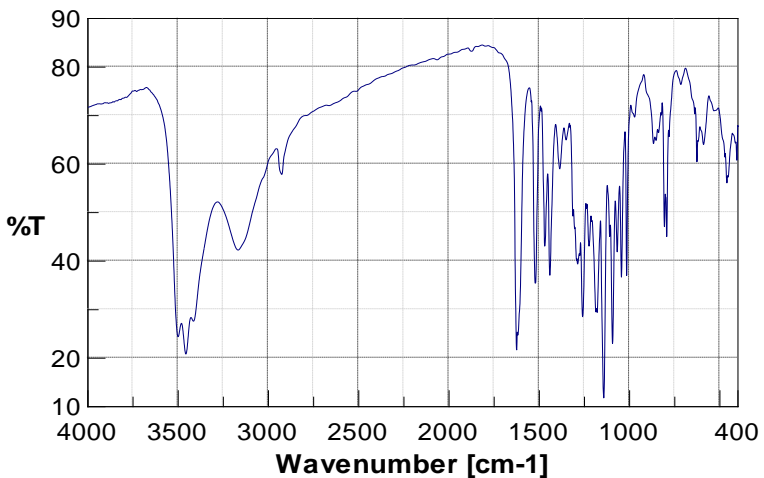
Berdasarkan percobaan di atas, dapat disimpulkan bahwa senyawa **3** hasil isolasi relatif murni. Selanjutnya terhadap senyawa **3** hasil isolasi terlebih dahulu dilakukan identifikasi dengan menggunakan pereaksi FeCl_3 , dan hasil identifikasi ini menghasilkan warna biru-keunguan, yang memberi petunjuk bahwa senyawa **3** hasil isolasi adalah senyawa golongan fenolik. Pengukuran titik leleh terhadap senyawa **3** hasil isolasi adalah $248\text{ }^\circ\text{C}$ - $249\text{ }^\circ\text{C}$, dengan jarak titik leleh yang kecil dari $2\text{ }^\circ\text{C}$ dan didukung oleh hasil analisis kromatografi lapisan tipis yang menunjukkan bahwa senyawa **3** hasil isolasi relatif murni dan siap dilakukan analisis spektroskopi.

Selanjutnya penentuan struktur senyawa **3** hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer Inframerah (IR), Massa (MS), *Nuclear Magnetic Resonance* (^{13}C -NMR dan ^1H -NMR), *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* (DEPT), ^1H - ^{13}C *Heteronuclear*

Multiple Quantum Coherence (HMQC) dan ^1H - ^1H *Homonuclear Correlated Spectroscopy (COSY)* serta ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity (HMBC)*.

8.3.1 Spektroskopi inframerah senyawa 3

Data spektrum inframerah menunjukkan adanya serapan yang khas dan tajam pada beberapa panjang gelombang. Hasil identifikasi spektrum inframerah senyawa **3** hasil isolasi diperlihatkan pada Gambar 35 di bawah ini.



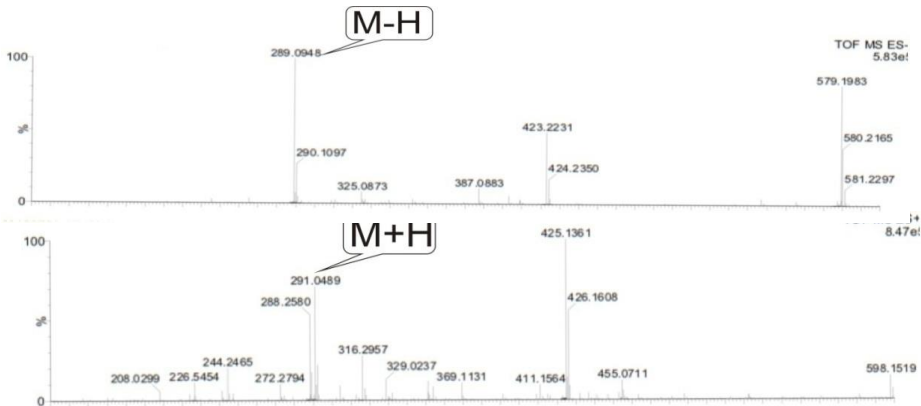
Gambar 35. Spektrum inframerah senyawa **3**

Spektrum inframerah menunjukkan adanya pita-pita serapan untuk gugus hidroksil ($\nu_{\text{maks}} 3417 \text{ cm}^{-1}$), gugus =C-H ($\nu_{\text{maks}} 3125 \text{ cm}^{-1}$), gugus -C-H ($\nu_{\text{maks}} 2920$ dan 2854 cm^{-1}), gugus C=C aromatis ($\nu_{\text{maks}} 1609$; 1514 dan 1458 cm^{-1}), dan gugus C-O eter ($\nu_{\text{maks}} 1189 \text{ cm}^{-1}$). Data di atas memperkuat usulan jika senyawa **3** (Y3) merupakan golongan flavonoid.

Berdasarkan analisis di atas dapat disarankan bahwa senyawa **3** hasil isolasi memiliki cincin benzena, yang mengandung substituen hidroksi serta memiliki rantai karbon alifatik dari jembatan propana, pola seperti ini menunjukkan senyawa **3** hasil isolasi merupakan suatu kerangka flavonoid (Santoni, 2009).

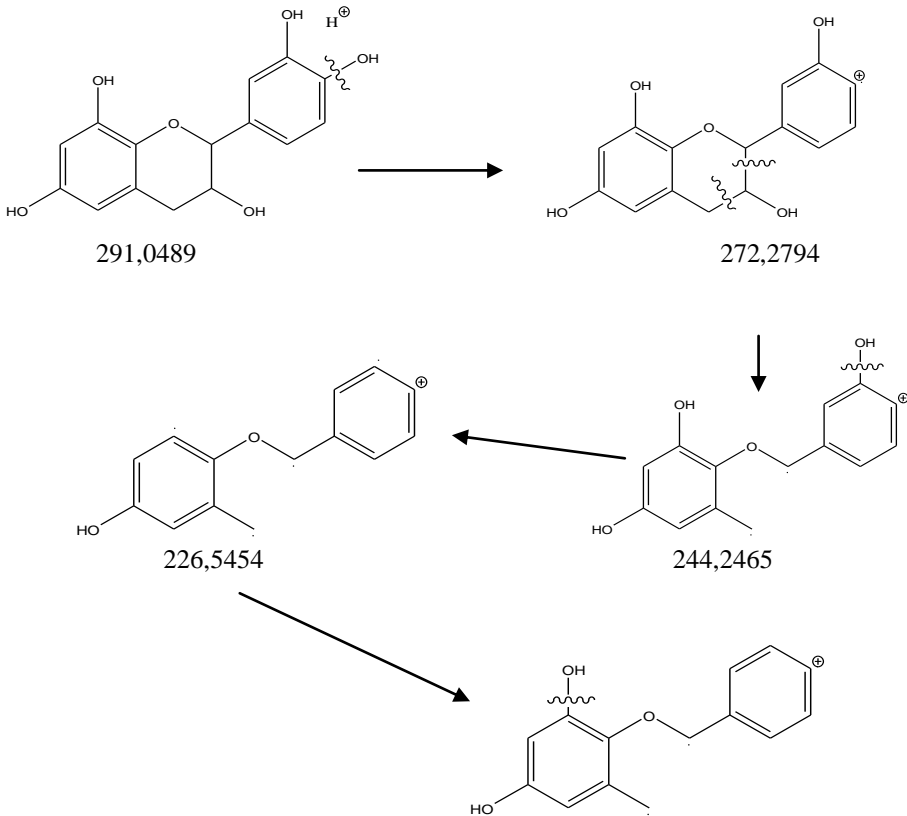
8.3.2 Spektroskopi massa senyawa **3**

Spektrum massa dari senyawa **3** dilakukan dengan metode *high resolution* TOF MS (*Time of Flight Mass Spectroscopy*) diberikan pada Gambar 36 di bawah ini.



Gambar 36. Spektroskopi massa TOF ES- (atas) dan TOF ES+ (bawah) senyawa **3**

Spektrum TOF ES- memperlihatkan puncak pada 289,0948 yang menunjukkan ion molekul [M-H] dan TOF ES+ memberikan puncak pada 291,0489 yang menunjukkan ion molekul [M+H]. Kedua spektrum di atas menunjukkan bahwa massa molekul senyawa **3** hasil isolasi adalah 290,1027. Massa molekul ini mendekati dari rumus molekul $C_{15}H_{14}O_6$ yang mempunyai massa molekul 290,0790. Dengan demikian, senyawa **3** (Y3) merupakan senyawa flavonoid yang mempunyai rumus molekul $C_{15}H_{14}O_6$. Pola fragmentasi pada TOF ES+ menunjukkan fragmen 272,2794 ; 244,2465 ; 226,5454 dan 208,0299 sehingga usulan fragmentasi senyawa **3** hasil isolasi sebagaimana tercantum pada Gambar 37 berikut ini.

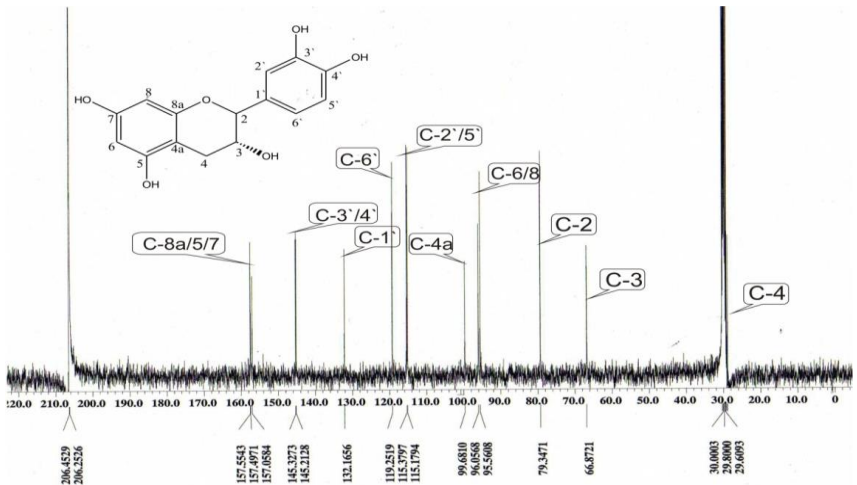


Gambar 37. Pola fragmentasi senyawa 3

8.3.3 Spektroskopi ^{13}C -NMR (^{13}C -Nuclear Magnetic Resonance) Senyawa 3

Spektrum ^{13}C -NMR dan data pergeseran kimia senyawa 3 hasil isolasi menggunakan CDCl_3 dengan frekuensi 100 MHz menunjukkan 15

sinyal karbon, Spektrum ^{13}C -NMR dapat dilihat pada Gambar 38 dibawah ini.



Gambar 38. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa **3** flavonoid hasil isolasi

Spektrum ^{13}C -NMR memperlihatkan 15 atom karbon yang terdiri tiga karbon sp^3 merupakan jembatan propana dan dua belas karbon sp^2 yang merupakan cincin aromatik, sehingga data ini mendukung sistim $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ yang merupakan ciri khas dari kerangka dasar senyawa flavonoid.

Ketiga atom karbon sp^3 tersebut muncul pada pergeseran kimia 79,3 ppm untuk C-2 (-CH-O-), pergeseran kimia 66,8 ppm untuk C-3 (-CH-O-H) dan pergeseran kimia 29,6 ppm untuk C-4 (-CH₂-), pergeseran kimia tersebut

diatas merupakan ciri khas untuk struktur flavan-3-ol. Sedangkan dua belas karbon sp^2 yang merupakan karbon dari cincin aromatik muncul pada pergeseran kimia 95,5 sampai dengan 157,5 ppm.

Berdasarkan analisis spektrum ^{13}C -NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa **3** merupakan suatu senyawa yang memiliki dua cincin benzena yang dihubungkan dengan tiga atom karbon atau dikenal senyawa flavonoid. Dengan demikian analisis ini mendukung senyawa **3** suatu flavonoid. Data pergeseran kimia ^{13}C -NMR senyawa **3** hasil isolasi pada Tabel 9 di bawah ini.

Tabel 9. Data pergeseran kimia ^{13}C -NMR senyawa **3** flavonoid hasil isolasi

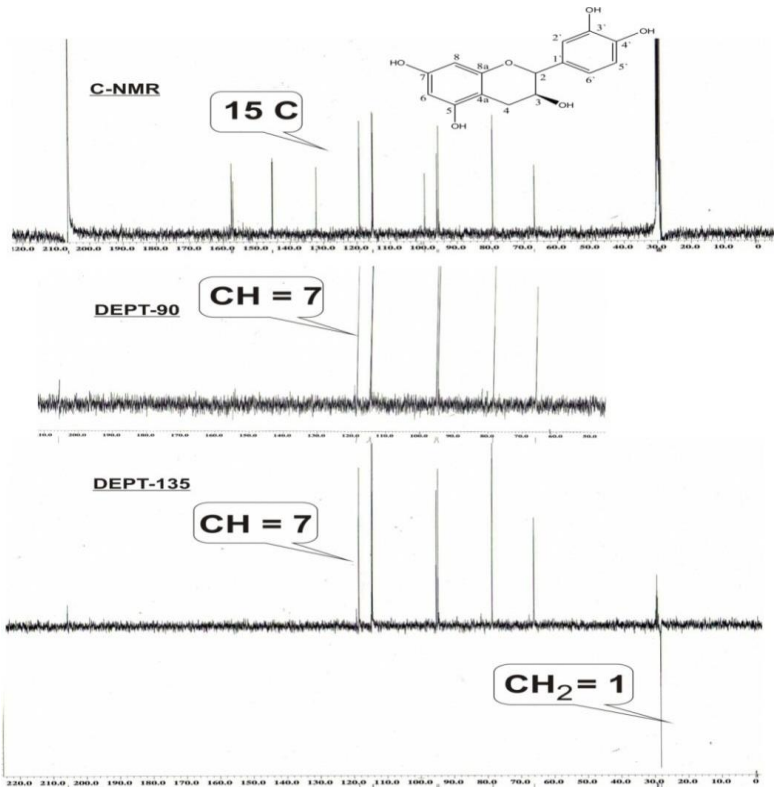
C	Pergeseran kimia	Jenis	C	Pergeseran kimia	Jenis
2	79,3	-CH-O-	8	96,0	CH(aromatis)
3	66,8	-CH-OH	8a	157,5	>C<
4	29,6	-CH ₂ -	1'	132,1	C(aromatis)
4a	99,6	>C<	2'	115,1	CH(aromatis)
5	157,4	C(aromatis)	3'	145,6	C(aromatis)
6	95,6	CH(aromatis)	4'	145,7	C(aromatis)
7	145,3	C(aromatis)	5'	115,3	CH(aromatis)
			6'	119,2	CH(aromatis)

8.3.4. Spektroskopi DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) senyawa 3

Spektrum NMR karbon DEPT dilakukan pada frekuensi 90 dan 135 MHz dari senyawa 3 flavonoid hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 35, data distribusi jumlah CH, CH₂ dan CH₃ dipaparkan pada Tabel 10 dan Gambar 39 di bawah ini.

Tabel 10. Data distribusi karbon CH₂ dan CH senyawa 3 Flavonoid

Karbon CH/CH ₃ (peak keatas)			Karbon CH ₂ (peak kebawah)	
C	Pergeseran kimia (ppm)		C	Pergeseran kimia (ppm)
2	79,3	CH (C-O-)	4	29,6 CH ₂
3	66,8	CH (C-OH)	Jumlah karbon dapat dihitung sebagai berikut :	
6	95,6	CH (aromatis)	CH ₂ (DEPT 135) = 1	
8	96,0	CH (aromatis)	CH (DEPT 90 dan DEPT 135) = 7	
2'	115,1	CH (aromatis)	Total C (¹³ C-NMR) = 15	
5'	115,3	CH (aromatis)	Maka C, kuartener = 15 - (7+1) = 7	
6'	119,2	CH (aromatis)		



Gambar 39. Spektrum ^{13}C -NMR, DEPT 90 dan 135 dari senyawa 3

Dari spektrum DEPT pada frekuensi 135 MHz satu sinyal muncul menghadap kebawah dengan pergeseran kimia sebesar 29,6 ppm, sinyal ini merupakan sinyal dari CH_2 dengan demikian senyawa ini memiliki satu gugus CH_2 . Selanjutnya percobaan DEPT pada frekuensi 90 MHz di temukan tujuh sinyal CH. Ketujuh sinyal tersebut terdiri dari lima sinyal CH pada

cincin aromatik dengan pergeseran kimia 95,2 - 119,2 ppm dan dua sinyal lagi merupakan sinyal dari CH cincin alifatik yaitu pada pergeseran kimia 66,8 – 79,3 ppm.

Berdasarkan data spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ diketahui bahwa terdapat 15 sinyal karbon, tetapi sinyal tersebut hanya delapan karbon yang muncul pada DEPT 135 dan DEPT 90 sehingga terdapat tujuh karbon pada pergeseran 132,1 ppm hingga 157,5 ppm yang tidak muncul pada DEPT 135 dan DEPT 90. Tujuh karbon ini ditetapkan sebagai karbon aromatis tersubstitusi.

Berdasarkan analisis spektrum DEPT dan $^{13}\text{C-NMR}$ maka dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid yang ditemukan memiliki lima belas atom karbon dengan satu gugus CH_2 , tujuh gugus CH yang terdiri dari lima CH aromatis dan dua CH alifatis dan memiliki tujuh karbon kuartener. Berdasarkan analisis tersebut maka kelima substituen hidroksi yang terdapat pada flavonoid hasil isolasi, 4 substituen berada pada cincin aromatis yang terdistribusi masing-masing 2 substituen pada cincin A dan B dan satu substituen pada rantai propana.

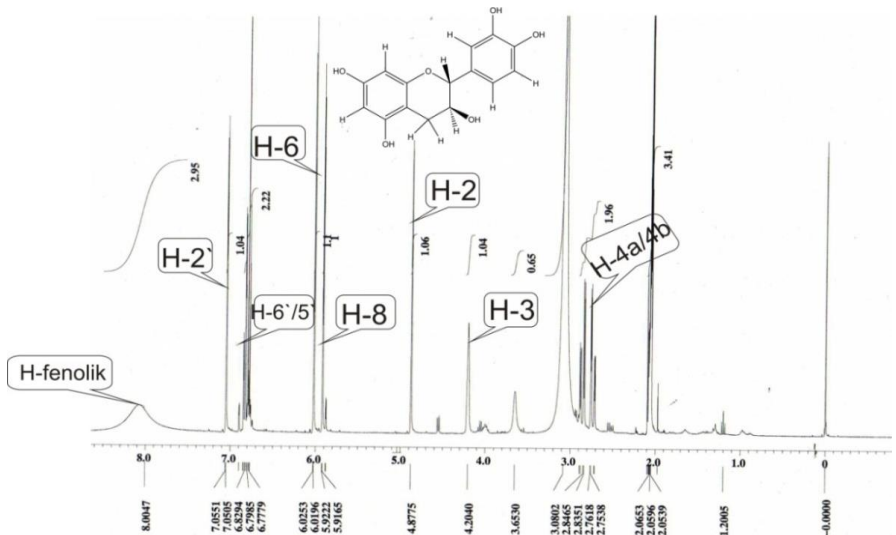
8.3.5. Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$) Senyawa 3

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ dari senyawa 3 flavonoid hasil isolasi dengan menggunakan pelarut aseton- D_6 pada frekuensi 400 MHz dapat dilihat pada

Gambar 40 serta data pergeseran kimianya ditunjukkan pada Tabel 11 di bawah ini.

Tabel 11. Pergeseran kimia senyawa **3** flavonoid hasil isolasi

H	δ ,pp m	Keterangan	H	δ ,pp m	Keterangan
H-2	4,87	S	H-8	5,92	d, J = 2,2 Hz
H-3	4,20	S	H-2'	7,05	d, J = 1,8 Hz
H-4 β	2,86	dd, J= 3,2 ; 16,2 Hz	H-5'	6,78	d, J = 8,3 Hz
H-4 α	2,73	dd, J= 4,5 ; 16,2 Hz	H-6'	6,83	dd, J = 1,8 ; 8,3 Hz
H-6	6,02	d, J= 2,2 Hz	OH	8,03	s (melebar)



Gambar 40. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa **3**

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ menunjukkan adanya sinyal proton alifatis yang munculnya pada pergeseran kimia, δ 4,87 (1H, d, $J = 8,3$ Hz,) merupakan satu proton yang terikat pada C-2, pergeseran kimia, δ 4,20 (1H, s , H-3) satu proton yang terikat pada C-3 dan pada pergeseran kimia δ 2,74 (1H dd, $J = 3,2 ; 16,2$ Hz) & 2,85 (1H, dd, $J = 4,5 ; 16,2$ Hz) terdapat dua proton yang terikat pada C-4 yaitu H-4 α dan H-4 β . Ditemukannya sinyal tersebut di atas pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ merupakan ciri khas dari senyawa flavonoid yaitu suatu turunan flavan-3-ol, masing-masing untuk resonansi proton H-2, H-3, H-4 α dan H-4 β (Lawrence, 1994, Markham, 1994).

Spektrum ini juga memperlihatkan dua sinyal pada pergeseran kimia δ 6,02 (1H, d, $J = 2,2$ Hz) dan pergeseran kimia δ 5,91 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), dari nilai pergeseran kimia diketahui bahwa kedua sinyal ini merupakan sinyal dari dua proton aromatis. Adanya nilai $J = 2,2$ Hz menunjukkan bahwa kedua proton aromatis berorientasi meta yaitu H-6 dan H-8, dengan demikian posisi substituen dua gugus hidroksi juga berorientasi meta yaitu pada C-5 dan C-7 pada cincin A. Analisis selanjutnya terhadap Spektrum $^1\text{H-NMR}$ memperlihatkan tiga sinyal proton aromatik dengan sistem spin AMX pada δ 6,78 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5'), δ 6,83 (1H, dd, $J = 2,0$ dan 8,3 Hz, H-6'), data ini menunjukkan bahwa pada cincin B ada dua proton berorientasi orto ditandai dengan nilai $J = 8,3$ Hz dan satu proton lainnya berorientasi meta, ditandai dengan adanya nilai $J = 2,0$ Hz.

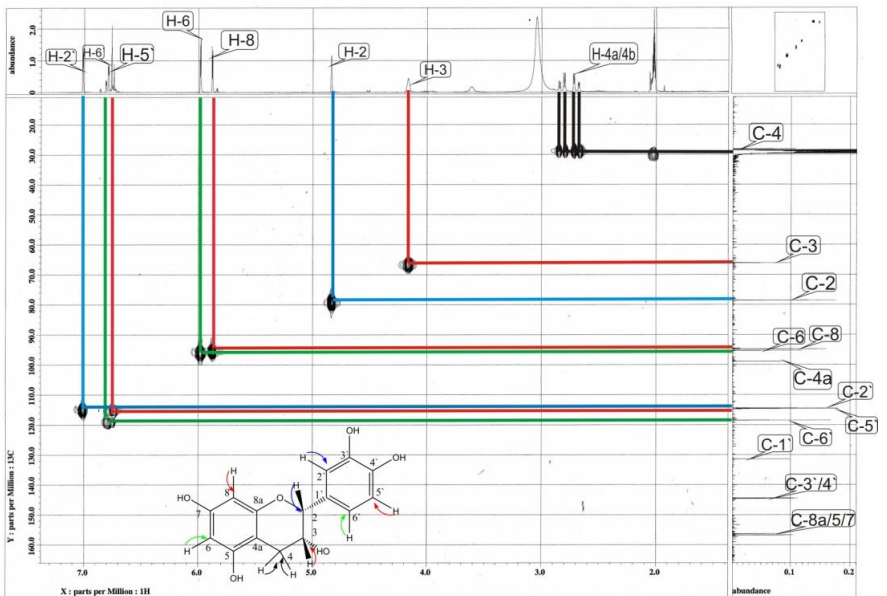
Berdasarkan uraian tersebut diatas maka pada cincin A dari senyawa flavonoid hasil isolasi masing-masing memiliki dua proton aromatis yang terletak pada posisi H-6 dan H-8 dengan demikian senyawa ini memiliki dua substituen hidroksi yang berada pada posisi C-5 dan C-7. Selanjutnya untuk cincin B dari senyawa flavonoid hasil isolasi memiliki 3 proton aromatis yang berada pada posisi H-2', H-5' dan H-6' dengan demikian senyawa **3** juga memiliki dua substituen hidroksi yang berada pada atom C-3' dan C-4'. Mempedomani analisis spektrum $^1\text{H-NMR}$ tersebut maka senyawa **3** flavonoid hasil isolasi tersebut merupakan senyawa epikatekin.

8.3.6. Spektroskopi HMQC (^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) senyawa **3**

Spektrum ^1H - ^{13}C - NMR HMQC dari senyawa **3** flavonoid hasil isolasi menunjukkan adanya korelasi antara proton dan karbon seperti yang terlihat pada Gambar 41, dan data korelasi proton dan karbon senyawa **3** flavonoid hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 12. dibawah ini.

Tabel 12. Data korelasi proton dan karbon senyawa **3** flavonoid hasil isolasi

Posisi C	Pergeseran kimia (δ , ppm)	Posisi H	Pergeseran
			kimia(δ , ppm)
C-2	79,3	H-2	4,87
C-3	66,8	H-3	4,20
C-4	29,6	H-4 α	2,73
		H-4 β	2,86
C-6	95,6	H-6	6,02
C-8	96,0	H-8	5,92
C-2`	115,1	H-2`	7,05
C-5`	115,3	H-5`	6,78
C-6`	119,2	H-6`	6,83



Gambar 41. Spektrum HMQC senyawa 3

Spektrum HMQC, mengidentifikasi sinyal-sinyal karbon yang mengikat proton, sehingga data ini dapat memperkuat pola substitusi hidroksi dari flavan. Memperhatikan spektrum HMQC dari senyawa hasil isolasi dapat diketahui bahwa pada cincin C terdapat proton H-3 pada pergeseran kimia δ 3,95 ppm berkorelasi dengan C-3 pada pergeseran kimia δ 68,3 ppm, selanjutnya proton H-2 pada pergeseran kimia δ 4,57 ppm berkorelasi dengan C-2 pada pergeseran kimia δ 82,7 ppm. Selanjutnya pada cincin A terdapat korelasi antara H-6 pada δ 6,03 ppm dengan C-6 pada δ

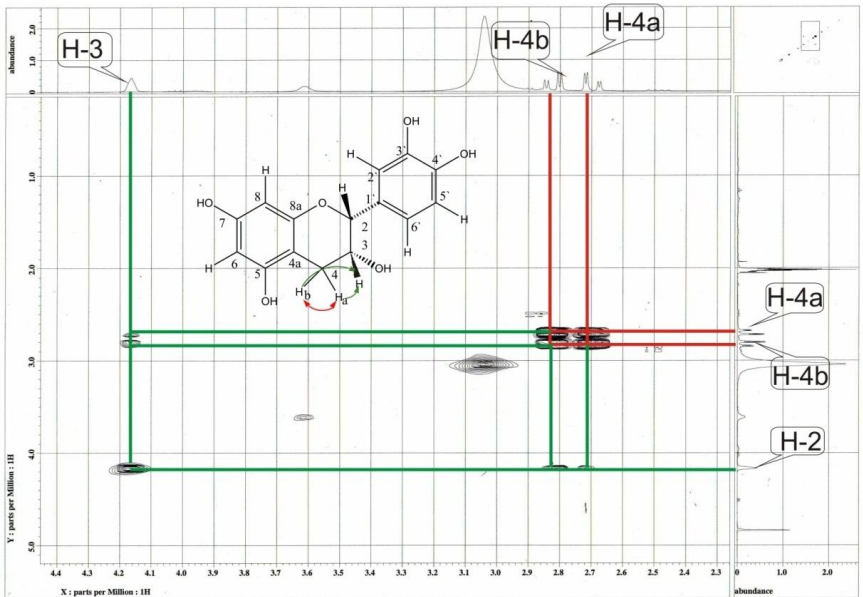
96,1 ppm serta korelasi antara H-8 pada pergeseran kimia δ 5,88 ppm dengan C-8 pada pergeseran kimia δ 96,0 ppm .

Pada cincin B korelasi terjadi antara H-6' pada pergeseran kimia 6,77 ppm dengan C-6' pada pergeseran kimia δ 115,2 ppm dan korelasi antara H-2' pada pergeseran kimia δ 6,81 ppm dengan C-2' pada pergeseran kimia δ 115,7 ppm dan korelasi antara H-5' pada pergeseran kimia δ 6,90 dengan C-5' pada pergeseran kimia δ 120,1 ppm.

Analisis data spektrum HMQC tersebut di atas memberikan informasi bahwa cincin C memiliki proton pada C-2 dan C-3 dan untuk cincin A terdapat proton pada C-6 dan C-8 serta cincin B terdapat proton pada C-2', C-5' dan C-6'. Dengan mempedomani data spektrum HMQC tersebut, mendukung usulan bahwa senyawa **3** hasil isolasi merupakan senyawa 5, 7, 3', 4' – tetrahidroksiflavan - 3 β –ol yang dikenal dengan nama epikatekin.

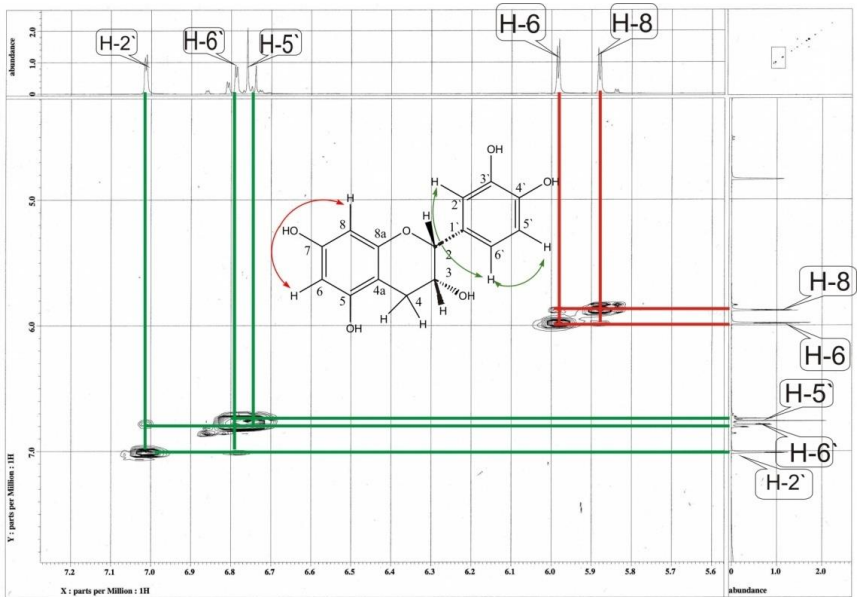
8.3.7. Spektroskopi COSY (¹H-¹H *Homonuclear Correlated Spectroscopy*) senyawa **3**

Spektrum COSY pada daerah pergeseran 3,1 - 5,5 ppm dari senyawa **3** hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 42 di bawah ini.



Gambar 42. Spektrum $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (2,3-4,4) senyawa **3**

Spektrum COSY pada daerah pergeseran kimia 2,3-4,4 ppm dari senyawa **3** hasil isolasi adanya korelasi antara proton H-4a dengan H-4b dan korelasi juga terjadi antara H-4a dan H-4b dengan H-3. Selanjutnya proton H-3 berkorelasi dengan proton H-3 hal ini menjelaskan bahwa proton H-4a dan H-4b berdekatan dengan H-3. Spektrum $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY pada pergeseran 5,6-7,2 ppm dari senyawa **3** hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 43 dibawah ini.

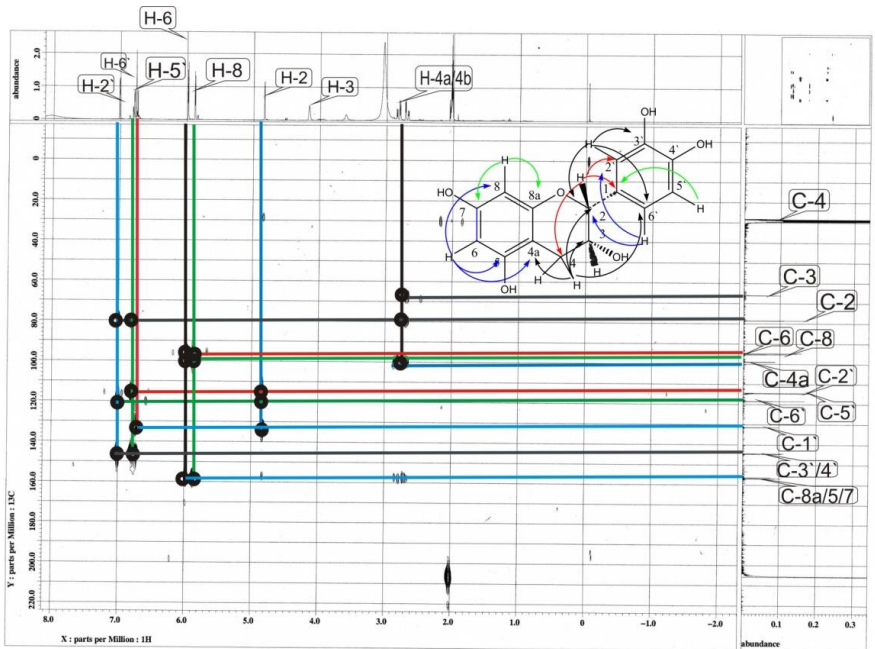


Gambar 43. Spektrum ^1H - ^1H COSY pada pergeseran 5,6-7,2 ppm senyawa **3**

Spektrum COSY pada daerah pergeseran kimia 5,6 - 7,2 ppm dari senyawa **3** hasil isolasi memperlihatkan korelasi yang terjadi pada cincin aromatis. Dari spektrum di atas menunjukkan adanya korelasi antara proton H-6 dengan H-8 pada cincin A, sedangkan pada cincin B terjadi dua korelasi yaitu antara proton H-5' dengan H-6', hal ini menunjukkan bahwa H-5' dan H-6' berdekatan dan korelasi jauh antara H-2' dan H-6'. Berdasarkan analisis COSY menunjukkan bahwa senyawa **3** tersebut merupakan epikatekin.

8.3.8. Spektroskopi HMBC (^1H - ^{13}C Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) senyawa 3

Spektrum HMBC senyawa 3 flavonoid hasil isolasi dengan pergeseran kimia δ 0.0- 7.0 ppm dapat dilihat pada Gambar 44 di bawah ini.



Gambar 44. Spektrum HMBC senyawa 3

Spektrum HMBC memberikan informasi tentang letak proton terhadap karbon mempelajari korelasi yang terjadi sepanjang dua atau tiga

ikatan antara proton dan karbon sehingga dapat diketahui pola substitusi struktur flavonoid hasil isolasi. Spektrum yang ditampilkan pada gambar diatas menunjukkan terdapat korelasi antara proton H-2 dengan C-1', C-4 dan C-2', sementara proton H-4 α dan H-4 β berkorelasi dengan C-4a, C-3, C-2 dan C-4'. Selanjutnya proton H-6 berkorelasi dengan C-4a, C-5 dan C-8. Pada cincin yang sama juga terjadi korelasi pada proton H-8 dengan C-7 dan C-8a. Pada proton H-1' terjadi korelasi dengan C-2, C-3' dan C-6'. Selanjutnya proton korelasi juga terjadi pada proton H-5' dengan C-1' dan korelasi proton H-6' dengan H-2 dan H-2'.

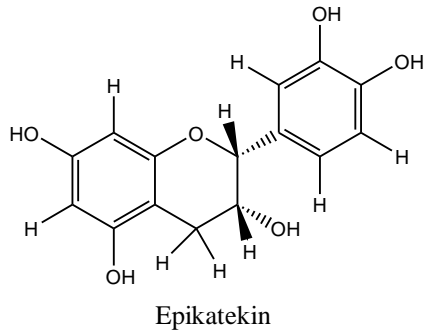
Berdasarkan analisis tersebut di atas spektrum HMBC mendukung bahwa senyawa hasil isolasi merupakan epikatekin. Selanjutnya untuk mendukung analisis spektroskopi terhadap senyawa hasil isolasi di atas dan senyawa ini merupakan senyawa yang udah dikenal, maka dilakukan perbandingan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dan $^1\text{H-NMR}$ dengan senyawa epikatekin yang dilaporkan oleh Muharni (2009) seperti terlihat pada Tabel 13 berikut ini.

Tabel 13. Perbandingan data ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR senyawa **3** hasil isolasi dengan epikatekin

C	^{13}C -NMR (ppm)		H	^1H -NMR (ppm)	
	Senyawa 3	epikatekin		Senyawa 3	Epikatekin
2	79,3	80,0	2	4,87	4,82
3	66,8	67,6	3	4,20	4,18
4	29,6	29,4	4 α	2,73	2,74
			4 β	2,86	2,85
4a	99,6	100,0			
5	157,0	157,5			
6	95,6	95,6	6	6,02	5,94
7	157,4	157,8			
8	96,0	96,4	8	5,92	5,91
8a	157,5	158,1			
1`	132,1	132,4			
2`	115,1	115,4	2`	7,05	6,97
3`	145,6	146,1			
4`	145,7	145,9			
5`	115,3	116,0	5`	6,78	6,75
6`	119,2	119,5	6`	6,83	6,78

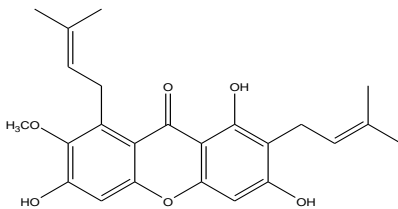
Dari Tabel 13 di atas diketahui bahwa spektrum ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR senyawa **3** hasil isolasi identik dengan senyawa epikatekin seperti yang dilaporkan oleh muharni (2009). Dengan demikian data tersebut mendukung

pengusulan senyawa **3** hasil isolasi merupakan senyawa flavonoid dengan nama epikatekin

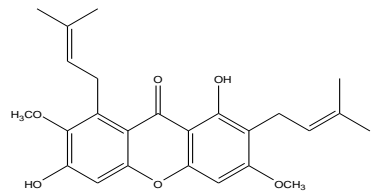


IX. Senyawa metabolit sekunder dari *Garcinia cymosa*

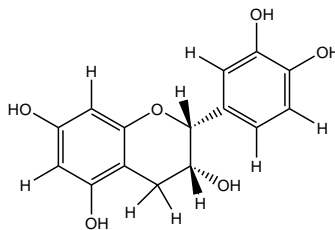
Berdasarkan data yang diperoleh (melewati tahapan taksonomi, ekstraksi, fraksinasi, pemisahan dan pemurnian) maka telah diisolasi dan dielusidasi struktur senyawa metabolit sekunder dari kulit batang *Garcinia cymosa*. Senyawa-senyawa metabolit sekunder tersebut yaitu:



α -mangostin



β -mangostin



Epikatekin

DAFTAR PUSTAKA

- Ainiyah, Nurul dan Ersam, Taslim. Tiga Turunan Santon Dari Kulit Batang Mundu *Garcinia Dulcis* (Roxb). Kurz. Sebagai Antioksidan. Seminar Nasional Kimia VIII. 2006.
- ^aMuharni; Supriyatna; Bahti, Husein H; dan Dachariyanus. Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenol dari Manggis Hutan (*Garcinia bancana* Miq.). Jurnal Penelitian Sains. 2009. 12(3C). 12307(1-3)
- ^bMuharni; Supriyatna; Bahti, Husein H; dan Dachariyanus. Tetraoksigenasi Santon dari Kulit Batang *Garcinia nigrolineata*. Jurnal Ilmu Dasar. 2009. 10(1). 18-21
- Chan, G. 6-[(E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]-5,7-dihydroxy-8-(2-methylbutanoyl)-4-phenyl-2H-chromen-2-one from *Mesua kunstleri* King (Kosterm). organic compounds Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online ISSN 1600-5368. University of Malaya: Malaysia. 2009.
- Chaverri, Jose Pedraza; Rodriquez, Noemí Cardenas; Ibarra, Marisol Orozco; Rojas, Jazmin M. Perez. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). Review. Food and Chemical Toxicology. Elsevier. 2008. 46. 3227–3239
- Chen, Lih-Geeng; Yang, Ling-Ling; Wang, Ching-Chiung. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. Sciencedirect. Food and Chemical Toxicology. 2007. 1-6
- Chen, Yu; Fan, Hua; Yang, Guang-zhong, Jiang, Yan; Zhong, Fang-fang dan He, Hong-wu. Prenylated Xanthenes from the Bark of *Garcinia xanthochymus* and Their 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activities. Molecules. 2010, 15, 7438-7449
- Chumaidah, N.F dan Ersam, T. *Isolasi dan Senyawa Kumarin dari Fraksi Polar pada Ekstrak Etil Asetat Garcinia balica* Miq. (Mundu Alas). ITS. Surabaya. 2006.

- Dinas Pertanian. *Bidang Pendayagunaan dan Pemasarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Manggis*. Ristek. Jakarta. 2010.
- Ee, G.C.L; S.H. Ng; Goh, J.K; Sukari, M.A. dan Rahmani, M. Chemical Constituents of *Garcinia parvifolia* (Guttiferae). *Malaysian Journal of Science*. 2009. 28 (1). 105-110
- Elfita, Dachriyanus, Supriyatna dan Bahti, Husein H. Studi Hubungan Struktur dan Aktivitas Senyawa Antioksidan dari Kulit Batang Kandis Gajah (*Garcinia griffithii* T. Anders). 2011. 9(1). 35-39.
- Elya, Berna; Hanafi, Muhammad; Mustika, Ika; dan Rahmawati, Santi. Xanton Dari Kulit Batang *Garcinia nervosa* Miq. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 2007. 6(2), 1-3.
- Ersam, T. 2005. "Pemberdayaan Keanekaragaman Hayati Hutan Tropika : Fenolat Terprenilasi dari *Artocarpus* dan *Garcinia* (Nangka dan Manggis)", Prosiding Seminar Nasional Kimia, Universitas Negeri Surabaya. Surabaya, hal. 22-23
- Hartati, S dan Ersam, T. *Dua senyawa 4-fenilkumarin pada fraksi nonpolar dari ekstrak etil asetat batang Garcinia Balica* Miq. (Mundu Alas). ITS. Surabaya. 2006.
- Hartati,Sri; Kosela, Soleh; Harrison, Leslie, J. A New Pyrano Xanthone from the Stem Barks of *Garcinia tetrandra* Pierre. *Journal of Biological Sciences*. 2008. 8(1). 137-142
- Indarti, Reni. Santon Dan Biflavonoid Dari Kulit Kayu Batang *Garcinia Xanthochymus* (Asam Kandis) Dan Aktivitas Antimalaria. Tesis. 2009.
- Ito, C., Itoigawa, M., Takakura, T., Ruangrunsi, N., Enjo, F., Tokuda, H., Nishino, H., and Furukawa, H. 2003. " Chemical Constituens of *Garcinia fusca* : Structure Elucidation of Eight New Xanthonesd and Chemopreventive Activity. *Journal of Natural Products* 66: 200-205.
- Lanang, A.M., Komguem, J., Ngninzeko, F.N., Tangmouo, J.G., Lonsi, D., Ajaz, A., Choudhary, M.I., Ranjit, R., Devkota, K.P., Sodengam, B.L.

- (2005). *Bangang xanthone A and B, two xanthones from the Stem bark of Garcinia poliantha Oliv., Phytochemistry*, 66, 2351-2355
- Lannang, A.M dkk. 2005. *Bangang xanthone A and B, two xanthones from the Stem bark of Garcinia polyantha Oliv. Phytochemistry*. 2005. 66. 2351-2355.
- Lukis, Prima Agusti dan Ersam, Taslim. *Dua Senyawa Mangostin dari Ekstrak n-heksana pada Kayu Akar Manggis (Garcinia mangostana, linn.) Asal kab. Nganjuk, Jawa Timur*. ITS. 2010. 1-10
- Mansyah, E. *Analisis variabilitas genetik manggis (Garcinia Mangostana L) di Jawa dan Sumatera Barat Menggunakan teknik RAPD*. UNPAD. Bandung. 2007.
- Mitchell, T.N., dan Costisella, B. 2007. *NMR From Spectra to Structures, an Experimental Approach. 2nd edition*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Mudjirahmini. D dan Ersam T. *4-Fenilkumarin pada Fraksi Polar Ekstrak Etil Asetat dari Batang Garcinia Balica Miq*. ITS. Surabaya. 2006.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., dan Vyvyan, J.R. 2009. *Introduction to Spectroscopy*. Saunders College. Philadelphia.
- Purwaningsih, Yulia dan Taslim, Ersam. *Senyawa Santon Sebagai Antioksidan dari Kayu Batang Garcinia tetranda Pierre*. Akta Kimindo. 2007. 2(2). 103 – 108
- Rashamuse, T. J. *Studies Towards The Synthesis of Novel, Coumarin-based HIV-1 Protease Inhibitors*. Department of chemistry Rhodes University. Grahamstown. 2008.
- Santoni, Adlis. 2009. *Elusidasi Struktur Flavonoid Triterpenoid Dari Kulit Batang Surian (Toona sinensis) Dan Identifikasi Minyak Atsiri Daun Surian Serta Uji Aktiivitas Insektisida*. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Andalas. Padang
- Sitorus, M. 2009. *Spektroskopi Elusidasi Struktur Molekul Organik*. Graha Ilmu. Yogyakarta.

Sukamat., Ersam, Taslim. 2006. Dua Senyawa Santon dari Kayu Batang Mundu *Garcinia Dulcis* Sebagai Antioksidan. Seminar Nasional Kimia VIII

Supratman, U. 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Widya Padjadjaran. Bandung.

Biografi Singkat Penulis



Antoni Pardede, Ph.D

Lulus S-1 di Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu pada tahun 2010, melanjutkan studi S-2 Kimia di Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat dan lulus pada tahun 2012. Melalui Program Beasiswa Monbukagakusho (MEXT) Jepang, mengikuti *Non-Degree Research Student* di Jurusan Kimia dan Ilmu Biomolekular Universitas Gifu, Jepang (Oktober 2014 - Maret 2015). Pada April 2015 sebagai mahasiswa Program Doktor (S-3) Jurusan Kimia dan Ilmu Biomolekular di Universitas Gifu Jepang, mendapatkan gelar Ph.D pada 25 Maret 2018. S-1, S-2 dan S-3 mengambil bidang keahlian dan penelitian Kimia Bahan Alam.



Dr. Yuliar, S.Pd., M.Si

Lulus D-3 di ATIP Padang pada tahun 1981 dan menyandang gelar sarjana muda (B.Sc) di bidang ilmu kimia. Selanjutnya Mendapatkan gelar S.Pd di Universitas Negeri Padang pada tahun 1996. Di Universitas Negeri Padang juga menyelesaikan Pendidikan pascasarjana (M.Si) pada tahun 2007. Beasiswa Pascasarjana (BPPs) DIKTI mengantarkan pada jenjang akademik S-3 (Dr) di bidang Ilmu Kimia di Universitas Andalas, Padang, Sumatera Barat, dengan bidang keahlian Kimia Bahan Alam. Saat ini mengabdikan diri sebagai Tenaga Pendidik di Program Studi Kimia Universitas Negeri Padang (UNP).



Rizaldi, S.Si., M.Si

Lulus S-1 (S.Si) tahun 2006 di program studi Kimia, FMIPA Universitas Negeri Padang (UNP). Melanjutkan pendidikan pascasarjana S-2 di Program Studi Kimia Universitas Andalas Padang, Sumatera Barat dan menyandang gelar (M.Si) Pada Tahun 2012. Keahlian/pemusatan dan Penelitian S-1 dan S-2 adalah Kimia Bahan Alam. Eksplorasi senyawa metabolit sekunder dari *Garcinia cymosa* merupakan proyek penelitian bersama dengan Antoni Pardede, Ph.D dan Dr. Yuliar, S.Pd., M.Si serta menjadi karya terbaik dan terakhirnya. Semoga buku ini bermanfaat bagi sesama dipergunakan sebagai rujukan untuk penelitian kimia bahan alam.

Penerbit:

Universitas Islam Kalimantan
Muhammad Arsyad Al Banjari

Jl. Adhyaksa No.2 Kayutangi,
Banjarmasin, Kalimantan Selatan
Telpon : 0511-3304352
FAX : 0511-3305834

ISBN 978-602-53367-5-1

