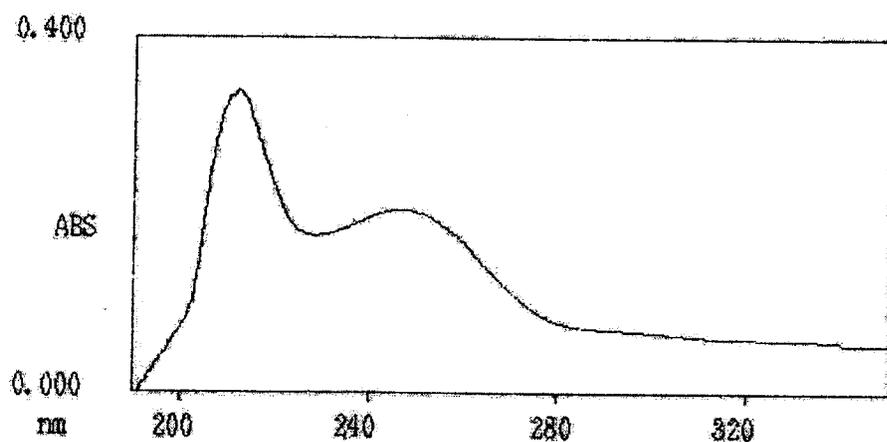


IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

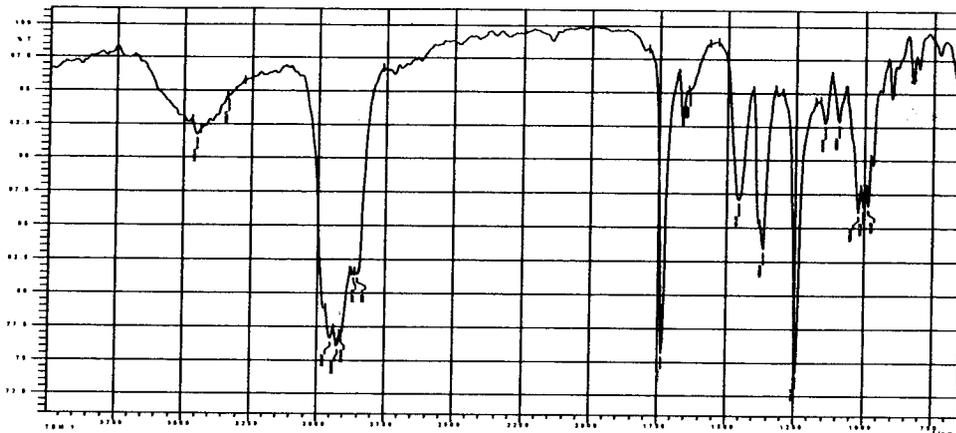
4.1. Hasil

Sebanyak 1,4 kg bubuk daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* diperoleh ekstrak total metanol sebanyak 77,2 gram. Ekstrak total metanol dilakukan fraksinasi dengan VLC di dapatkan fraksi heksana, fraksi etilasetat dan fraksi metanol. Ekstrak etilasetat dikromatografi kolom diperoleh lima fraksi yaitu F1, F2, F3, F4 dan F5, dari lima fraksi tersebut, fraksi F1 berupa padatan dan dilakukan kristalisasi diperoleh suatu kristal yang diberi kode TsM1 sebanyak 12,7 mg. Kristal TsM1 mempunyai titik leleh 188° -190°C. Harga Rf kristal TsM1 adalah 0,24 (heksan 100%); 0,75 (heksan:etilasetat = 8:2); 0,86 (heksan:etilasetat = 5:5).

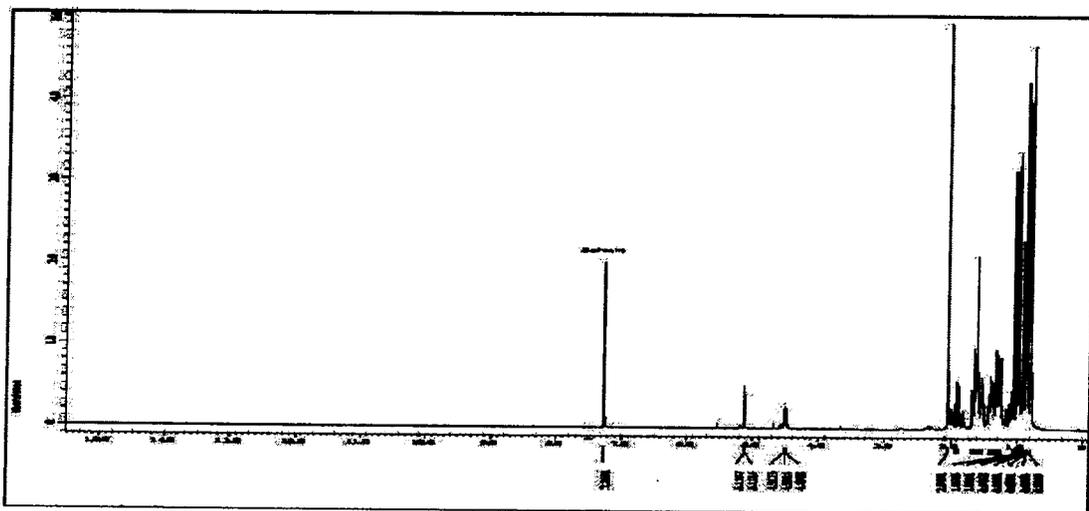
Hasil karakterisasi dengan spektrum UV, diketahui senyawa TsM1 menyerap pada panjang gelombang 212 nm dan 246 nm (Gambar 2). Dari data spektrum IR terjadi serapan pada bilangan gelombang: 3450 cm^{-1} , 3332 cm^{-1} , 2950 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} ; 2910 cm^{-1} ; 2867 cm^{-1} ; 2852 cm^{-1} ; 1734 cm^{-1} ; 1638 cm^{-1} ; 1454 cm^{-1} ; 1366 cm^{-1} ; 1244 cm^{-1} ; 1144 cm^{-1} ; dan 1095 cm^{-1} (Gambar 3).



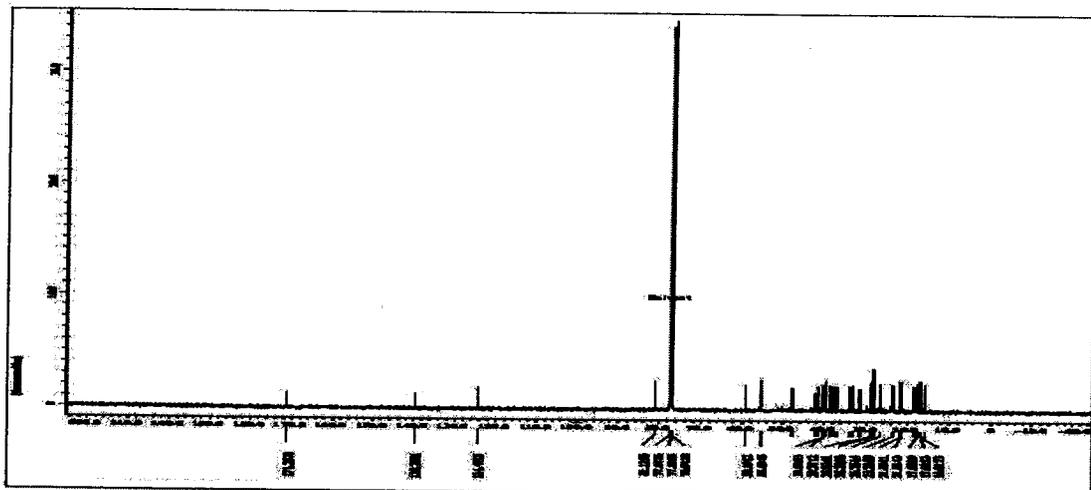
Gambar 2. Spektrum ultraviolet senyawa TsM1



Gambar 3. Spektrum inframerah senyawa TsM1



Gambar 4. Spektrum ^1H -NMR senyawa TsM1



Gambar 5. Spektrum ^{13}C -NMR senyawa TsM1

Tabel 1. Perbandingan data Pergeseran Kimia ^1H dan ^{13}C NMR senyawa TSM 1 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) ^1H dan ^{13}C NMR Senyawa Asam Oleanolat ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), Khajuria 2007

No	^{13}C NMR TSM 1	^{13}C Asam Oleanolat	^1H NMR TSM 1	^1H NMR Asam Oleanolat
1	38,8	38,9	1,55 ; 1,75	1,54 ; 1,72
2	28,6	27,6	1,79 ; 2,09	1,80 ; 2,13
3	81,1	77,6	-	3,47
4	40,1	38,9	1,30 ; 0,90	-
5	55,8	55,3	0,86	0,87
6	18,1	18,3	1,40 ; 1,62	1,39 ; 1,60
7	29,3	32,8	1,50 ; 1,85	1,57 ; 1,87
8	40,2	39,3	-	-
9	48,2	49,2	1,69	1,70
10	37,2	38,4	-	-
11	23,8	23,2	1,99 ; 2,09	1,98 ; 2,21
12	124,1	122,1	5,2	5,8
13	140,2	144,3	-	-
14	42,1	41,7	1,26 ; 1,41	-
15	27,2	27,8	2,00 ; 1,55	2,23 ; 1,55
16	23,9	23,3	2,06 ; 1,87	2,16 ; 1,96
17	48,2	47,6	-	-
18	40,6	41,3	-	3,33
19	42,6	46,2	1,31 ; 1,85	1,31 ; 1,86
20	29,3	30,5	1,37	-
21	34,3	36,9	0,89	1,71 ; 0,89
22	31,8	32,7	1,87 ; 1,85	1,97 ; 1,85
23	28,5	28,3	1,26	1,26
24	17,3	16,0	0,91	0,91
25	18,8	15,0	1,07	1,03
26	16,1	16,9	1,08	1,04
27	21,9	25,7	1,30	1,30
28	171,1	179,7	-	-
29	33,4	33,7	0,96	0,97
30	24,3	23,3	1,01	1,02
31	21,5	-	0,90 ; 2,02	-

Aktivitas antibakteri dari ekstrak total metanol dan hasil fraksinasinya dapat dilihat pada Tabel 2. Ekstrak total metanol dan hasil fraksinasinya tidak aktif sebagai antijamur.

Tabel 2. Diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak total metanol dan fraksinasinya

Sampel (100 µg)	Diameter daerah hambatan (mm)		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
F1	14	14	15
F2	9	9	7
F3	9	11	10
F4	16	12	16
F5	14	14	14
Ekstrak total	11	14	14
Antibiotik(streptomisin)	22	23	22

Hasil uji toksisitas yang telah dilakukan terhadap fraksi F1, F2, F3, F4 dan F5 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji toksisitas ekstrak total metanol dan fraksinasinya

Sampel	Jumlah udang yang mati pada konsentrasi:			LC ₅₀ (ppm)
	10 ppm	100 ppm	1.000 ppm	
Ekstrak total	4	9	22	248,9
F1	4	7	13	3012,6
F2	1	2	4	506990,7
F3	16	19	21	4,2
F4	5	20	25	70,2
F5	1	2	6	48582,7

Sebanyak 65 gram ekstrak total metanol dilakukan isolasi alkaloid dan diperoleh ekstrak alkaloid sebanyak 0.1364 gram. Ekstrak alkaloid ini setelah dikromatografi kolom diperoleh tiga fraksi yaitu A1, A2 dan A3. Fraksi A1 dan A2 dilakukan kromatografi kolom dengan fasa diam sephadex, didapatkan senyawa TsA1 sebanyak 3,0 mg dan TsA2 sebanyak 16 mg. Senyawa TsA1 dan TsA2 dikarakterisasi dengan spektroskopi IR, UV dan NMR.

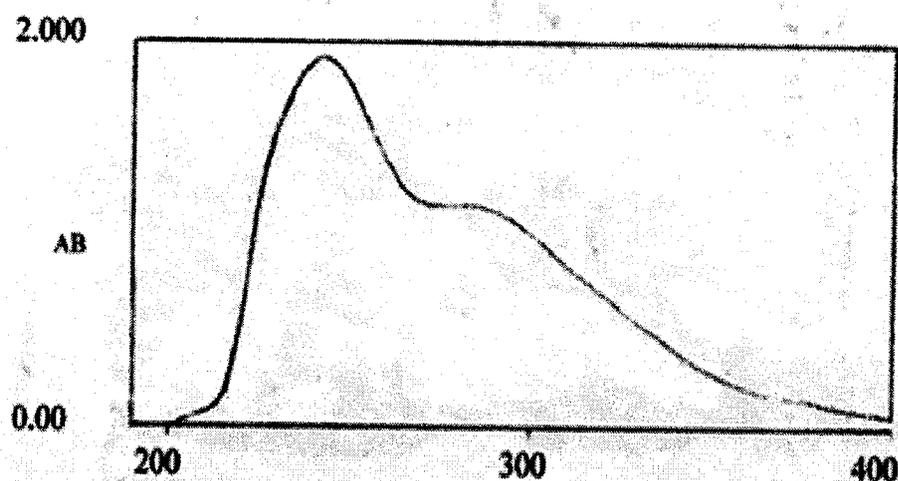
Hasil uji antimalaria yang telah dilakukan terhadap ekstrak total, crude alkaloid dan fraksi 1 dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji antimalaria ekstrak total, alkaloid total dan fraksinasinya

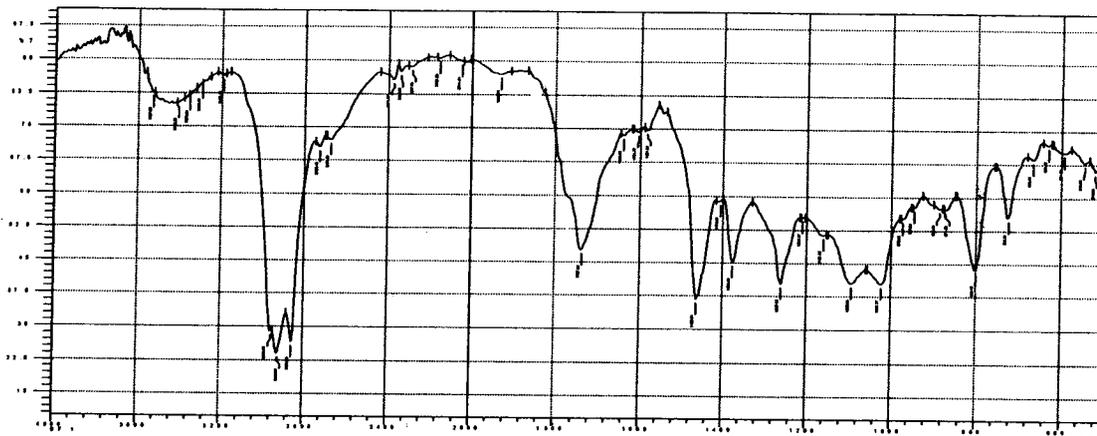
Sampel	RBC	Parasit	Skhizon	%Parasitemia	%Skhizon
Ekstrak total	726	20	4	2,75	25,49
Crude alkaloid	1093	33	8	3,01	24,24
Fraksi 1	540	16	5	2,96	31,25

Hasil uji antimalaria pada Tabel 4 menunjukkan bahwa persentase parasitemia dan persentase skhizon yang diperoleh tidak mencapai 10% atau 20 skhizon terhadap 200 parasit, sehingga pengujian tidak memenuhi persyaratan pengujian.

Karakterisasi dengan spektrokopi UV, senyawa TsA1 menyerap pada panjang gelombang 242 dan 281 nm (Gambar 6). Dari spektrum IR senyawa TsA1 terjadi serapan pada daerah 3408 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} , 2851 cm^{-1} , 1737 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1259 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} dan 1022 cm^{-1} . Senyawa TsA2 serapan spektrum IR terjadi pada daerah: 3487 cm^{-1} , 3340 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1759 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} dan 1043 cm^{-1} (Gambar 7). Spektrum $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) senyawa TsA1 memperlihatkan geseran kimia pada daerah δ_{H} 8,1 ppm; δ_{H} 4,7 ppm; δ_{H} 1,3 ppm; δ_{H} 1,2 ppm; δ_{H} 0,9 ppm; dan δ_{H} 0,8 ppm (Gambar 10)

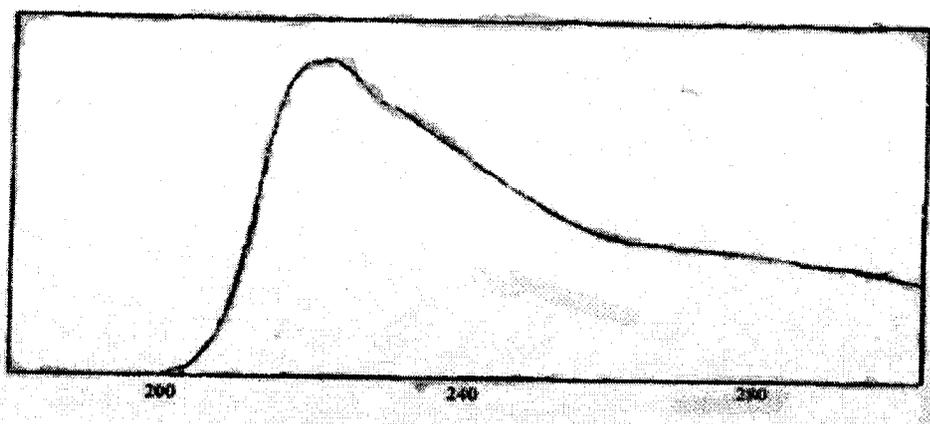


Gambar 6. Spektrum ultraviolet senyawa TsA1

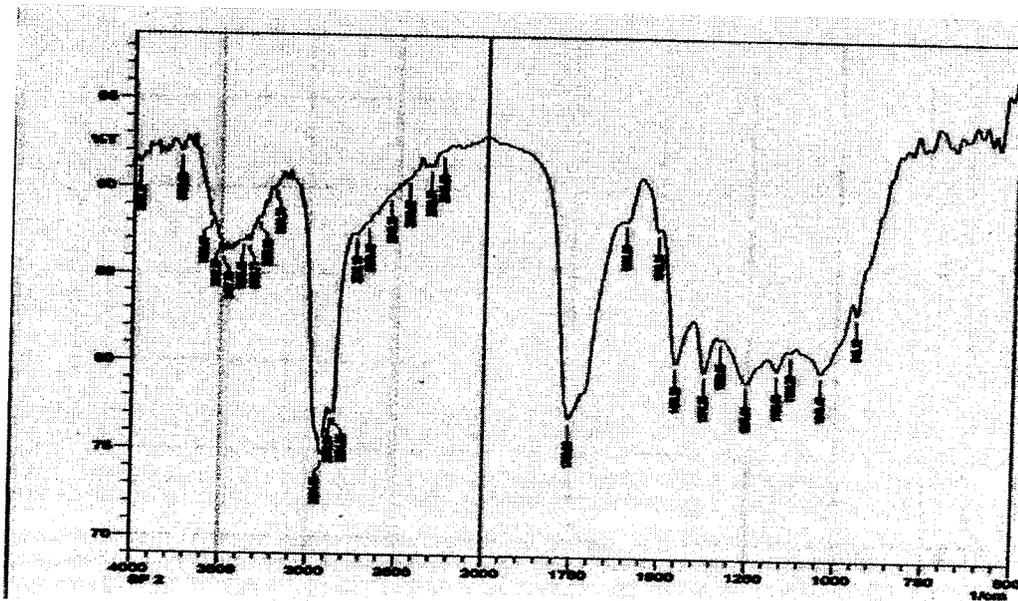


Gambar 7. Spektrum inframerah senyawa TsA1

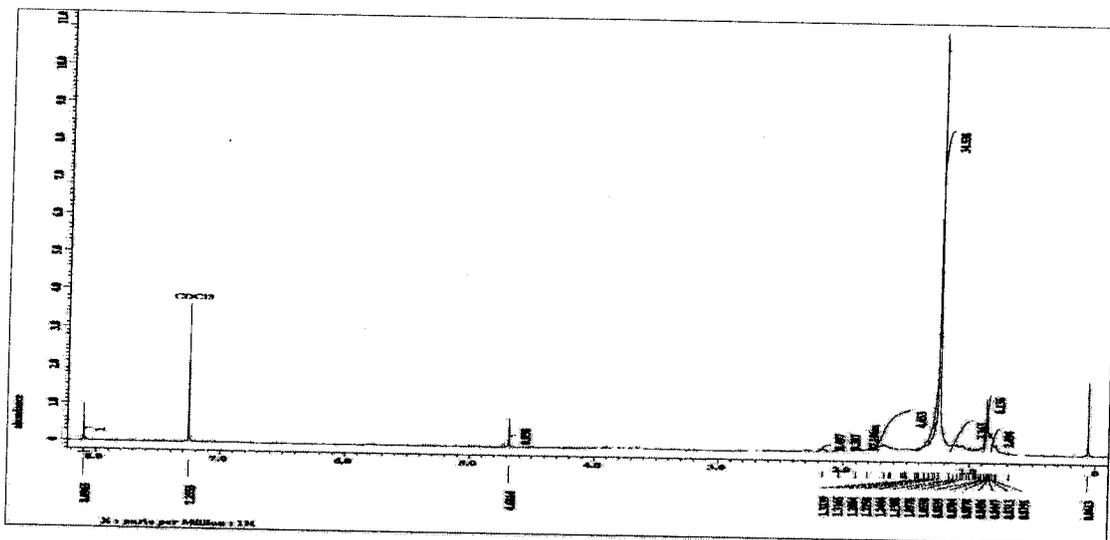
Karakterisasi dengan spektrokopi UV senyawa TsA2 terjadi serapan pada panjang gelombang 227 nm (Gambar 8). Dari spektrum IR senyawa TsA2 terjadi serapan pada daerah 3512 cm^{-1} , 3487 cm^{-1} , 3340 cm^{-1} , 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1759 cm^{-1} , 1456 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , dan 1043 cm^{-1} (Gambar 9). Spektrum $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) senyawa TsA2 memperlihatkan geseran kimia pada daerah δ_{H} 7,5ppm; δ_{H} 7,0 ppm; δ_{H} 3,9 ppm; δ_{H} 3,8 ppm; δ_{H} 3,7 ppm; δ_{H} 3,5 ppm; δ_{H} 1,3ppm; δ_{H} 0,9 ppm; dan δ_{H} 0,8 ppm (Gambar 11)



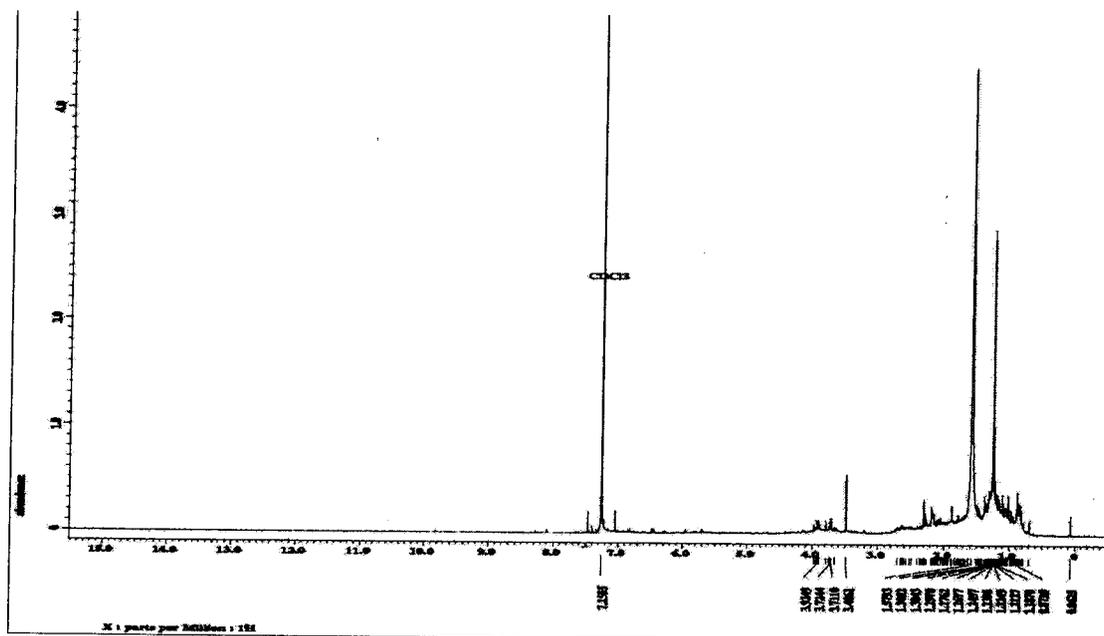
Gambar 8. Spektrum ultraviolet senyawa TsA2



Gambar 9. Spektrum inframerah senyawa TsA2



Gambar 10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa TsA1



Gambar 11. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa TsA2

4.2. Pembahasan

Daun tumbuhan *Tabernaemontana sphaerocarpa* diketahui mengandung golongan senyawa terpenoid, fenolik dan alkaloid. Senyawa-senyawa tersebut telah dilakukan pemurnian dengan cara kromatografi. Suatu senyawa murni TsM1 telah berhasil diperoleh dari fraksi etilasetat ekstrak metanol. Senyawa TsM1 mempunyai titik leleh 188-190°C.

Spektrum ultraviolet senyawa TsM1 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 212 nm dan 246 nm, ini menunjukkan bahwa senyawa TsM 1 memiliki gugus karbonil, hal ini didukung oleh data IR yang menunjukkan serapan pada panjang gelombang 1734.67 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya karbonil (Silverstein *et al.*, 1986 ; Wade, 2006).

Spektrum inframerah dari senyawa TsM 1 memberikan informasi bahwa serapan pada panjang gelombang 3450 cm^{-1} dan 3332 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur O-H. Serapan pada panjang gelombang 2923 cm^{-1} memperlihatkan vibrasi ulur C-H alkana. Serapan pada panjang gelombang 1735 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C=O ester, sesuai dengan spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ pada pergeseran kimia 171ppm yang mengindikasikan adanya gugus ester. Serapan pada panjang gelombang 1638 cm^{-1} dan

1455 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C=C. Serapan pada panjang gelombang 1366 cm^{-1} dan 1244 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi tekuk C-H dari $-\text{CH}_3$ gem-dimetil. Serapan pada panjang gelombang 1144 cm^{-1} dan 1095 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C-O (Silverstein *et al.*, 1986).

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa TsM 1 memperlihatkan adanya 4 sinyal singlet proton pada δ_{H} 1.60 ppm, δ_{H} 1.06 ppm, δ_{H} 1.02 ppm, δ_{H} 0.79 ppm, selanjutnya terdapat 3 sinyal dublet proton pada δ_{H} 2.034 ppm, δ_{H} 1.00 ppm, δ_{H} 0.86 ppm. 5 sinyal triplet proton terdapat pada δ_{H} 5.12 ppm, δ_{H} 4.50 ppm, δ_{H} 1.68 ppm, δ_{H} 1.55 ppm, δ_{H} 0.91 ppm. 6 sinyal multiplet proton terdapat pada δ_{H} 1.92 ppm, δ_{H} 1.64 ppm, δ_{H} 1.39 ppm, δ_{H} 1.38 ppm, δ_{H} 1.32 ppm, δ_{H} 1.31 ppm.

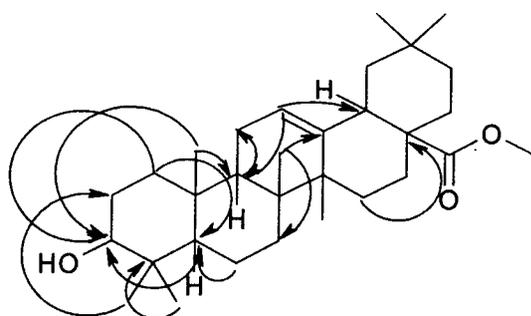
Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ TsM 1 menunjukkan senyawa ini mengandung 31 atom karbon yang muncul pada δ_{C} 15.91 ppm, δ_{C} 16.92 ppm, δ_{C} 17.02 ppm, δ_{C} 17.69 ppm, δ_{C} 18.39 ppm, δ_{C} 21.52 ppm, δ_{C} 21.59 ppm, δ_{C} 23.39 ppm, δ_{C} 23.54 ppm, δ_{C} 23.74 ppm, δ_{C} 26.75 ppm, δ_{C} 28.24 ppm, δ_{C} 28.93 ppm, δ_{C} 31.41 ppm, δ_{C} 33.01 ppm, δ_{C} 33.91 ppm, δ_{C} 36.95 ppm, δ_{C} 37.87 ppm, δ_{C} 38.61 ppm, δ_{C} 39.77 ppm, δ_{C} 39.81 ppm, δ_{C} 40.17 ppm, δ_{C} 41.69 ppm, δ_{C} 42.22 ppm, δ_{C} 47.79 ppm, δ_{C} 55.40 ppm, δ_{C} 59.19 ppm, δ_{C} 81.13 ppm, δ_{C} 124.47 ppm, δ_{C} 139.79 ppm, δ_{C} 171.26 ppm.

Penentuan atom karbon primer, sekunder, dan tersier dapat dilihat dari spektrum DEPT 135 (Lampiran 1), karbon primer dan tersier memiliki puncak yang mengarah ke atas, karbon sekunder memiliki puncak yang mengarah ke bawah, sedangkan karbon kuartener tidak muncul pada DEPT. Berdasarkan analisis DEPT senyawa TsM 1 memiliki 8 karbon primer ($-\text{CH}_3$), 10 atom sekunder ($-\text{CH}_2$), 5 atom tersier ($-\text{CH}$), dan 8 atom kuartener ($-\text{C}$). Pergeseran kimia karbon pada δ_{C} 81.13 ppm menunjukkan karakteristik gugus hidroksi, δ_{C} 124.47 ppm menunjukkan adanya ikatan C-H alkena dan pada δ_{C} 171.26 ppm menunjukkan adanya gugus asam karboksilat termetilasi.

Keterkaitan antara karbon dan proton dapat dilihat dari spektrum HMQC (Lampiran 10). Melalui spektrum HMQC dapat diamati senyawa TsM 1 memiliki 8 atom primer yaitu δ_{C} 2.05 ppm, δ_{C} 1.06 ppm, δ_{C} 1.00 ppm, δ_{C} 0.97 ppm, δ_{C} 0.91 ppm, δ_{C} 0.87 ppm, δ_{C} 0.86 ppm, dan δ_{C} 0.79 ppm. Selanjutnya terdapat 10 atom sekunder yaitu δ_{C} 38.61 ppm, δ_{C} 33.01 ppm, δ_{C} 28.93 ppm, δ_{C} 36.95 ppm, δ_{C} 18.39 ppm, δ_{C} 21.0 ppm, δ_{C} 31.41 ppm, δ_{C} 23.76 ppm, δ_{C} 40.17 ppm, dan δ_{C} 18.39 ppm. Kemudian terdapat 5 atom tersier yaitu δ_{C} 124.47 ppm, δ_{C} 81.13 ppm, δ_{C} 59.19 ppm, δ_{C} 55.41 ppm, dan δ_{C} 47.79 ppm.

Spektrum HMBC (Lampiran 2) memperlihatkan hubungan proton dengan atom karbon tetangga dengan jarak maksimum 4J. Berdasarkan spektrum ini dapat dilihat korelasi antara δ_H 5.12 ppm dengan δ_C 42.22 ppm, dan δ_C 47.79 ppm. Korelasi selanjutnya antara δ_H 4.50 ppm dengan δ_C 171.26 ppm. Korelasi lainnya antara δ_H 1.31 ppm dengan δ_C 39.81 ppm dan δ_C 55.40 ppm. Korelasi antara δ_H 0.86 ppm dengan δ_C 55.40 ppm, δ_C 81.13 ppm, δ_C 28.24 ppm. Korelasi antara δ_H 1.54 ppm dengan δ_C 17.02 ppm, δ_C 23.76 ppm, δ_C 36.95 ppm, δ_C 40.17 ppm. Korelasi antara δ_H 1.26 ppm dengan δ_C 28.24 ppm. Korelasi antara δ_H 0.91 ppm dan δ_H 1.31 ppm dengan δ_C 23.54 ppm. Korelasi antara δ_H 1.63 ppm dan δ_H 1.68 ppm dengan δ_C 36.95 ppm, δ_C 55.40 ppm, dan δ_C 81.13 ppm. Korelasi antara δ_H 0.79 ppm dengan δ_C 59.19 ppm. Korelasi antara δ_H 1.91 ppm dan δ_H 1.06 ppm dengan δ_C 124.47 ppm, δ_C 139.79 ppm, δ_C 21.52 ppm dan δ_C 47.79 ppm. Korelasi antara δ_H 2.05 ppm dengan δ_C 171.26 ppm. Korelasi antara δ_H 1.38 ppm dan δ_H 1.55 ppm dengan δ_C 124.47 ppm dan δ_C 55.40 ppm. Korelasi antara δ_H 0.86 ppm dan δ_H 1.00 ppm dengan δ_C 139.79 ppm dan δ_C 33.01 ppm.

Hasil spektrum 1H -NMR dan ^{13}C -NMR pada senyawa TsM 1 memperlihatkan adanya kemiripan dengan senyawa asam oleanolat yang ditemukan dari penelitian yang telah dilakukan oleh Khajuria, dkk tahun 2007.

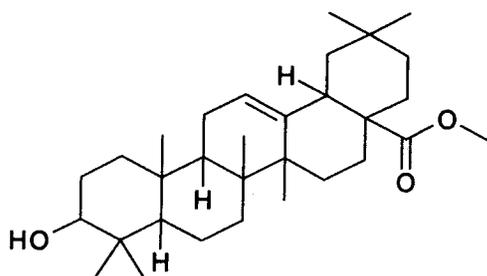


Gambar 12. Korelasi HMBC

Korelasi proton dengan proton dapat dilihat dari spektrum COSY (Lampiran 12). Berdasarkan spektrum ini dapat diamati korelasi δ_H 1.91 ppm dengan δ_H 1.55 ppm, korelasi δ_H 2.05 ppm dengan δ_H 1.91 ppm, korelasi 5.12 ppm dengan δ_H 1.91 ppm, korelasi δ_H 4.50 ppm dengan δ_H 1.63 ppm, korelasi δ_H 0.87 ppm dengan δ_H 0.79 ppm, korelasi δ_H 0.91 ppm dengan δ_H 0.87 ppm, korelasi δ_H 0.97 ppm dengan δ_H 0.79 ppm, korelasi δ_H 1.06 ppm dengan δ_H 0.91 ppm, korelasi δ_H 1.31 ppm dengan δ_H 0.79 ppm, korelasi δ_H 1.43 ppm dengan δ_H 0.86 ppm, korelasi δ_H 1.55 ppm dengan δ_H 1.31 ppm

dan δ_H 1.43 ppm, korelasi δ_H 1.63 ppm dengan δ_H 1.06 ppm, korelasi δ_H 1.91 ppm dengan δ_H 1.56 ppm, korelasi δ_H 2.05 ppm dengan δ_H 0.87 ppm dan δ_H 0.86 ppm.

Berdasarkan data pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ (Tabel 1), serta spektrum DEPT 135, HMQC, HMBC, dan COSY, senyawa TsM1 relatif sama dengan asam oleanolat yang telah ditemukan oleh Khajuria, *et al.*, 2007, tetapi OH yang terikat pada karbonil dari senyawa asam oleanolat diganti dengan gugus OCH_3 pada senyawa TsM 1 sehingga dapat disimpulkan bahwa kemungkinan senyawa TsM1 adalah metil oleanolat.



Gambar 13. Metil oleanolat

Hasil uji aktivitas sitotoksik (Tabel 3) dari ekstrak metanol, F3 dan F4 memberikan hasil LC_{50} berturut-turut 248,9 ppm; 70,2 ppm dan 4,2 ppm. ($\text{LC}_{50} < 1000\text{ppm}$). Pada metode *Brine Shrimp* suatu senyawa dapat dikatakan bersifat toksik apabila mempunyai harga $\text{LC}_{50} < 1000$ ppm dan mempunyai korelasi dengan uji aktivitas antitumor, dan mengindikasikan bahwa senyawa ini aktif terhadap sel kanker (Meyer *et al.*, 1982). Sedangkan aktivitas antimikrobia (Tabel 2) menunjukkan terjadinya hambatan yang cukup besar pada F1; F4 dan F5 tetapi masih di bawah aktivitas antibiotik streptomisin.

Terhadap uji antimalaria belum dapat ditentukan aktif atau tidak aktifnya suatu senyawa karena hasil uji belum memenuhi persyaratan pengujian, ini mungkin disebabkan rendahnya konsentrasi sampel dan sampel juga masih berupa ekstrak total dan kemungkinan di ulang tidak bisa berhubung tingginya biaya yang diperlukan. Uji ini bisa kita lakukan lagi dengan adanya biaya yang lain.

Spektrum UV senyawa TsA1 terjadi serapan pada panjang gelombang 242 dan 281 nm, menunjukkan adanya sistem terkonjugasi pada ikatan rangkap. Keadaan ini didukung dengan adanya vibrasi ulur spektrum IR pada bilangan panjang gelombang 1456 cm^{-1} . Penyerapan IR pada daerah 3487 cm^{-1} , 3340 cm^{-1} menunjukkan adanya

vibrasi ulur N-H dari alkaloid; serapan pada 2924 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur C-H dan serapan pada 1043 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur C-O.

Analisis spektrum UV senyawa TsA2 memperlihatkan adanya serapan pada panjang gelombang 227 nm. Spektrum IR senyawa TsA2 terjadi serapan pada daerah bilangan gelombang 3512 cm^{-1} , 3487 cm^{-1} dan 3340 cm^{-1} merupakan vibrasi ulur dari N-H alkaloid. Serapan pada panjang gelombang 2924 cm^{-1} , dan 2924 cm^{-1} memperlihatkan vibrasi ulur C-H alkana. Serapan pada panjang gelombang 2867.58 cm^{-1} dan 2852.14 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C-H dari aldehid. Serapan pada panjang gelombang 1759 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C=O. Serapan pada panjang gelombang 1602 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} dan 1456 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C=C dari aromatik. Serapan pada panjang gelombang 1375 cm^{-1} , 1328 cm^{-1} dan 1255 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi tekuk C-H. Serapan pada panjang gelombang 1130 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} dan 945 cm^{-1} memperlihatkan adanya vibrasi ulur C-O (Silverstein dkk, 1986).