

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

4.1.1. Hasil pemisahan ekstrak n-heksana dengan kromatografi kolom

Tujuh gram ekstrak n-heksana dipisahkan dengan kromatografi kolom, diperoleh 16 fraksi. Hasil KLT dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel 1. Hasil pemisahan ekstrak n-heksana dengan kromatografi kolom

No. Fraksi	Nomol Vial	Berat (miligram)	Banyak Noda (KLT dengan eluen heksana: etilasetat 65 : 35)
1	18-20	263,6	1 noda
2	21-30	386,1	3 noda
3	31-41	474,6	2 noda
4	42-65	121,5	1 noda
5	66-79	125,5	3 noda
6	80-120	248,6	2 noda
7	121-136	53,9	1 noda
8	137-142	123,9	2 noda
9	143-189	262,9	2 noda
10	190-270	55,4	2 noda
11	271-279	210,1	1 noda
12	280-310	489,7	1 noda
13	311-335	152,6	1 noda
14	340-380	373,8	1 noda
15	381-410	369,4	1 noda
16	411-435	452,1	1 noda

4.1.2. Hasil pemisahan F1 dengan kromatografi kolom

Sebanyak 263,6 mg F1 dikromatografi kolom kembali menghasilkan 10,6 mg senyawa MA-5 (vial 24-27). MA adalah singkatan dari *Millettia atropurpurea*, angka 5 mengacu pada urutan ditemukannya senyawa. Senyawa MA-5 berupa kristal putih dengan titik leleh 174-176 °C. Kristal MA-5 memberikan warna merah muda dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan warna abu-abu kehijauan dengan anisaldehida. Hasil uji kemurnian terhadap senyawa MA-5 dengan KLT telah memperlihatkan noda tunggal dengan harga Rf 0,86 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,69 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,66 (n-heksana : diklorometana, 8:2).

4.1.3. Hasil pemisahan F2 dengan kromatografi kolom

Sebanyak 368,1 mg F2 dikromatografi kolom kembali menghasilkan kristal putih pada vial 20-25. Rekrystalisasi berulang terhadap kristal ini menghasilkan 18 miligram kristal dengan titik leleh 148-150 °C dan diberi nama MA-6. Senyawa MA-6 memberikan warna merah dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Hasil uji kemurnian terhadap senyawa MA-6 dengan KLT telah memperlihatkan satu noda dengan harga Rf 0,76 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,60 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,51 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2).

4.1.4. Hasil pemisahan F3 dengan kromatografi kolom

Fraksi 3 sebanyak 474,6 mg berupa padatan hijau kehitaman yang pada dinding vial terdapat kristal. Hasil uji KLT F3 belum menunjukkan satu noda, untuk itu dilakukan pemisahan kembali dengan kromatografi kolom. Kromatografi kolom F3 menghasilkan kristal putih pada vial 23-26 sebanyak 50,4 miligram. Kristal ini diberi nama MA-1. Senyawa MA-1 meleleh pada 166-168 °C dan memberikan warna coklat kemerahan kemerahan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Hasil uji KLT senyawa MA-1 telah menunjukkan satu noda pada Rf 0,58 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,47 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,46 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2).

4.1.5. Hasil pemisahan F5 dan F6 dengan kromatografi kolom

Hasil uji KLT F5 dan F6 belum menunjukkan satu noda. Karena itu sebanyak 208,7 mg F5 dan 165,4 mg F6 yang berupa padatan digabung dan dipisahkan kembali dengan kromatografi kolom. Hasil kromatografi kolom menghasilkan 3 senyawa berupa kristal putih, yaitu 1,5 mg MA-3 dengan titik leleh 156-158 (vial 5-8), 0,8 mg MA-4 (vial 9-10) dan 20,1mg MA-2 dengan titik leleh 206-208 °C (vial 11-13) dengan titik leleh 152-154 °C. Ketiga kristal tersebut memberikan warna coklat kemerahan kemerahan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Hasil uji KLT senyawa MA-2 telah menunjukkan satu noda dengan Rf 0,52 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,45 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,23 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2). Hasil uji KLT senyawa MA-3 telah menunjukkan satu noda pada Rf 0,64 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,46 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,32 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2). Hasil uji KLT senyawa MA-4 juga telah menunjukkan satu noda pada Rf 0,64 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,47 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,32 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2).

4.1.6. Karakterisasi senyawa

Hasil karakterisasi UV senyawa MA-1 menunjukkan serapan maksimum di bawah 200 nm. Hasil karakterisasi IR menunjukkan serapan pada frekuensi 3447 cm^{-1} , 2942 cm^{-1} , 2869 cm^{-1} , 1648 cm^{-1} , 1447 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1098 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} , 970 cm^{-1} , 829 cm^{-1} dan 628 cm^{-1} . Gambar spektrum selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 10.

Hasil karakterisasi UV senyawa MA-2 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang di bawah 200 nm. Hasil karakterisasi IR menunjukkan serapan pada frekuensi 3368 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} , 2869 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} , 1464 cm^{-1} , 1385 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1190 cm^{-1} , 1095 cm^{-1} , 1045 cm^{-1} , 1004 cm^{-1} dan 660 cm^{-1} . Hasil karakterisasi NMR ^1H dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada 500 MHz dapat dilihat pada Lampiran 11. Hasil karakterisasi NMR ^{13}C senyawa MA-2 dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada 125 MHz menunjukkan puncak-puncak pada 144,36; 138,86; 125,20; 122,53; 79,17; 70,11; 79,90; 55,30; 54,17; 47,80; 47,72; 46,61;

42,49; 42,2; 41,87; 40,15; 39,92; 39,58; 39,52; 38,94; 38,73; 38,16; 37,10; 37,03; 35,35; 34,23; 33,38; 32,96; 32,17; 31,20; 31,14; 30,78; 29,88; 28,25; 26,12; 23,75; 23,69; 23,54; 23,48; 23,45; 22,12; 21,52; 18,51; 17,53; 16,93; 16,89; 15,88; 15,76 dan 15,70 ppm. Hasil karakterisasi LC-MS ESI senyawa MA-2 dapat dilihat pada Lampiran 11

Terhadap senyawa MA-5 dilakukan karkterisasi dengan spektroskopi UV dan IR. Hasil karakterisasi UV senyawa ini dalam pelarut n-heksana menunjukkan serapan lemah pada panjang gelombang 243 nm. Senyawa ini menyerap pada frekuensi 3405 cm^{-1} , 2957 cm^{-1} , 2869 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} , 1444 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} , 1248 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1188 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 970 cm^{-1} , 845 cm^{-1} , dan 522 cm^{-1} . Hasil karakterisasi LC-MS ESI menunjukkan puncak $[M+H]^+$ pada m/z 411,1167. Data pergeseran kimia (δ_H) NMR ^1H senyawa MA-5 dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada frekuensi 500 MHz adalah sebagai berikut: 5,17 (1H, s), 5,15 (1H, dd, $J = 8,6$; 6,8 dan 6,6 Hz), 15,02 (1H, dd, $J = 8,6$, 6,8 dan 6,6 Hz), 2,42 (1H,ddd, $J = 6$ Hz), 2,26 (3H, t), 2,13 (1H, dddd), 2,02 (2H, m), 1,9-1,4 (rumit, dikarenakan oleh tumpang tindih oleh berbagai spektrum proton), 1,27 (3H, m), 1,16 (1H, m), 1,03 (3H, d, $J = 6,75$ Hz), 1,01 (3H, s), 0,85 (3H, d, $J = 6,75$ Hz), 0,80 (3H, s), 0,79 (3H, t) dan 0,57 ppm (3H, s). Data pergeseran kimia (δ_C) NMR ^{13}C dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada 125 MHz adalah sebagai berikut 212,23; 139,68; 138,26; 129,68; 117,18; 56,02; 55,19; 51,42; 49,00; 44,43; 43,42; 43,02; 41,03; 39,49; 38,94; 38,31; 34,57; 32,05; 28,67; 25,59; 23,19; 21,87; 21,56; 21,30; 19,17; 12,64; 12,44 dan 12,28 ppm. Gambar spektrum selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 12.

Spektrum IR senyawa MA-6 menunjukkan adanya serapan pada frekuensi 3391, 3065, 2944, 2869, 1639, 1455, 1380, 1187, 1103, 1042, 880 dan 547 cm^{-1} . Hasil karakterisasi LC-MS ESI menunjukkan puncak $[M+H]^+$ pada m/z 427,1064; dan puncak $[M+H-H_2O]^+$ pada m/z 409,1053; sebagai puncak dasar pada m/z 257,9966. Hasil karakterisasi NMR ^1H dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada frekuensi 500 MHz menunjukkan pergeseran kimia pada 4,68 (1H, d, $J = 2,45$ Hz), 4,56 (1H, m), 3,18 (1H, d, $J = 11,6$ Hz), 2,38 (1H, ddd, $J = 4,85$; 6,2; 6,2 Hz), 1,91 (1H, m), 1,68 (3H, s), 1,67-1,03 (rumit, karena adanya tumpang tindih pergeseran

kimia proton-proton metilen maupun metin), 1,02 (3H, s), 0,96 (3H, s), 0,94 (3H, s), 0,82 (3H, s), 0,78 (3H, s), 0,76 (3H, s), 0,68 ppm (1H, d, $J = 9,2$ Hz). Data NMR ^{13}C dalam pelarut CDCl_3 yang direkam pada frekuensi 125 MHz adalah sebagai berikut: 151,18; 109,51; 79,12; 55,45; 50,60; 48,46; 48,16; 43,19; 43,00; 40,99; 40,18; 39,05; 38,87; 38,21; 37,34; 35,75; 34,44; 30,01; 28,17; 27,61; 27,59; 25,29; 21,09; 19,48; 18,19; 16,31; 16,15; 15,56 dan 14,72 ppm. Gambar spektrum dapat dilihat pada Lampiran 13.

4.2. PEMBAHASAN

Dari daun tumbuhan *M. atropurpurea* berhasil diisolasi 6 senyawa yaitu MA-1, MA-2, MA-3, MA-4, MA-5 dan MA-6. Data fisikokimia masing-masing senyawa dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Daftar senyawa yang ditemukan pada tumbuhan *Millettia atropurpurea*

Nama Senyawa	Berat (miligram)	Titil Leleh ($^{\circ}\text{C}$)	Harga Rf
MA-1	50,4	166-168	Rf 0,58 (H : D, 5 : 5) Rf 0,47 (H : E, 7 : 3) Rf 0,46 (H : D, 8 : 2)
MA-2	20,1	206-208	Rf 0,52 (H : D, 5 : 5) Rf 0,45 (H : E, 7 : 3) Rf 0,23 (H : D, 8 : 2)
MA-3	1,6	156-158	Rf 0,64 (H : D, 5 : 5) Rf 0,46 (H : E, 7 : 3) Rf 0,32 (H : D, 8 : 2)
MA-4	0,8	152-154	Rf 0,64 (H : D, 5 : 5) Rf 0,47 (H : E, 7 : 3) Rf 0,32 (H : D, 8 : 2)
MA-5	10,6	174-176	Rf 0,86 (H : D, 5 : 5) Rf 0,69 (H : E, 7 : 3) Rf 0,66 (H : D, 8 : 2)
MA-6	18	154-156	Rf 0,76 (H : D, 5 : 5) Rf 0,60 (H : E, 7 : 3) Rf 0,51 (H : D, 8 : 2)

Keterangan : H = n-heksana
D = diklorometana
E = etilasetat

Senyawa MA-1 memiliki titik leleh 166-168 °C dan hasil uji KLT menunjukkan satu noda dengan harga Rf 0,58 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,47 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,46 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2), sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa MA-1 sudah murni. Hasil analisis spektrum UV senyawa MA-1 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang di bawah 200 nm. Ini menunjukkan tidak adanya sistem ikatan rangkap terkonjugasi pada strukturnya. Hasil analisis spektroskopi IR menunjukkan serapan pada frekuensi 3447 cm⁻¹ yang sesuai untuk vibrasi ulur gugus OH, 1648 cm⁻¹ untuk vibrasi ulur C=C cm⁻¹ dan dua puncak pada 1370 cm⁻¹ untuk gugus gem-dimetil. Senyawa MA-1 menunjukkan warna coklat kemerahan dengan pereaksi Liebermann-Burchard, dapat disimpulkan bahwa senyawa ini termasuk golongan terpenoid.

Senyawa MA-2 menghasilkan warna coklat kemerahan dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Hasil ini menegaskan bahwa senyawa MA-2 termasuk golongan senyawa terpenoid. Senyawa MA-2 disimpulkan sudah murni. Kesimpulan ini didukung oleh selisih titik leleh sebesar 2 °C (166-168 °C) dan telah menunjukkan satu noda pada 3 perbandingan pelarut dengan harga Rf 0,52 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,45 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,23 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2). Hasil analisis spektrum UV senyawa MA-2 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang di bawah 200 nm. Hasil ini mengindikasikan bahwa senyawa MA-2 tidak memiliki sistem ikatan rangkap terkonjugasi. Dari spektra IR, senyawa MA-2 mengandung gugus hidroksil (3368 cm⁻¹), C=C (1649 cm⁻¹) dan gem-dimetil (1385 cm⁻¹). Meskipun data fisikokimia menunjukkan senyawa MA-2 sudah murni namun hasil karakterisasi NMR dan LC-MS (di dalam Lampiran 11) menunjukkan bahwa senyawa ini MA-2 belum murni. Dapat dilihat bahwa spektrum NMR ¹H sangat rumit namun memberikan pemecahan puncak yang cukup baik. Namun hasil integrasi tidak dapat dijadikan untuk menentukan jumlah atom H pada setiap signal yang muncul. Hasil karakterisasi NMR ¹³C menunjukkan 50 atom karbon, jumlah atom karbon yang tidak biasa untuk senyawa golongan terpenoid. Demikian juga dengan hasil karakterisasi MS MA-2 rumit dan tidak dapat ditentukan puncak ion molekulnya.

Diduga bahwa MA-2 terdiri atas 2 isomer yang memiliki struktur yang identik dengan perbandingan 1:3. Ini ditandai dengan selisih titik leleh sebesar 2 °C, bentuk spektrum IR yang rapi dan pergeseran kimia pada NMR yang berdekatan dengan perbandingan puncak puncak sekitar 1:3. Untuk itu diperlukan pemisahan lebih lanjut dengan metode pemisahan yang sesuai, misalnya dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Kemudian dilanjutkan dengan dikarakterisasi kembali dengan metode spektroskopi.

Hasil analisa KLT senyawa MA-1, MA-3 dan MA-4 memberikan harga Rf yang hampir sama. Hasil pengukuran titik leleh juga menunjukkan harga-harga yang tidak terlalu jauh. Dari hasil ini disimpulkan bahwa senyawa MA-1, MA-3 dan MA-4 memiliki struktur yang hampir sama.

Senyawa MA-5 memiliki titik leleh 174-176 °C dan menunjukkan satu noda pada 3 perbandingan pelarut dengan harga Rf 0,86 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,69 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,66 (n-heksana : diklorometana, 8:2). Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa senyawa MA-5 sudah murni. Hasil pengukuran spektrum UV senyawa MA-5 memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 243 nm. Ini menunjukkan bahwa senyawa ini tidak memiliki sistem elektron π terkonjugasi. Serapan hanya disebabkan oleh gugus karbonil. Hal ini didukung dari spektrum IR yang menunjukkan serapan pada 1719 cm^{-1} untuk gugus karbonil. Senyawa MA-5 memberikan warna coklat kemerahan dengan pereaksi Liebermann-Burchard sehingga disimpulkan senyawa MA-5 termasuk golongan senyawa steroid dan hal ini didukung oleh data NMR ^{13}C yang menunjukkan senyawa ini mengandung 29 atom karbon. Spektra LC-MS ESI memperlihatkan bobot molekul Ma-5 adalah 410 gr/mol dengan rumus molekul $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$ (nilai hitung 410,2437 dan nilai teramati 410,1089). Rumus molekul ini didukung data dari NMR ^{13}C yang memberikan 29 atom karbon dan 1 atom oksigen. Spektra NMR ^1H menunjukkan adanya 3 metil tertier pada δ_{H} 1,01; 0,80 dan 0,57 serta satu metil primer pada δ_{H} 0,79. Tiga proton juga tampak pada δ_{H} 5,17 untuk olefin trisubstitusi dan δ_{H} 5,15 (1H, dd, $J = 8,6; 6,8$ dan $6,6$ Hz), 5,02 (1H, dd, $J = 8,6, 6,8$ dan $6,6$ Hz) untuk olefin disubstitusi. Gugus metil dari isopropil juga tampak

sebagai 2 metil doublet ($J = 6,75$ Hz) pada δ_H 1,03 dan 0,85. Spektra NMR ^{13}C mengindikasikan adanya 2 buah ikatan rangkap C=C pada strukturnya sesuai dengan harga δ_C 139,67; 138,26; 129,68 dan 117,18. Dari data spektroskopi yang terkumpul kerangka steroid dapat disimpulkan mirip dengan stigmasterol namun ada harga-harga pergeseran kimia pada NMR 1H dan ^{13}C yang tidak sesuai, seperti harga 3 gugus metil pada δ_C 12,64; 12,44 dan 12,28. Namun dari data-data spektroskopi yang dikumpulkan dapat diduga senyawa MA-5 adalah stigmasteron. Untuk dapat menentukan strukturnya dengan pasti perlu penelusuran literatur kembali ataupun karakterisasi dengan eksperimen NMR dua dimensi.

Senyawa Ma-6 diisolasi berupa kristal putih dengan titik leleh 148-150 $^{\circ}C$ dan menunjukkan noda tunggal pada uji KLT menggunakan 3 sistem pelarut dengan harga Rf 0,76 (n-heksana : diklorometana, 5 : 5), Rf 0,60 (n-heksana : etilasetat, 7 : 3) dan Rf 0,51 (n-heksana : diklorometana, 8 : 2). Dari data fisikokimia ini dapat dikatakan bahwa senyawa ini sudah murni. Ma-6 menunjukkan reaksi positif untuk terpenoid. Dari spektra IR diketahui adanya serapan yang mengindikasikan hadirnya gugus hidroksil (3391 cm^{-1}), C=C (1639 cm^{-1}) dan dimetil geminal (1380 cm^{-1}). Dari spektra LC-MS ESI dapat diketahui ion molekul pada m/z 427 $[M+H]^+$. Ini didukung oleh hadirnya puncak pada m/z 409 yang mengindikasikan hilangnya molekul air. Didukung oleh data NMR ^{13}C , dapat disimpulkan bobot molekul senyawa Ma-6 adalah 426 gr/mol dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O$ (nilai hitung 426,3859 dan nilai teramati 426,1006). Spektra NMR 1H menunjukkan adanya signal 6 singlet metil pada δ_H 0,76; 0,78; 0,82; 0,94; 0,96 dan 1,02 serta adanya metil yang terikat pada olefin ($CH_3-C=C$) pada δ_H 1,68. Data pergeseran kimia ini cocok dengan kerangka lupen. Spektrum NMR ^{13}C juga menunjukkan adanya karbon olefin δ_C 151,19 dan δ_C 109,51 dan suatu puncak pada δ_C 79,20. Dari data NMR dapat disimpulkan bahwa senyawa Ma-6 adalah lupeol atau lup-20(29)-en-3 β -ol. Ini didukung oleh adanya doublet metin pada δ_H 3,18 karakteristik untuk proton C-3 dan harga-harga pergeseran kimia lainnya (Aratanechemuge dkk, 2004 dan Fokou, 2006). Perbandingan data NMR senyawa Ma-6 terhadap lupeol dapat dilihat pada Lampiran 14. Meskipun pergeseran kimia NMR senyawa Ma-6 hampir sama dengan lupeol, namun titik lelehnya berbeda

jauh dengan lupeol (untuk lupeol 213-215 °C). Untuk itu perlu karakterisasi lebih lanjut untuk menentukan struktur senyawa Ma-6 secara lengkap dengan eksperimen NMR dua dimensi.