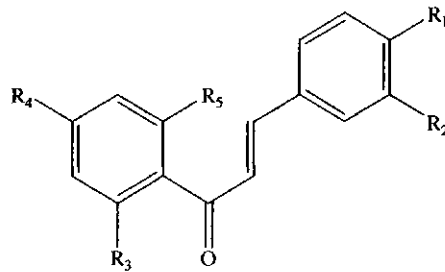


(37) $R_1 = \text{H}, R_2 + R_3 = \text{OCH}_2\text{O}$

(38) $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$



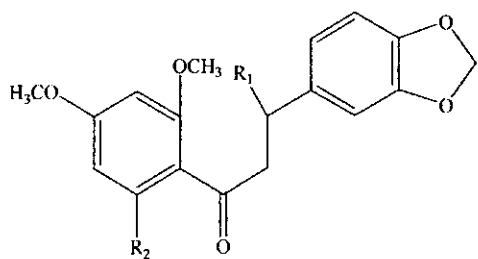
(39) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}, R_3 = \text{H}, R_4 = R_5 = \text{OCH}_3$

(40) $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OCH}_3, R_5 = \text{OH}$

(41) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{OCH}_3$

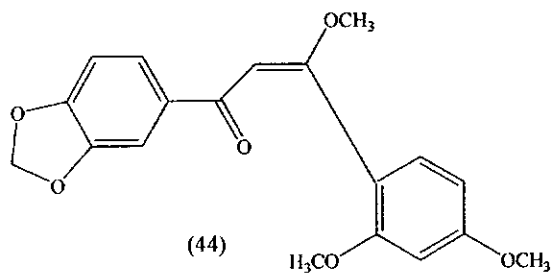
Phrutivorapongkul dkk. (2003) berhasil mengisolasi 4 turunan calkon baru (39, 41, 42, 44) beserta tujuh senyawa yang telah dikenal (40, 43, 45, 46, 47, 48, 49) dari kulit batang *M. leunchata* KURZ. Senyawa-senyawa ini memperlihatkan aktivitas sitotoksik, antivirus dan anti-inflamasi.

Millettia nitida var. *hirsutissima* sejak ratusan tahun lalu digunakan sebagai obat tradisional Cina. Air rebusan batang tumbuhan ini digunakan untuk memperlancar aliran darah. Tumbuhan ini juga biasanya digunakan mengobati sakit atau kebas pada pergelangan tangan, lutut atau sendi dan melancarkan siklus haid. Pada tahun 2005, Cheng dkk. berhasil mengisolasi senyawa-senyawa golongan flavonoid yang dinamai hirstissimisida A (50), hirstissimisida B (51) dan hirstissimisida C (52).

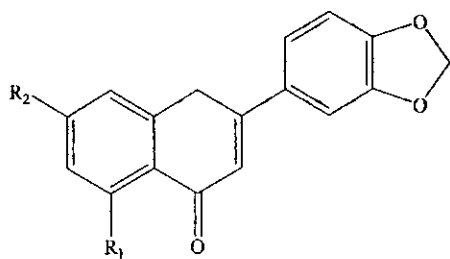


(42) $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

(43) $R_1 = OCH_3, R_2 = H$



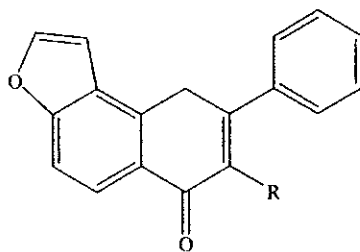
(44)



(45) $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

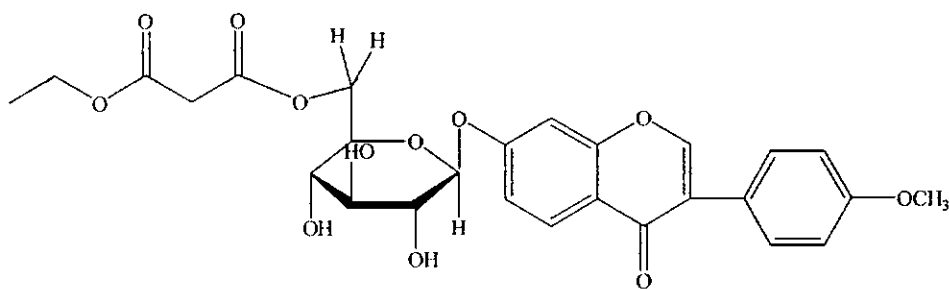
(46) $R_1 = R_2 = H$

(47) $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

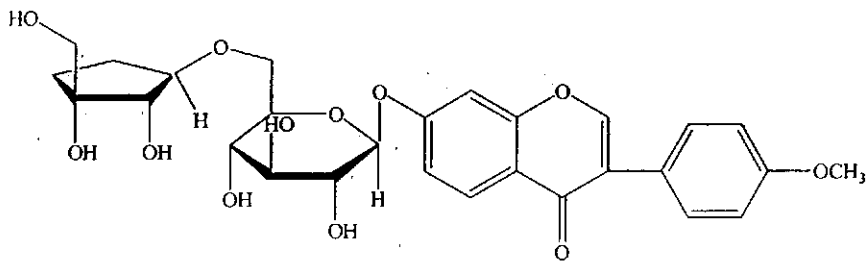


(48) $R = OCH_3$

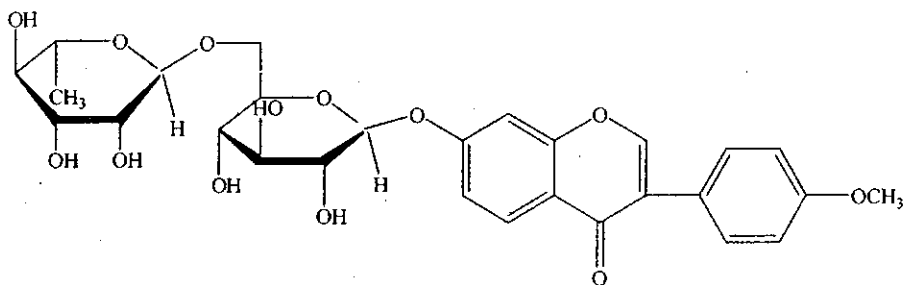
(49) $R = H$



(50)



(51)



(52)

2.6. Metode Ekstraksi dan Isolasi

2.6.1. Bahan tumbuhan

Analisis fitokimia sebaiknya menggunakan jaringan tumbuhan yang masih segar. Cara lain dapat dilakukan dengan mengeringkan tumbuhan dan kemudian diekstraksi. Pengeringan dilakukan dengan hati-hati agar konstituen kimia yang ada pada sampel tidak berubah, misalnya adanya aktivitas enzim, oksidasi dan lain sebagainya. Pada analisis fitokimia, identitas botani harus dapat dibuktikan terlebih dahulu dengan membuat herbarium (Harborne, 1987).

2.6.2. Metode ekstraksi

Ekstraksi banyak jenisnya, bergantung pada tekstur, kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi. Bahan tumbuhan dapat dimaserasi dengan pelarut, lalu disaring. Selain maserasi, untuk mendapatkan

kandungan senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering dapat juga digunakan alat soklet. Serbuk bahan dan pelarut dimasukkan ke dalam alat soklet kemudian dipanaskan. Kita dapat mengganti pelarut sesuai dengan kepolaran yang diinginkan. Biasanya pelarut yang digunakan berganti dari pelarut non polar seperti eter, kloroform, etilasetat hingga alkohol untuk senyawa-senyawa yang lebih polar (Harborne, 1987).

2.7. Metode Pemisahan Senyawa Bahan Alam

Kromatografi merupakan suatu tehnik pemisahan yang saat ini banyak digunakan dan dikembangkan. Banyak teknik kromatografi, mulai dari yang paling sederhana sampai yang tercanggih, digunakan untuk pekerjaan rutin dalam pemisahan campuran senyawa, khususnya dalam kimia organik bahan alam maupun dalam sintesis (Wilcox dan Wilcox, 1995).

2.7.1. Kromatografi kolom

Bahan alam maupun hasil reaksi biasanya berada dalam keadaan campuran. Untuk memisahkan campuran tersebut, di laboratorium kimia organik sering digunakan kromatografi kolom (Nimit, 1991). Jumlah sampel yang dapat dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom bisa dalam jumlah besar skala produksi maupun hanya dalam jumlah beberapa gram (Zubrick, 1987).

Pada kromatografi kolom, fase diam dimasukkan ke dalam sebuah tabung kaca. Sampel dimasukkan ke bagian atas kolom, kemudian fase gerak dilewatkan mengalir ke bawah. Komponen sampel akan memisah oleh perbedaan interaksi dengan fase diam menghasilkan pita-pita. Pita-pita ini kemudian dielusi dengan eluen dan ditampung dalam suatu penampung (biasanya disebut vial) saat keluar dari kolom (Nimit, 1991).

Pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom bergantung pada jenis fase diam yang dipakai. Pemisahan berlangsung dengan mekanisme yang berbeda, seperti adsorpsi, partisi, pertukaran ion, afinitas dan eksklusi. Keberhasilan pemisahan bergantung pada jumlah adsorben, ukuran partikel, diameter kolom dan kecepatan aliran eluen yang digunakan (Palleros, 2000)

2.7.2. Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah tehnik pemisahan yang sering digunakan dalam kimia organik. KLT dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif. KLT dapat digunakan menganalisis campuran yang rumit seperti bahan alam maupun hasil reaksi, hanya dalam beberapa menit menggunakan peralatan yang murah dan biasanya tersedia di laboratorium. KLT digunakan dalam banyak aplikasi. Kecepatan tehnik ini membuatnya sangat berguna untuk memonitor kromatografi kolom skala besar. Analisis KLT dapat digunakan untuk memantau pemisahan dengan kromatografi kolom dan untuk menggabungkan fraksi-fraksi yang dikumpulkan. Jalannya suatu reaksi dapat juga dipantau secara periodik dengan menggunakan KLT (Mayo dkk, 1994).

Pemisahan dengan KLT berlangsung pada lapisan tipis dari fase diam padat yang tersebar pada plat yang terbuat dari aluminium, kaca atau plastik ketika fase gerak bergerak disepanjang plat dengan proses partisi, adsorpsi, pertukaran ion atau eksklusi-ukuran. Namun di dalam kimia organik, aplikasi KLT didasarkan pada adsorpsi (Palleros, 2000).

Sampel berupa cairan atau larutan yang tidak volatil dilarutkan dalam pelarut yang volatil, kemudian ditotolkan pada adsorben dengan menggunakan pipa kapiler pada jarak 1,5 cm dari ujung bawah plat. Pelarut dibiarkan mengering dan kemudian plat dimasukkan dalam sebuah bejana yang berisi fase gerak. Fase gerak dibiarkan merembes sampai kira-kira 0,5 cm dari ujung atas plat. Selama proses berlangsung, bejana ditutup agar keseimbangan cair-uap fase gerak tetap terjaga.

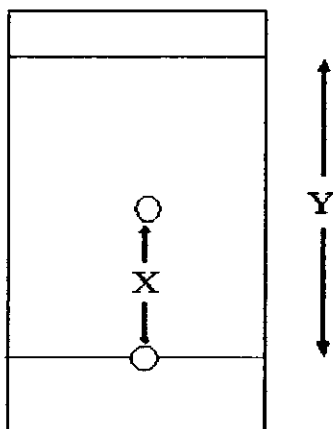
Fase gerak naik pada plat KLT melalui gaya kapilaritas mengelusi sepanjang komponen yang ada pada sampel. Umumnya kecepatan pergerakan senyawa-senyawa berbeda karena memiliki interaksi spesifik dengan fase diam. Ketika mencapai garis batas atas, plat dikeluarkan dan dianalisis.

Penandaan noda hasil pengembangan KLT dapat dilakukan tergantung dari sifat senyawa yang dipisahkan. Untuk senyawa berwarna dapat langsung ditandai dengan pensil. Untuk senyawa yang aktif pada sinar ultraviolet, dapat digunakan

menguapinya dengan uap iodin ataupun dengan memberikan peraksi penampak noda (Palleros, 2000).

Noda yang sudah divisualisasi dan ditandai dengan pensil ditentukan R_f (*ratio of the front*)-nya. R_f adalah perbandingan jarak yang ditempuh oleh senyawa (x) dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak (y) terhadap noda asal.

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh fase gerak}} = \frac{x}{y}$$



Gambar 1. Kromatografi lapis tipis

Aplikasi KLT yang sering digunakan lebih lanjut adalah KLT preparatif dan KLT dua arah. Jadi KLT dapat diaplikasikan secara kualitatif atau preparatif (Nimit, 1991).

2.8. Metode Spektroskopi

Spektroskopi adalah studi mengenai ataraksi antara energi cahaya dan materi. Panjang gelombang dalam mana senyawa organik menyerap energi cahaya, bergantung pada struktur senyawa itu. Oleh karena itu teknik-teknik spektroskopi dapat digunakan untuk mentukan struktur senyawa yang tidak diketahui dan untuk

mempelajari karakteristik ikatan senyawa yang diketahui (Fessenden dan Fessenden, 1998).

Atkins dan Carey (2002) mengemukakan empat metode spektroskopi sebagai berikut :

- Spektroskopi resonansi magnetik inti (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) memberikan informasi mengenai kerangka karbon dan lingkungan kimia hidrogen yang melekat pada kerangka molekul.
- Spektroskopi infra merah (IR), menyatakan adanya gugus-gugus fungsi yang ada pada molekul.
- Spektroskopi ultra violet-sinar tampak, menunjukkan distribusi elektron dalam molekul, khususnya dalam molekul yang memiliki sistem elektron π (ϕ) terkonjugasi.
- Spektrometri massa, memberikan informasi mengenai berat dan rumus molekul baik molekul itu sendiri (ion molekul) maupun fragmen-fragmen nya.

Informasi dari ke-empat metode spektroskopi tersebut digabungkan, sehingga struktur senyawa dapat ditentukan.

2.8.1. Spektroskopi UV

Spektroskopi ultraviolet (UV) sangat berguna dalam mempelajari molekul-molekul organik yang mengandung ikatan rangkap dua maupun ikatan rangkap tiga, khususnya yang memiliki sistem terkonjugasi dan cincin aromatik (Palleros, 2000). Spektroskopi UV melibatkan transisi elektronik pada panjang gelombang 200-380 nm (Field dkk, 1996).

Pada spektroskopi UV, parameter yang akan diukur adalah intensitas transmittan atau absorptivitasnya. Absorptifitas sebanding dengan konsentrasi dan panjang sampel yang dilewati oleh sinar. Hubungan ini dikenal dengan Hukum Lambert-Beer (Field dkk, 1996). Untuk tujuan karakterisasi kromofor, intensitas absorpsi dinyatakan dengan absorptifitas molar (ϵ) sebagaimana dirumuskan sebagai :

$$\epsilon = \frac{A}{Cl}$$

dengan ketentuan A adalah absorptifitas, C adalah konsentrasi (mol per liter) dan l adalah panjang yang dilalui oleh sinar (cm).

Senyawa organik yang akan dikarakterisasi pada spektroskopi UV harus berada dalam keadaan murni dan dalam bentuk larutan. Senyawa dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Pelarut yang sering digunakan adalah n-heksana, air, etanol ataupun dioksan (Zubrick, 1987).

Gugus yang menyerap radiasi pada UV disebut kromofor. Data yang berguna untuk penentuan adalah kromofor yang mengabsorpsi kuat (ϵ) pada spektroskopi UV seperti sistem ikatan rangkap terkonjugasi maupun sistem aromatik. Sistem konjugasi dapat diperpanjang oleh kehadiran ausokrom. Ausokrom adalah atom yang memiliki satu atau lebih pasangan elektron tidak berpasangan maupun gugus yang memiliki ikatan rangkap, misalnya gugus OH, NH₂, karbonil dan lain sebagainya. Apabila struktur berubah, seperti pelekatan ausokrom maupun penambahan pereaksi geser, maka serapan maksimum juga akan berubah. Jika serapan bergeser pada pertambahan panjang gelombang maka disebut pergeseran batokromik, sebaliknya apabila bergeser ke panjang gelombang yang lebih pendek disebut pergeseran hipsokromik (Field dkk, 1996).

2.8.2. Spektroskopi inframerah (IR)

Spektrum IR berada pada rentang frekuensi 4000 dan 650 cm⁻¹. Penentuan spektrum ini didasarkan pada vibrasi ikatan. Gugus-gugus fungsi menyerap energi yang spesifik untuk mengalami vibrasi bergantung pada sifat ikatan. Berdasarkan pemahaman ini, gugus-gugus fungsi spesifik dalam molekul dapat dikenali (Zubrick, 1987). Ikatan yang polar akan menyerap dengan kuat, sebaliknya ikatan yang simetris tidak akan menyerap sama sekali. Ikatan yang lebih pendek dan kuat memiliki vibrasi ulur pada frekuensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikatan yang lebih panjang dan lemah (Field dkk, 1996).

Sampel yang digunakan pada spektroskopi IR dapat berupa gas, cair maupun padat. Biasanya sampel padatan sebanyak 2-5 miligram digerus dengan garam kbr dan ditekan membentuk pellet kemudian langsung diukur. Cara yang lain untuk

perlakuan sampel padatan adalah dengan mendispersikan sampel pada nujol. Untuk sampel cairan, sampel sebanyak 2-5 mikroliter disebarikan pada diantara dua plat nacl dan diukur efektif pada $1600-4000\text{ cm}^{-1}$ (Field dkk, 1996).

Gugus-gugus fungsi yang dengan mudah dikenali adalah gugus karbonil (menyerap kuat pada $1650-1870\text{ cm}^{-1}$). Pita serapan untuk gugus-gugus fungsi yang lain sekarang sudah dibuat daftar dan susunannya, namun harus dihubungkan dengan informasi dari data-data spektroskopi yang lain seperti NMR (Field dkk, 1996).

2.8.3. Resonansi magnetik inti

Resonansi magnetik inti atau NMR adalah suatu tehnik karakterisasi yang sangat berguna untuk mengidentifikasi kerangka hidrokarbon yang merupakan tempat melekatnya gugus-gugus fungsi. NMR ^1H memberikan informasi jenis maupun jumlah hidrogen yang ada dalam molekul. NMR ^{13}C memberikan informasi mengenai karbon-karbon yang ada pada kerangka molekul. Biasanya kombinasi informasi yang didapat dari spektroskopi IR dan NMR telah dapat memberikan gambaran struktur molekul khususnya molekul-molekul yang kompleks (Wilcox dan Wilcox, 1994).

Sampel dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung khusus dan diletakkan di antara kutub magnet yang kuat. Signal frekuensi radio dikenakan pada sampel. Walaupun proton-proton berada dalam lingkungan yang sama, namun proton-proton tersebut tidak menyerap frekuensi yang sama. Jika proton lebih dekat ke gugus elektronegatif atau cincin aromatik maka signal akan bergeser ke frekuensi radio yang berbeda. Pergeseran ini dinamakan pergeseran kimia (Zubrick, 1987). Biasanya pergeseran kimia proton-proton yang ada di dalam molekul di bandingkan dengan tetrametilsilan (TMS). TMS dipilih sebagai standar karena memiliki keunggulan diantaranya: (1) relatif inert dan memiliki titik didih yang rendah ($26,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) sehingga dapat dengan mudah dihilangkan selesai pengukuran (2) memberikan puncak tunggal yang tajam baik dalam NMR ^1H dan ^{13}C (3) memiliki signal yang berada diluar dari signal senyawa-senyawa organik sehingga signal yang



dihasilkan tidak akan tumpang tindih (4) pergeseran kimia TMS tidak dipengaruhi oleh efek pelarut.

Pergeseran kimia dapat diukur dalam Hz namun biasanya dinyatakan dalam ppm (*part per million*).

$$\text{Pergeseran kimia} = \frac{10^6 \times \text{pergeseran kimia TMS dalam Hz}}{\text{Frekuensi spektrometer dalam Hz}}$$

2.8.4. Spektroskopi massa

Spektroskopi massa (*mass spectroscopy*, MS) memberikan informasi mengenai bobot molekul, komposisi dan bentuk fragmentasi molekul. Bobot molekul yang akurat sangat penting karena menjadi dasar untuk penentuan komposisi ataupun rumus molekul. Informasi tentang fragmentasi mungkin berguna untuk mendukung kesimpulan tentang struktur yang diajukan dan memungkinkan perbandingan dengan senyawa-senyawa yang telah dikenal (Zubrick, 1987). Bobot molekul maupun massa fragmen-fragmen dinyatakan dengan massa per muatan, m/e ($e = 1$) (Field dkk, 1996)

Molekul dalam bentuk uap diionisasi dengan 2 metode. Pertama, yang umum dilakukan adalah dengan dibombardir dengan elektron berenergi tinggi (*elektron impact*, EI). Tumbukan ini menyebabkan molekul kehilangan sebuah elektron membentuk spesi kation radikal (M^+). Selanjutnya ion molekul ini akan terionisasi menghasilkan molekul kecil netral atau fragmen-fragmen terionisasi. Ion-ion yang terbentuk akan masuk ke tabung analisator dan akan dikumpulkan dan selanjutnya akan dicatat berupa grafik dengan m/e pada sumbu X dan kelimpahan (%) pada sumbu Y. Kedua, ionisasi dapat dilakukan dengan cara kimia (*chemical ionization*, CI). Pada CI, molekul dalam bentuk uap diinjeksi ke dalam kamar pengion yang berisi reagen seperti CH_5^+ . Apabila molekul bereaksi dengan CH_5^+ , molekul akan menerima sebuah proton membentuk $(M+1)$ atau kehilangan proton membentuk $(M-1)$. Kedua jenis kation ini menyatakan bobot molekul. Selanjutnya molekul akan mengalami fragmentasi menghasilkan molekul kecil netral ataupun fragmen-fragmen bermuatan (Field dkk, 1996)