

Pengaruh Tingkat Kepolaran Solvent Terhadap Isolasi Xanthone dan Coumarine Pada Crude Ekstrak Daun Nyamplung

Agustina Borhet, Zulfira Tri Lutfiani, David Febriliant Susanto, Hakun Wirawasista Aparamarta, Arief Widjaya dan Setiyo Gunawan*.

Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri,
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

* gunawan@chem-eng.its.ac.id

Abstrak

Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) memiliki berbagai manfaat yang dapat dimanfaatkan mulai dari akar, batang, daun, hingga biji. Daun nyamplung mengandung banyak komponen bioaktif diantaranya xanthone dan coumarine yang bermanfaat sebagai penghambat aktivitas enzim dari HIV-1. Untuk mengisolasi komponen bioktif dari daun nyamplung, perlu dilakukan pemisahan antara kandungan polar dan non-polarnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui cara mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin serta mengetahui pengaruh tingkat kepolaran solven terhadap isolasi senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung dalam fraksi polar crude daun nyamplung. Crude ekstrak daun diperoleh dengan metode perkolasi. Lalu dilakukan pemisahan xanthone dan coumarine dengan metode LLE (*Liquid – liquid Extraction*). LLE dilakukan dengan pelarut methanol (polar) dan hexane (non-polar) dengan rasio pelarut 1:1. Kadar methanol yang digunakan adalah 20%, 50% dan 80% dan 100%. Fraksi polar dan non-polar diuji secara kualitatif menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan secara kuantitatif menggunakan GC untuk menganalisa kadar xanthone dan coumarine. Dari hasil penelitian, didapatkan hasil pemisahan terbaik pada 50% methanol dengan %recovery xanthone terbesar berada pada fraksi hexane (non polar) sebesar 12,12% (0,398%) dan tidak ada coumarin pada fraksi hexane (non polar).

Kata kunci : nyamplung, kepolaran, solvent, xanthone, coumarine

1. PENDAHULUAN

Tanaman *mangrove* atau yang lebih dikenal dengan sebutan tanaman bakau di Indonesia adalah tanaman yang memiliki banyak kegunaan dan sering dimanfaatkan oleh masyarakat, baik itu mulai dari akar sampai daun dari tumbuhan *mangrove* sendiri. Tanaman *mangrove* dapat ditemukan di daerah pesisir Indonesia, dimana 60% total *mangrove* yang tumbuh di Asia Tenggara tumbuh di wilayah Indonesia dengan sisanya tersebar di Malaysia (11,7%), Myanmar (8,8%), Papua Nugini (8,7%), dan Thailand (5,0%) (Giesen et al, 2006).

Salah satu jenis tanaman *mangrove* yang memiliki nilai ekonomis tinggi adalah tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*), tanaman ini dikatakan memiliki nilai ekonomis tinggi karena hampir semua bagian tanamannya (batang, daun, bunga, biji, dan getah) dapat menghasilkan berbagai macam produk yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Diantaranya, kayu pohon ini dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan papan tempat tinggal bagi manusia maupun kapal dan perabotan lainnya, akarnya berfungsi untuk menjaga daerah pantai dari abrasi. Selain itu, daun tanaman ini juga berfungsi untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti iritasi pada mata, migrain, dan vertigo (Ling, 2009).

Tanaman nyamplung mengandung banyak komponen kimia yang mengandung bahan bioaktif yang berkhasiat obat yaitu menghasilkan metabolit sekunder dari golongan *Non-nucleoside reverse transcriptase* dari HIV-1 (Pawar et al, 2007). Penelitian tentang isolasi senyawa kimia dari daun *C. Inophyllum* pernah dilakukan oleh Patil (1993), Khan (1996), dan Ali (1999). Penelitian mereka menghasilkan senyawa yang berbeda. Patil berhasil mengisolasi senyawa coumarin, Khan mengisolasi senyawa benzodipiranon, dan Ali mengisolasi senyawa turunan benzodipiranon, triterpenoid, dan steroid.

Su et al, (2008) menyebutkan bahwa menurut Filho (2009), pada berbagai bagian dari *Calophyllum inophyllum* mengandung komponen bioaktif, termasuk diantaranya adalah : xanthenes, coumarins, chromanones, tripenes, tripenoids dan steroids. Sedangkan menurut Ling (2009) tanaman ini mengandung senyawa fitokimia yang dapat digunakan sebagai obat untuk berbagai penyakit. Senyawa tersebut diantaranya: *Inophynone*, *Canophyllol*, *Canophylic acid*, *Calophyllolide*, *Inophyllolide*, *Jacareubin*, *Calanolide A*, *Calophynone*, dan lain lain. Menurut Thengane et al, (2006) disadur dari Yimdjo et al (2004) nyamplung mengandung *agents*

chemopreventive cancer, xanthone dan coumarins sebagai *antimicrobial activity*. Beberapa phyranocoumarin terisolasi dari genus *Calophyllum* yang menunjukkan aktivitas anti HIV-1 yang termasuk dalam NNRTI. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Laure et al. (2008) senyawa coumarin menunjukkan anti HIV yang termasuk kedalam NNRTI. Coumarin merupakan salah satu metabolit sekunder pada tumbuhan. Senyawa coumarin dan turunannya banyak memiliki aktivitas biologis diantaranya sebagai anti koagulan darah, antibiotik, dan ada juga yang menunjukkan aktivitas menghambat efek karsinogenik (Murray, 1982). Coumarin ditemukan hampir disetiap bagian tumbuh-tumbuhan mulai dari akar, batang, daun sampai bunga dan juga buah (Robinson,1995).

Penelitian mengenai komponen bioaktif pada spesies *C. inophyllum* banyak dilakukan di luar negeri. Isolasi senyawa xanthone dari kulit akar *C. inophyllum* yang pernah dilakukan menggunakan sampel tumbuhan dari Jepang (Inuma dkk., 1994), Kamerun (Yimdjo et al., 2004) dan Malaysia (Ee et al., 2009). Penelitian yang dilakukan Inuma, dari bagian kulit akar *C. inophyllum* yang tumbuh di Jepang dilaporkan telah diisolasi senyawa dari golongan xanthone dan flavonoid menggunakan metode *reflux*. Penelitian yang dilakukan Yimdjo, dari bagian kulit akar spesies ini yang tumbuh di Kamerun juga berhasil diisolasi senyawa dari golongan xanthone dan triterpenoid dengan metode maserasi. Senyawa xanthone baru juga berhasil diisolasi dari kulit akar *C. inophyllum* yang tumbuh di Malaysia dengan metode destilasi. Beberapa senyawa aromatik seperti calosanton A, inosanton, maclurasanton dan calosanton B dilaporkan mempunyai bioaktivitas seperti sitotoksik dan anti mikroba (Noldin dkk., 2006).

Sampai saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui potensi lain yang dapat dihasilkan dari tanaman ini. Namun, dari sekian banyak penelitian yang dilakukan, masih sedikit penelitian yang ditujukan untuk meneliti daun dan senyawa bioaktif yang terdapat didalamnya.

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu atau beberapa zat dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Pelarut tidak atau hanya sebagian larut dengan padatan atau cairan dengan kontak secara terus menerus agar zat yang diinginkan berpindah dari campuran padatan/cairan (*raffinate*) menuju pelarut (*extract*). Setelah pencampuran dua fase, proses pemisahan dilakukan dengan prinsip gravitasi atau dengan gaya sentrifugal (Gamse, 2004).

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan crude ekstrak daun nyamplung adalah perkolasi yaitu merendam bahan dengan menggunakan pelarut selama periode tertentu. Keuntungan dari proses ekstraksi dengan cara maserasi yaitu alat yang dibutuhkan sederhana, biaya operasi rendah, hemat penggunaan pelarut dan tanpa dilakukan pemanasan.

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa polar dan non polar dari daun nyamplung, hal yang perlu dilakukan adalah memisahkan antara kandungan polar dan non polarnya. Pemisahan ini berdasarkan *polarity index* pelarut yang digunakan. Pelarut polar akan mengisolasi senyawa polar dan pelarut non - polar akan mengisolasi senyawa non – polar. Air merupakan pelarut polar dengan *polarity index* sebesar 9. Sedangkan metanol merupakan senyawa agak polar dengan *polarity index* sebesar 5,1. Hexane merupakan pelarut non polar dengan *polarity index* sebesar 0 (Sadek, 2001). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam daun nyamplung akan terlarut pada pelarut polar begitu pun sebaliknya. Menurut Dailey (2015), air dan kombinasinya dengan pelarut organik biasa digunakan untuk mengekstraksi komponen bioaktif dari tumbuhan. Dari penelitiannya yang dilakukan untuk mengisolasi komponen bioaktif yaitu flavonoid pada kulit tanaman Macadamia, yield ekstraksi terbesar diperoleh pada penggunaan pelarut dengan konsentrasi methanol 50% dan ethanol 50%. Hal ini juga disebutkan oleh Franco (2008), bahwa penggunaan pelarut terbaik untuk mengekstrak komponen bioaktif umumnya dicapai dengan menggunakan kombinasi metanol dengan air. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui cara mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung dalam fraksi polar daun nyamplung dan mengetahui pengaruh tingkat kepolaran solven terhadap isolasi xanthone dan coumarin pada crude ekstrak daun nyamplung

2. METODOLOGI

Bahan

Daun nyamplung diperoleh dari Koperasi Jarak Lestari di Cilacap, Jawa Tengah. Bahan-bahan kimia seperti methanol, hexane, akuades, etil asetat, asam asetat dibeli dari sumber komersial. Standar xanthone dan coumarin yang diperoleh dari *Sigma Aldrich*.

Ekstraksi Solid - Liquid

Daun nyamplung yang sudah dicacah (1 kg) dilakukan perendaman dengan methanol teknis (3L) selama 3 hari. Setelah 3 hari, campuran disaring dan hasil ekstraksi di distilasi pada suhu 80°C untuk menghilangkan kandungan methanol sehingga hasil yang didapat berupa crude ekstrak daun nyamplung.

Ekstraksi liquid-liquid

Crude ekstrak sebanyak 12 gr dimasukkan kedalam beaker glass untuk dicampur dengan 150 gr methanol dengan konsentrasi methanol 20; 50; 80 dan 99,9% kemudian dilakukan pengadukan selama 30 menit dengan magnetik stirer. Setelah selesai pengadukan, campuran ditambahkan dengan hexane 150 gr kemudian dilakukan pengadukan kembali selama 30 menit. Setelah pengadukan selesai, seluruh campuran dimasukkan kedalam corong pemisah. Di dalam corong pemisah, campuran akan terpisah menjadi dua layer. Layer atas berupa hexane (non-polar) dan layer bawah berupa methanol (polar). Kedua layer kemudian dipisahkan untuk dianalisa kandungan komponen bioaktifnya.

Analisa Xanthone dan Coumarin dengan TLC (Thin Layer Chromatography)

Untuk mengetahui secara kualitatif kandungan xanthone dan coumarin dalam crude ekstrak daun nyamplung digunakan TLC *plate*. Sebelum uji TLC mula-mula kertas TLC yang telah ditetesi oleh sampel direndam dalam *mobile phase* dengan kadar hexane: etil asetat: asam asetat sebesar 90:10:1. Pada saat perendaman tidak diperkenankan tinggi *mobile phase* melebihi area yang telah ditentukan pada kertas TLC. Setelah perendaman dengan *mobile phase* dalam botol tertutup rapat, kertas TLC dikeringkan pada suhu ruang kemudian disinari dengan menggunakan lampu UV gelombang 360 nm dan 254 nm. Dari hasil penyinaran dengan menggunakan lampu UV pada kertas TLC dapat terlihat spot beberapa komponen bioaktif sehingga dapat diketahui secara kualitatif ada tidaknya xanthone dan coumarin.

Analisa Xanthone dan Coumarin dengan GC (Gas Chromatography)

Kandungan xanthone dan coumarin dalam tiap fraksi dianalisa dengan GC. Kurva kalibrasi standar eksternal diperoleh dengan 0,2-20 mg standard murni. Analisa kromatografi dilakukan pada pelat TLC dan Shimadzu GC-2010 (Kyoto, Japan) Gas Chromatography yang dilengkapi dengan *Flame Ionization Detector*. Separasi dilakukan dengan DB-5HT (5%-phenyl)-methylpolysiloxane non-polar column (15m x 0,32mm i.d.; Agilent Tech. Palo Alto, California). Temperatur injektor dan detector diset pada suhu 310°C. Temperatur kolom dimulai pada 80 °C dan dinaikkan sampai 300 °C dengan rate 15°C/menit. 20 mg sampel dilarutkan dalam 1mL etil asetat, dan 1 µL sampel diambil dan diinjeksikan ke dalam GC.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) memiliki berbagai manfaat yang dapat dimanfaatkan mulai dari akar, batang, daun, hingga biji. Daun nyamplung mengandung banyak komponen bioaktif diantaranya xanthone dan coumarine yang bermanfaat sebagai penghambat aktivitas enzim dari HIV-1. Untuk mengisolasi komponen bioktif dari daun nyamplung, perlu dilakukan pemisahan antara kandungan polar dan non-polarnya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui cara mengisolasi senyawa xanthone dan coumarin serta mengetahui pengaruh tingkat kepolaran solven terhadap isolasi senyawa xanthone dan coumarin yang terkandung dalam fraksi polar crude daun nyamplung. Dengan ini, diharapkan %recovery terbesar coumarin berada pada fraksi polar dan %recovery xanthone terbesar berada pada fraksi non-polar. Proses untuk mendapatkan crude ekstrak daun dilakukan dengan ekstrasi secara perkolasi dan proses pemisahan senyawa polar dan non-polar dengan metode ekstraksi liquid-liquid.

Hasil dari penelitian ini dilakukan analisa secara kualitatif dengan TLC dan analisa secara kuantitatif dengan GC untuk mengetahui kadar xanthone dan coumarin pada fraksi polar dan non-polar sampel.

Pemisahan dengan Ekstraksi Solid-Liquid

Solid yang digunakan merupakan cacahan daun nyamplung kering sebanyak 1 kg dan liquid yang digunakan merupakan metanol teknis sebanyak 3 L. Penggunaan pelarut metanol pada proses ekstraksi solid-liquid ini dikarenakan % yield ekstrak daun yang diperoleh akan lebih besar dibandingkan jika menggunakan petroleum eter dan kloroform, selain itu kumarin dan xanthone termasuk ke dalam fraksi polar sehingga senyawa tersebut dapat terisolasi dari daun jika digunakan metanol (Indrakumar et al, 2012). Perendaman dilakukan selama 3 hari setelah itu disaring. Kemudian filtrat di distilasi untuk menghilangkan kandungan methanolnya. Hasil distilasi disebut crude ekstrak.

Pemurnian dengan Ekstraksi Liquid-Liquid

Metode ekstraksi liquid-liquid ini menggunakan pelarut methanol kombinasi dengan air sebagai pelarut polar dan hexane teknis sebagai pelarut non polar. Pemilihan pelarut ini berdasarkan pada indeks polaritas, di mana metanol adalah senyawa agak polar dengan indeks polaritas sebesar 5,1; air adalah senyawa sangat polar

dengan index polarity sebesar 9 dan hexane adalah senyawa non polar dengan index polarity sebesar 0. Pelarut methanol kombinasi dengan air sebagai pelarut polar diharapkan dapat melarutkan senyawa polar yang terkandung dalam *crude* dan senyawa tidak polarnya akan terlarut dalam pelarut hexane.

Proses ekstraksi ini dimulai dengan penimbangan *crude* ekstrak sebanyak 12 gr. *Crude* ekstrak yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian ditambahkan methanol dengan variabel konsentrasi 20; 50; 80 dan 99.9% sebanyak 150 gr. Campuran *crude* dan methanol ini kemudian diaduk menggunakan *stirrer* magnetik selama 30 menit. Langkah ini bertujuan agar methanol mengikat seluruh komponen polar di dalam *crude* terlebih dahulu. Setelah 30 menit, kemudian ditambahkan hexane sebanyak 150 gr ke dalam campuran *crude* dan metanol yang telah diaduk. Pada pengadukan kedua yang juga dilakukan selama 30 menit, komponen yang agak polar sampai non-polar akan terikat di dalam hexane. Dalam *beaker glass* tersebut, akan terbentuk 3 layer, layer bawah adalah *crude* yang tidak larut yang selanjutnya akan disebut sebagai fraksi solid, layer tengah adalah fraksi methanol-air dan layer paling atas adalah fraksi hexane. Fraksi solid yang tidak larut dipisahkan dari fraksi methanol-air dan fraksi hexane, dan kemudian fraksi methanol dan hexane dipindahkan ke dalam corong pemisah. Pada tahap ini, akan terlihat dua fraksi yaitu fraksi methanol-air (fraksi polar) dan fraksi hexane (fraksi non-polar). Berikut adalah gambaran *layer* yang terbentuk saat ekstraksi liquid – liquid.



Gambar 1. Layer di corong pemisah

Pada **Gambar 1**, terdapat dua bagian, dimana bagian atas adalah *layer* hexane yang melarutkan fraksi non-polar, dan bagian bawah adalah *layer* methanol-air yang melarutkan fraksi polar. Setelah terpisah, kedua *layer* masing-masing dianalisa untuk mengetahui komponen bioaktifnya.

Analisa Xanthone dan Coumarin dengan TLC (Thin Layer Chromatography)

Selanjutnya dilakukan analisa secara kualitatif menggunakan TLC untuk masing-masing fraksi dan dibandingkan dengan *crude*. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Hasil analisa TLC menggunakan lampu UV. (a) *crude* daun nyamplung; (b) fraksi polar; dan (c) fraksi non-polar

Berdasarkan hasil TLC diatas, spot xanthone dan coumarin terlihat tidak terlalu jelas karena secara kuantitas komponen xanthone dan coumarin jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan komponen bioaktif lainnya.

Analisa Xanthone dan Coumarin dengan GC (Gas Chromatography)

Masing-masing fraksi dianalisa dengan GC untuk mengetahui secara kuantitas kandungan xanthone dan coumarinnya. Berikut tabel hasil analisa GC pada masing-masing fraksi.

Tabel 1. %Wt dan %Recovery Hasil Analisa GC *Crude* pada Berbagai Variabel Konsentrasi Methanol

Konsentrasi Methanol	Fraksi Methanol		Fraksi Solid		Fraksi Hexane	
	Coumarin	Xanthone	Coumarine	Xanthone	Coumarine	Xanthone

20% (% wt)	0,053%	0,038%	0,093%	0,287%	0,102%	0,284%
% recovery	1,042%	0,256%	88,904%	90,097%	10,054%	9,647%
50% (% wt)	0,027%	0,024%	0,084%	0,228%	0%	0,398%
% recovery	3,355%	1,020%	96,645%	86,864%	0%	12,117%
80% (% wt)	0,054%	0,017%	0,096%	0,260%	0,116%	0,220%
% recovery	15,693%	1,744%	75,564%	92,535%	8,744%	5,721%
100% (% wt)	0,092%	0,111%	-	-	0,097%	0,449%
% recovery	27,468%	11,459%	-	-	72,532%	88,541%

%Wt menunjukkan kemurnian komponen dalam tiap fraksi. %Recovery merupakan perbandingan antara masa komponen dalam masing – masing fraksi dengan masa komponen dalam *crude* daun. Pada penelitian ini diharapkan xanthone dan coumarine terpisah sempurna. Hal ini dapat dibuktikan dengan %recovery xanthone di fraksi polar (methanol) seharusnya lebih kecil karena sifatnya yang lebih non polar dibandingkan dengan coumarine, sedangkan %recovery coumarine di fraksi polar (methanol) diharapkan lebih besar karena sifatnya yang lebih polar. Dari **Tabel 1**, menunjukkan bahwa pada variabel 50% methanol, %recovery coumarin pada fraksi hexane (non polar) adalah 0%, sedangkan %recovery xanthone pada fraksi hexane (12,12%) lebih besar daripada %recovery xanthone pada fraksi methanol (1,02%). Dari hasil GC, diketahui bahwa tidak ada coumarin pada fraksi hexane (non polar), sehingga coumarin dan xanthone terpisah sempurna pada variabel 50% methanol. Dari **Tabel 1**, juga dapat dilihat bahwa semakin murni methanol yang digunakan, pemisahan terhadap xanthone dan coumarin tidak terlalu bagus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Franco (2008), bahwa penggunaan pelarut terbaik untuk mengekstrak komponen bioaktif umumnya dicapai dengan menggunakan kombinasi metanol dengan air.

4. KESIMPULAN

Dari data yang telah dipelajari, didapatkan hasil pemisahan terbaik pada 50% methanol dengan %recovery xanthone terbesar berada pada fraksi hexane (non polar) sebesar 12,12% (0,398%) dan tidak ada coumarin pada fraksi hexane (non polar).

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didukung oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemristek Dikti) dan beasiswa PMDSU (056136/IT2.11/PN.08/2016) oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Indonesia. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dewi Puspita Sari dan Bapak Mukti Utomo atas dukungan secara teknis.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Adriana, D., and Quan, V.V., 2015. Effect of Extraction Solvent on Recovery of Bioactive Compounds and Antioxidant Properties from Macadamia (*Macadamia tertaphylla*) Skin Waste. *Cogent food & agriculture*. 1-10
- Cechinel Filho, V., Junior, I.F.S., Zacchino, S.A., Lima, J.C.S., and Martins, DTO., 2009. Antimicrobial Screening of Some Medicinal Plants from Mato Grosso Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognory* 19 (1B): 242-248.
- Ling, K.H., Kian, C.T., and Hoon, T.C., 2009. *A Guide to Medicinal Plant*. Singapore World Scientific.
- Sadek, P. 2002. *The HPLC Solvent Guide*. United States of America: Wiley of Interscience
- Su, X.H., Zhang, M.L., Li, L.G., Huo, C.H., Gu, Y.C.2008. "Chemical Constituent of The Plants of The Genus *Calophyllum*". *Chemistry & Biodiversity* (5), 2579-2608.
- Yimdjo, M.C., Azebaze A.G., Nkengfack A.E., Meyer, A.M., Bodo, B., and Fomum, Z.T., 2004. Antimicrobial and Cytotoxic Agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. 65: 2789-2795.

