

BAB IV

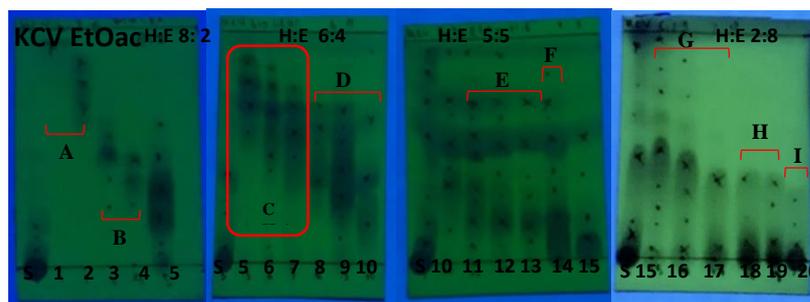
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi dan Isolasi Metabolit Sekunder dari Batang *R. Tomentosa*

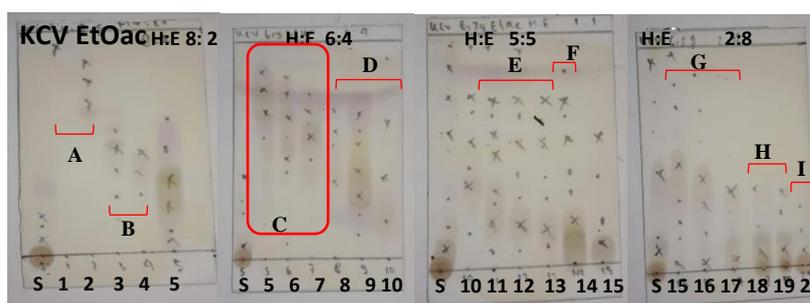
Serbuk kering batang *R. Tomentosa* sebanyak 2 kg telah diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan dengan 3 kali pengulangan masing-masing menggunakan 6L metanol selama 24 jam. Metanol memiliki daya ekstraksi yang luas karena metanol memiliki ukuran yang kecil sehingga dapat menyari senyawa metabolit sekunder (Saifudin, 2014). Evaporasi terhadap ekstrak metanol menghasilkan ekstrak sebanyak 81,27 g. Pemisahan secara ekstraksi cair-cair dilakukan terhadap 58,60 g ekstrak kasar metanol, menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat dimulai dari *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol. Prinsip dari ekstraksi cair-cair adalah distribusi zat terlarut diantara 2 pelarut yang tak saling bercampur (Wells, 2004). Senyawa-senyawa yang bersifat non-polar akan terekstrak kedalam pelarut *n*-heksana, senyawa-senyawa yang bersifat semi polar akan terekstrak kedalam etil asetat, sedangkan senyawa lebih polar dari metanol akan terekstrak ke dalam pelarut *n*-butanol. Ekstraksi cair-cair menghasilkan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol berturut-turut sebanyak 3,79; 9,26; dan 2,8 g setelah diuapkan pelarutnya.

Sebelum dilakukan pemisahan lebih lanjut terlebih dahulu dilakukan uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase terhadap ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, dan diperoleh nilai IC₅₀ masing-masingnya adalah 21,36; 530,64; 44,86; dan 11,72 ppm. Berdasarkan data yang diperoleh memperlihatkan *n*-butanol memiliki nilai IC₅₀ yang terendah, namun massa *n*-butanol yang diperoleh tidak mencukupi untuk dipisahkan lebih lanjut sehingga etil asetat yang dilakukan pemisahan lebih lanjut. Fraksi etil asetat sebanyak 8,3 g dilakukan pemisahan dengan kromatografi cair vakum (KCV) dengan fase diam silika gel dan fase gerak yang digunakan adalah campuran *n*-heksana:etil asetat dengan komposisi sebagai berikut 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 dan etil asetat: metanol 2:8, setelah masing-masing fraksi ditampung dengan botol diuji KLT(H:EA, 8:2, 6:4, 5:5, dan 2:8) . Selanjutnya fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabung dari hasil penggabungan diperoleh 9 fraksi utama A-I

sebagaimana dapat dilihat Tabel 1.



(a)



(b)

Gambar 1. Kromatogram KLT hasil KCV fraksi etil asetat disinari lampu UV λ 256 nm (a) dan setelah disemprotkan serum sulfat (b)

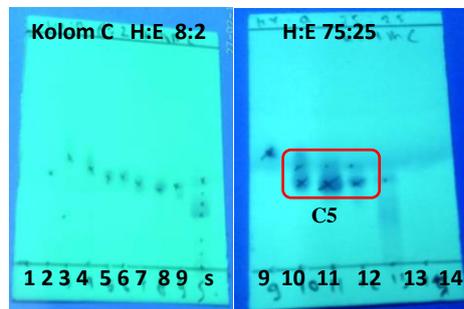
Tabel 1. Penggabungan eluat hasil pemisahan terhadap ekstrak metanol batang karamunting menggunakan KCV.

Fraksi KCV (no. vial)	Berat total (mg)
A (1-2)	61,4
B (3-4)	180,6
C (5-7)	264,2
D (8-10)	298,0
E (11-13)	246,4
F (14)	209,3
G (15-17)	556,9
H (18-19)	1216,4
I (20)	1823,4

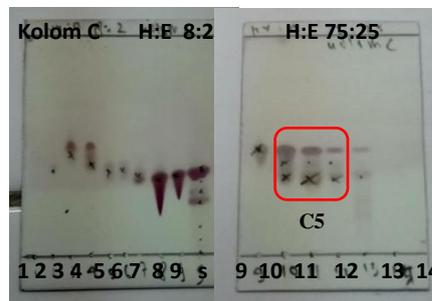
Seluruh fraksi memperlihatkan spot yang berpendar dibawah lampu UV λ 256 nm (Gambar 10), hal ini mengindikasikan adanya senyawa yang mempunyai inti aromatik atau ikatan rangkap terkonjugasi, selain itu terdapatnya senyawa-senyawa terpenoid dan flavonoid yang ditandai dengan muncul spot berwarna ungu dan kuning saat disemprot dengan serum sulfat. Fraksi C dipilih untuk dilakukan

pemisahan lebih lanjut karena pola noda lebih sederhana dan terlihat jelas dilampu UV maupun disemprot dengan serum sulfat.

Pemisahan fraksi C seberat 246 mg dilakukan dengan kromatografi kolom gravitasi. Fase gerak yang digunakan berupa (*n*-heksana : aseton) dengan perbandingan (10:0, 9,5:5, 9:1, 8,5:15, dan aseton 0:10), dengan fase diam berupa silika gel. Penggabungan terhadap eluat yang memiliki pola noda yang sama baik saat berpendar di lampu UV maupun setelah disemprot serum sulfat menghasilkan 6 fraksi yaitu C1-C6. Penggabungan eluat tersebut dapat dilihat Tabel 2, sedangkan kromatogram hasil pemisahan fraksi C dapat dilihat pada Gambar 11.



(a)



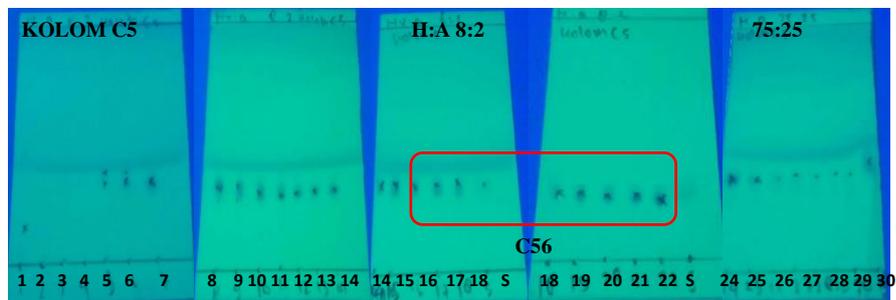
(b)

Gambar 2. Kromatogram KLT hasil pemisahan fraksi C dengan perbandingan eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2, 7,5:2,5) di bawah lampu UV λ 256 nm (a) disemprot serum sulfat (b).

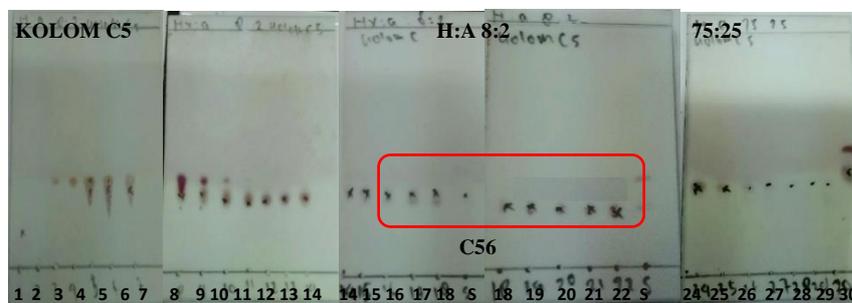
Tabel 2. Penggabungan eluat hasil pemisahan terhadap fraksi C menggunakan kromatografi kolom.

Fraksi KCV (no. vial)	Berat total (mg)
C1 (1-4)	6,6
C2 (5-6)	4,2
C3 (7)	3,2
C4 (8-9)	28,2
C5 (10-12)	67,6
C6 (13-15)	9,85

Fraksi C5 mempunyai noda yang berpendar jelas di bawah lampu UV dan saat disemprot serum sulfat memperlihatkan noda berwarna ungu, selain itu jumlah yang mencukupi, namun masih terdapat adanya noda lain sehingga dilakukan pemisahan lebih lanjut. Pemisahan fraksi C5 dengan cara kromatografi kolom gravitasi menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak menggunakan perbandingan eluen sama seperti diatas. Penggabungan terhadap eluat yang memiliki noda yang sama baik saat berpendar di lampu UV dan disemprot serum sulfat menghasilkan 7 fraksi berupa C51-C57 (Tabel 3). Kromatogram hasil pemisahan kromatografi kolom fraksi C dapat dilihat pada Gambar 12.



(a)



(b)

Gambar 3. Kromatogram KLT fraksi C5 di bawah lampu UV λ 256 nm (a) disemprot serum sulfat (b)

Tabel 3. Penggabungan eluat hasil pemisahan terhadap fraksi C5

Fraksi C5 (no. vial)	Berat total (mg)
C51 (3-4)	1,0
C52 (5-8)	3,3
C53 (9-10)	2,8
C54 (11-12)	1,0
C55 (13-15)	2,5
C56 (16-25)	21,0
C57 (26-30)	2,4

Fraksi C56 menunjukkan satu noda yang berpendar di bawah lampu UV dan berwarna ungu saat disemprot dengan serium sulfat. Setelah pelarut menguap fraksi C56 menghasilkan padatan berwarna putih kekuning-kuningan, sebanyak 21 mg. Persentase hasil senyawa isolasi yang didapat dari ekstrak metanol sebesar 0,036 %.

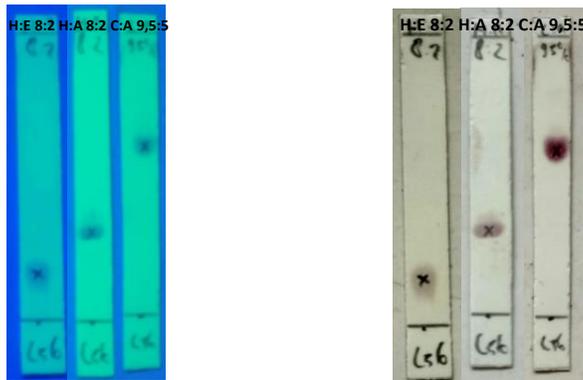


Gambar 4. Senyawa hasil isolasi (C56) dari ekstrak metanol batang karamunting (*Rhodomyrtus tomentosa*).

4.2 Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi.

Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan dua cara yaitu dengan analisis KLT dan uji titik leleh. Analisis dengan KLT dilakukan menggunakan tiga sistem eluen yang berbeda, *n*-heksana : etil asetat (8:2), *n*-heksana : aseton (8:2), dan kloroform : aseton (9,5:5). Hasil kromatogram KLT senyawa C56 dapat dilihat pada (Gambar 14), pada berbagai sistem eluen tersebut selalu menunjukkan satu noda di bawah lampu UV maupun saat disemprot serum sulfat. Nilai R_f dari hasil KLT berturut-turut adalah 0,17; 0,32; dan 0,62.

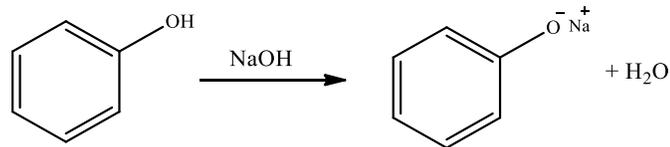
Pengujian titik leleh menunjukkan bahwa senyawa murni hasil isolasi (fraksi C56) tersebut mengalami dekomposisi pada suhu 182,°C. Berdasarkan hasil analisis KLT menggunakan tiga sistem eluen memperlihatkan tetap satu noda pada masing-masing kromatogram dan hasil uji titik leleh mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi (C56) telah murni.



Gambar 5. Kromatogram hasil KLT senyawa hasil isolasi menggunakan variasi tiga sistem eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2), *n*-heksana : aseton (8:2), dan kloroform : aseton (95:5).

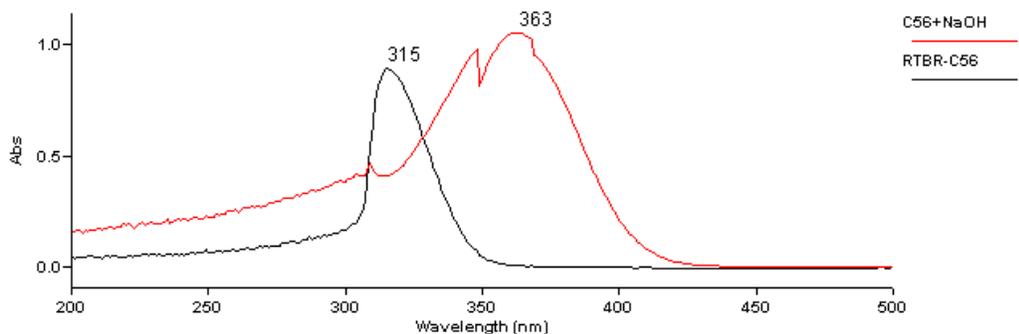
4.3 Identifikasi Struktur Senyawa Hasil Isolasi dengan Spektrum UV, IR, dan NMR.

Berdasarkan uji KLT tiga sistem eluen senyawa hasil isolasi berpendar dibawah lampu UV, dan noda saat disemprot serium sulfat memperlihatkan warna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi memiliki suatu sistem aromatik dan adanya senyawa terpenoid, namun untuk membuktikan hal tersebut diperlukan data-data dari spektroskop UV, IR, NMR (^1H , ^{13}C , HSQC, dan HMBC). Spektrum UV dalam pelarut metanol memberikan nilai λ_{maks} sebesar 315 nm dengan intensitas tinggi yang menunjukkan adanya transisi elektron dari π ke π^* dari ikatan rangkap terkonjugasi. Penambahan pereaksi geser NaOH menyebabkan adanya pergeseran λ_{maks} dari 315 ke 363 nm. Adanya pergeseran batokromik saat penambahan NaOH karena memiliki OH bebas pada cincin aromatik, dimana saat penambahan NaOH terjadi ionisasi dari gugus hidroksil dari fenol membentuk natrium fenolat yang menyebabkan pergeseran batokromik sebesar 48 nm reaksi dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 6. Reaksi senyawa fenolik ditambah pereaksi NaOH(Markham, 1988).

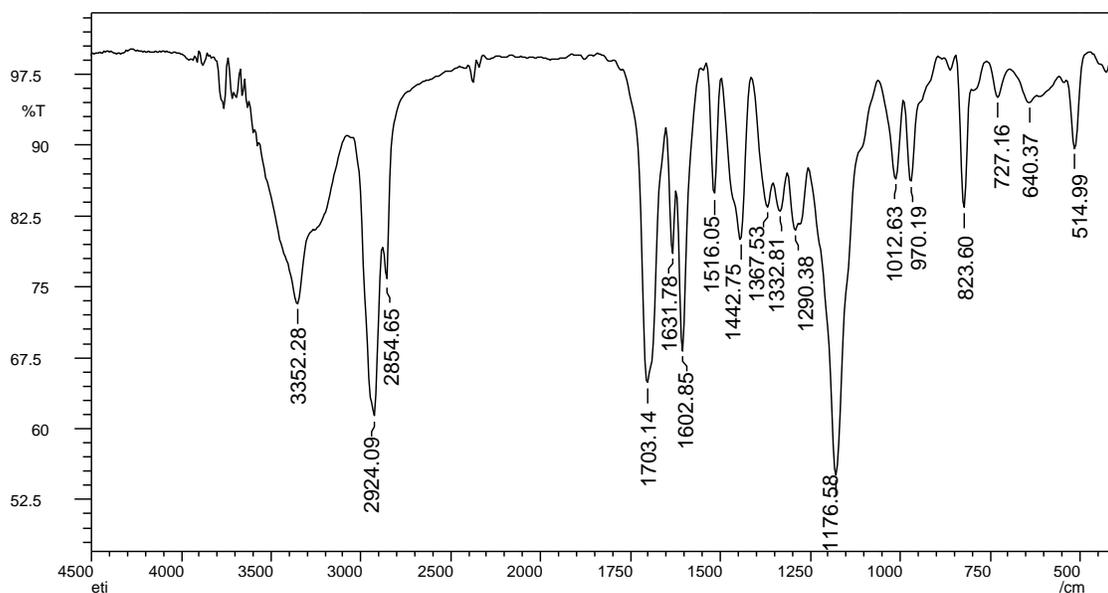
Lazimnya senyawa fenolik mempunyai serapan pita sekunder pada 270 nm (Pavia *et al.*, 2015), namun senyawa hasil isolasi memiliki nilai λ_{maks} 315 nm. Hal ini mengindikasikan sistem fenol pada senyawa hasil isolasi mempunyai perpanjangan konjugasi dengan suatu ikatan rangkap lainnya.



Gambar 7. Spektrum UV senyawa hasil isolasi dalam pelarut metanol dan setelah penambahan NaOH.

Spektrum IR senyawa hasil isolasi (Gambar 17) menunjukkan adanya bagian aromatik dan alifatik. Gambar 17 juga memperlihatkan vibrasi dari C=C aromatik pada bilangan gelombang 1516-1631 cm^{-1} , yang didukung dengan vibrasi C-H tekuk luar bidang (aromatik) pada bilangan gelombang 823 cm^{-1} hal ini mengindikasikan adanya sistem *para*-aromatik. Selain itu terdapat ulur C=C terkonjugasi pada bilangan gelombang 1602 cm^{-1} dan diperkuat dengan vibrasi tekuk luar bidang dari C-H pada bilangan gelombang 970-1012 cm^{-1} yang menunjukkan adanya sistem trans alkena. Spektrum IR juga menunjukkan adanya gugus O-H yang muncul pada bilangan gelombang 3352 cm^{-1} , dan didukung dengan vibrasi C-O pada panjang gelombang 1176 cm^{-1} . Puncak yang tajam dengan intensitas tinggi pada bilangan gelombang 1703 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=O dari karboksilat, dimana vibrasi ulur C=O asam karboksilat, menurut Pavia *et al.*, (2015) biasanya muncul pada bilangan gelombang 1700-1725 cm^{-1} . Selain itu juga terlihat puncak pada 1631 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karbonil lainnya yang diperkirakan dari gugus ester yang terkonjugasi dengan ikatan rangkap dua. Hal ini sesuai seperti yang dikatakan oleh Silverstein (1986) dimana serapan vinil ester terlihat pada bilangan gelombang 1660-1610 cm^{-1} .

Vibrasi ulur C-H alifatik muncul pada 2924 dan 2854 cm^{-1} , sedangkan vibrasi C-H tekuk muncul pada bilangan gelombang 1442 cm^{-1} . Spektrum IR memperlihatkan adanya gugus geminal dimetil yang muncul berupa dua puncak dengan intensitas yang sama pada bilangan gelombang 1332 dan 1367 cm^{-1} . Berdasarkan spektrum IR ini diperkirakan senyawa hasil isolasi memiliki sistem *para*-aromatik, gugus *trans*-alkena terkonjugasi dengan ikatan rangkap, mempunyai gugus karbonil dari asam karboksilat dan ester dan adanya sistem alifatik yang mempunyai geminal dimetil yang karakteristik untuk senyawa golongan triterpenoid.

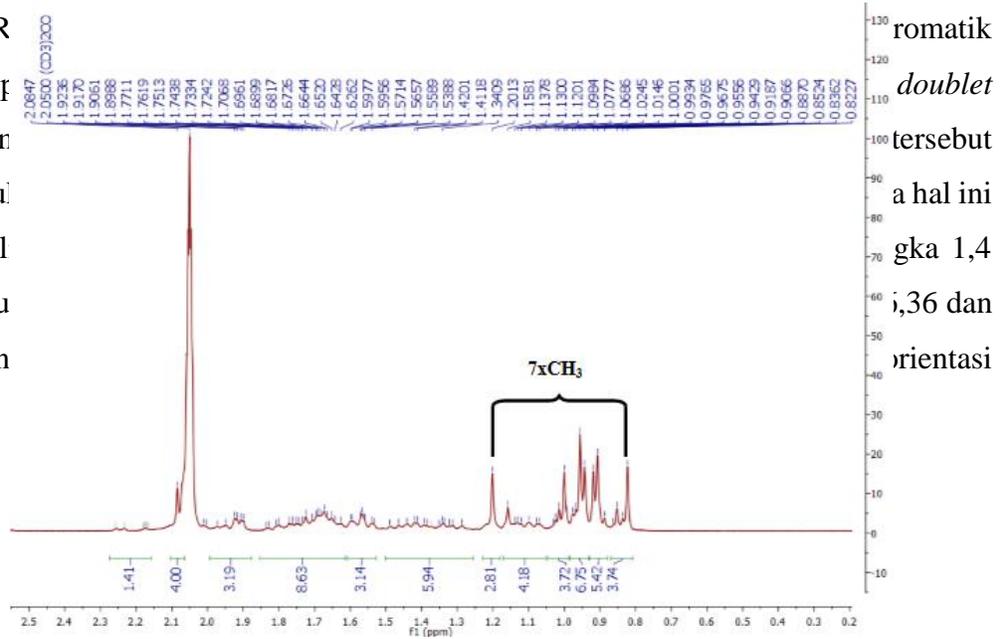


Gambar 8. Spektrum IR senyawa hasil isolasi

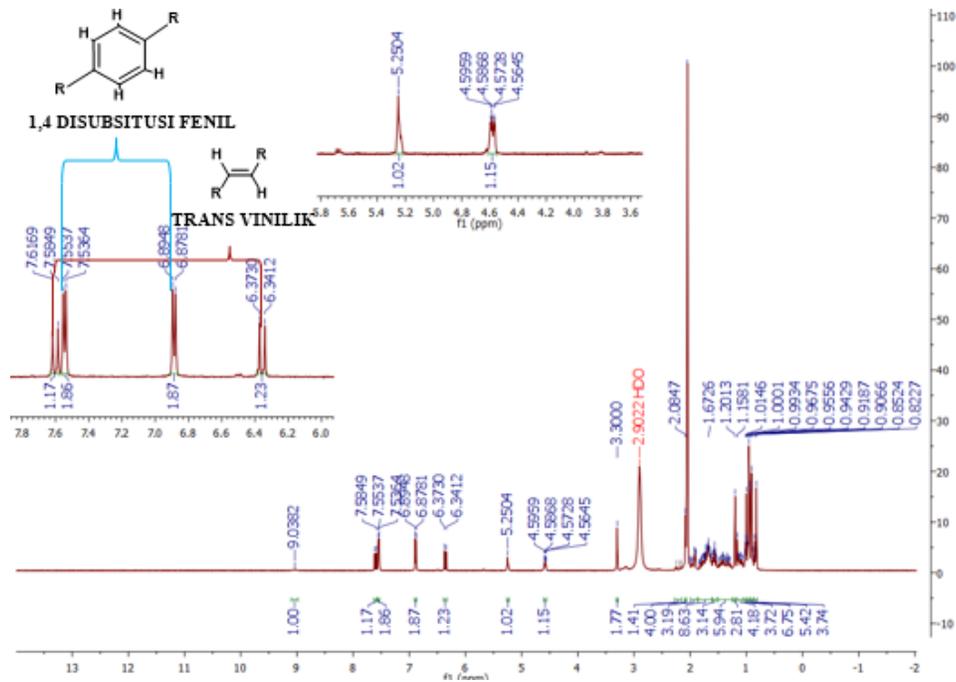
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, aseton d_6) menunjukkan adanya proton yang muncul pada bagian aromatik dan alifatik. Gambar 19 menunjukkan adanya sinyal pada δ_{H} 9,0 singlet (*s, broad*) yang mengindikasikan adanya gugus OH pada senyawa hasil isolasi. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ pada daerah alifatik (Gambar 18) menunjukkan adanya 7 sinyal singlet yang berasal dari 7 buah gugus metil, sinyal tersebut berada pada δ_{H} 0,82; 0,91; 0,92; 0,94; 0,96; 1,00; dan 1,20 (3H, *s*). Adanya 7 sinyal metil singlet tersebut mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi mempunyai unit triterpenoid dengan kerangka oleanan, dimana satu gugus metilnya telah mengalami oksidasi, karena lazimnya kerangka oleanan mempunyai 8 gugus metil singlet. Selain

itu terdapat sinyal pada δ_H 4,58 (1H, *br dd* $J= 11,3; 4,5$) (Gambar 19). Proton tersebut berada pada daerah yang kurang terlindungi akibat proton tersebut terikat pada oksigen karbon. Sinyal lainnya muncul *broad triplet* (*br, t*) pada δ_H 5,25 untuk satu proton. Sinyal tersebut berasal dari proton yang terikat dengan karbon sp^2 (H-C=C) Spektrum

1H -NMR muncul *r* (d) dan r menunjuki memperl disubsitu 7,6 dan trans.

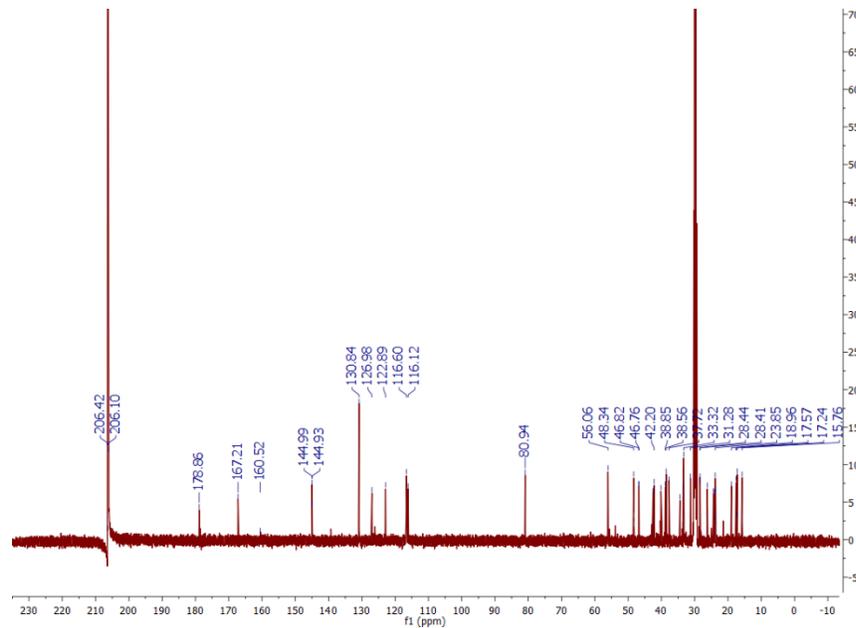


Gambar 9. Spektrum 1H NMR senyawa hasil isolasi pada daerah 1,00-3,00 ppm



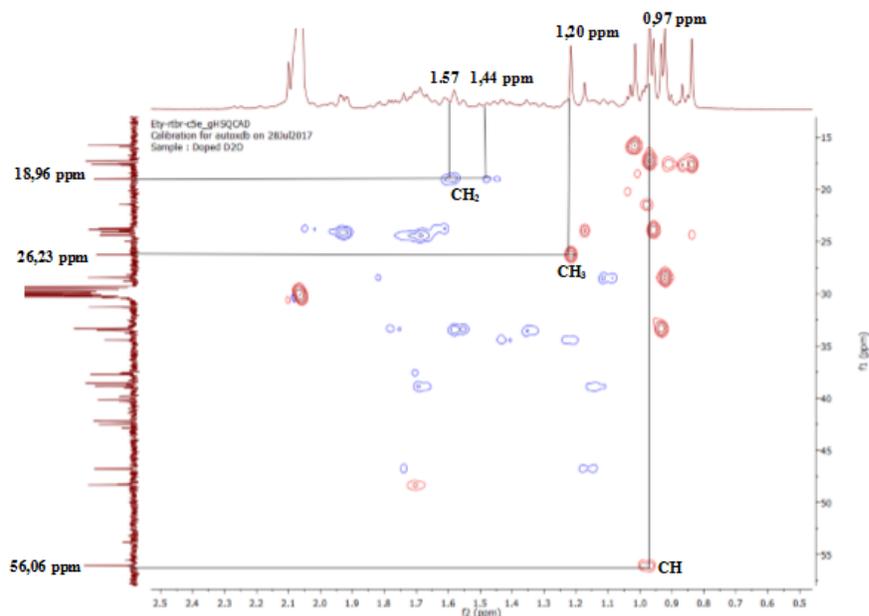
Gambar 10. Spektrum ¹H-NMR senyawa hasil isolasi

Spektrum ¹³C-NMR (Gambar 20) menunjukkan ada 39 karbon diperkirakan terdapat 2 karbon yang ekuivalen pada sistem aromatik. Spektrum ¹³C-NMR terbagi karbon sp² (180-100 ppm) dan karbon sp³ (100-10 ppm). Pada spektrum terlihat dua sinyal karbon dari karbonil pada Sinyal di daerah karbonil terlihat pada δ_C 178,8 dan 167,2, sinyal ini dilihat dari pergeseran kimianya diperkirakan masing-masingnya adalah karbonil dari asam karboksilat dan ester yang terkonjugasi.



Gambar 11. Spektrum ^{13}C NMR senyawa hasil isolasi.

Spektrum HSQC (*Heteronuclear Single Quantum coherence*) adalah eksperimen yang menunjukkan korelasi antara karbon dengan proton yang terikat langsung pada karbon tersebut. Spektrum HSQC juga membantu membedakan antara karbon metil, metilen dan metin, dimana karbon metil muncul dengan kontur merah besar dan jelas, sedangkan metin kontur merah berukuran kecil. Karbon metilen diketahui dengan dilihat dari kontur berwarna biru dan terkadang terbelah sesuai dengan protonnya, sedangkan untuk karbon kuartener tidak terlihat korelasi dari analisis tersebut. Pada spektrum HSQC terlihat tujuh sinyal metil pada δ_{C} 15,8; 17,2; 17,6; 23,9; 26,2; 28,4; 33,3 dan sepuluh sinyal metilen pada δ_{C} 19,0; 23,7; 24,1; 24,4; 28,4; 33,5; 33,5; 34,4; 38,8; 46,8, empat karbon metin dan delapan karbon kuartener. Sebagai contoh analisis HSQC terlihat korelasi antara karbon metilen pada δ_{C} 18,96 dengan proton δ_{H} 1,57 dan 1,44 pada Gambar 21, korelasi HSQC lainnya dapat dilihat pada Tabel 4.

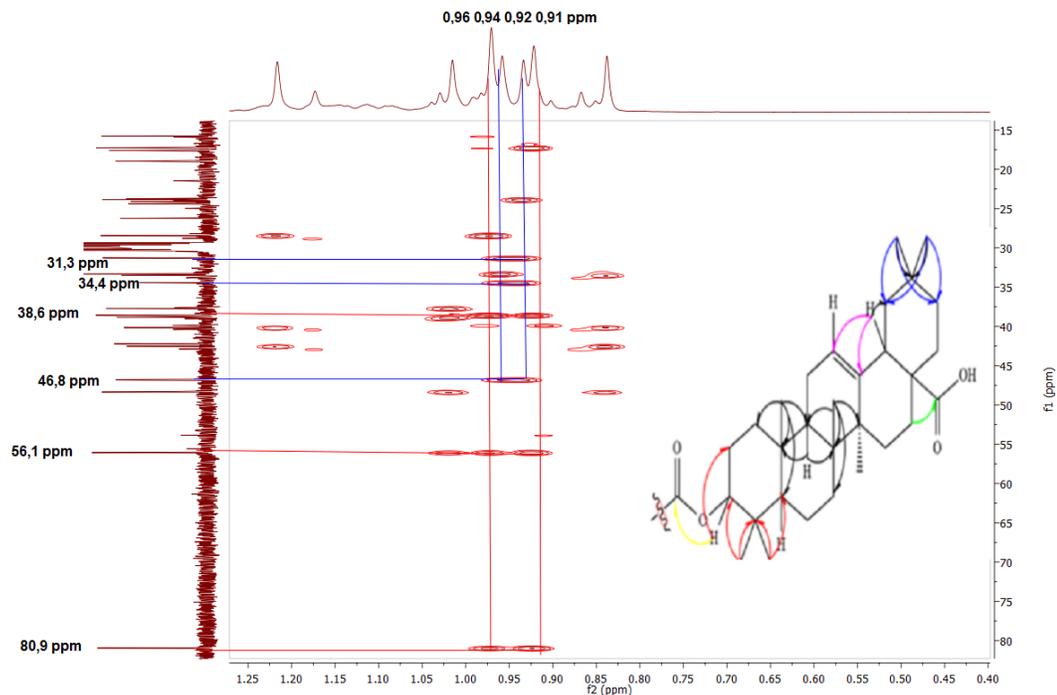


Gambar 12. Beberapa contoh penentuan karbon metil, metin dan metilen pada Spektrum HSQC

Berdasarkan data $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ dan HSQC ini memperkuat dugaan senyawa hasil isolasi merupakan senyawa triterpenoid kerangka oleanan yang tersubstitusi dengan suatu senyawa 1,4 disubstitusi fenil dan terdapat dua buah karbonil dari asam karboksilat dan ester. Posisi masing-masing karbon ditentukan berdasarkan analisis menggunakan HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Corelation*). Spektrum HMBC merupakan korelasi suatu proton dengan karbon yang berjarak dua atau tiga ikatan.

Spektrum HMBC bagian alifatik (Gambar 22) memperlihatkan korelasi proton oksidasi karbon pada δ_{H} 4,58 ppm dengan dua karbon metil pada 17,2 dan 28,4 ppm, dan satu karbon metilen pada δ_{C} 24,4 ppm. Dua proton dari karbon metil pada δ_{H} 0,96 dan 0,91 berkorelasi dengan oksidasi karbon pada δ_{C} 80,9, dengan karbon metin, pada δ_{C} 56,1 dan karbon kuartener pada C-4, menandakan bahwa pada C-4 terikat sebuah geminal dimetil yang karakteristik untuk senyawa triterpenoid. Adanya korelasi proton metilen pada δ_{H} 1,91 dengan karbon vinilik pada δ_{C} 122,9 dan karbon kuartener 144,9 menunjukkan adanya suatu vinilik yang khas C-13 C-14 senyawa triterpenoid.

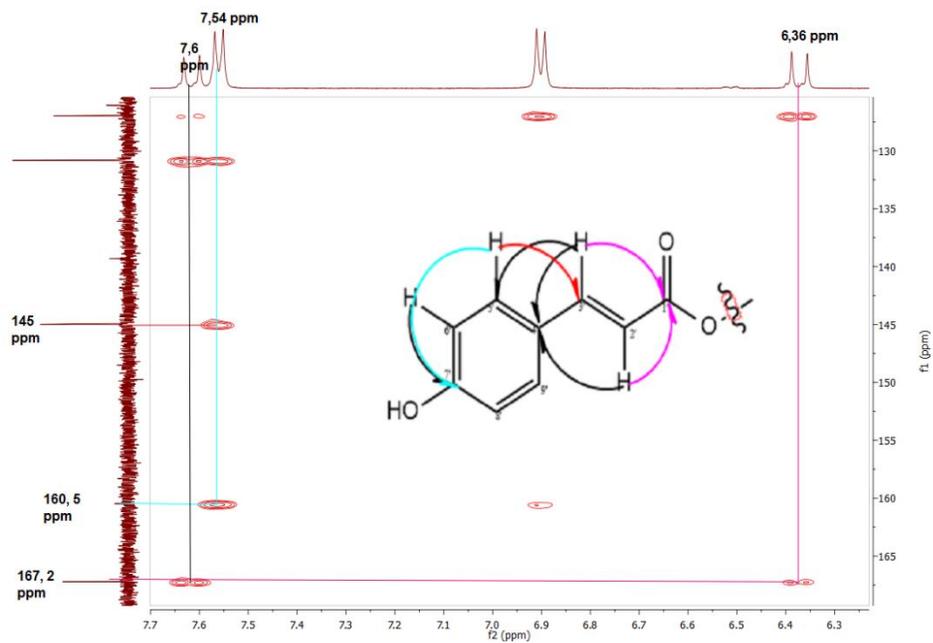
Spektrum HMBC (Gambar 22) juga menunjukkan terdapat korelasi antara dua proton metil pada δ_H 0,94 dan 0,92 dengan dua karbon metilen pada δ_C 46,8 dan 36,4 serta dengan karbon kuartener pada δ_C 31,3 menunjukkan bahwa terdapat satu gugus dimetil lainnya pada senyawa hasil isolasi. muncul dua germinal dimetil tersebut adalah karakteristik dari kerangka oleanan. korelasi antara proton metin δ_H 2,91 dengan karbonil asam pada δ_C 178,9 menunjukkan adanya gugus karboksil yang khas pada C-28 senyawa triterpenoid.



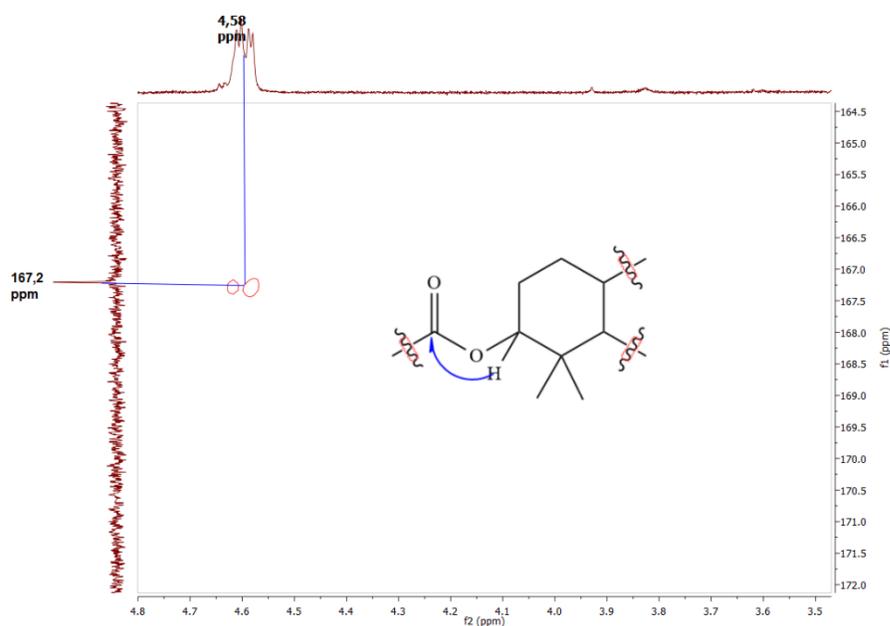
Gambar 13. Spektrum HMBC pada daerah 0,5 -1,5 ppm.

Spektrum HMBC (Gambar 23) memperlihatkan korelasi antara dua proton CH aromatik pada δ_H 7,54 dan 6,89 ppm dengan karbon oksi aril pada δ_C 160,5 ppm. Proton aromatik pada δ_H 7,54 ppm berkorelasi dengan karbon vinilik pada δ_C 145,0 ppm memperlihatkan bahwa fenil terikat dengan suatu vinilik. Gambar 23 juga memperlihatkan korelasi antara dua proton CH vinilik pada δ_H 6,36 dan 7,6 ppm dengan karbonil ester pada δ_C 167,2 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa unit aromatik pada senyawa hasil isolasi merupakan 4-hidroksisinamoil.

Spektrum HMBC (Gambar 24) menunjukkan adanya korelasi yang sangat penting antara proton oksikarbon pada C-3 dari unit oleanan (δ_H 4,58 ppm) dengan karbonil ester (δ_C 167,2 ppm) dari unit *p*-kumaroil. Korelasi tersebut membuktikan bahwa senyawa hasil isolasi adalah *p*-kumaroil oleanat atau dengan nama lain asam 3β -O-(*E*)-4-hidroksisinamoiloleanolat, struktur dapat dilihat pada **Gambar 25**.



Gambar 14. Spektrum HMBC senyawa hasil isolasi bagian aromatik

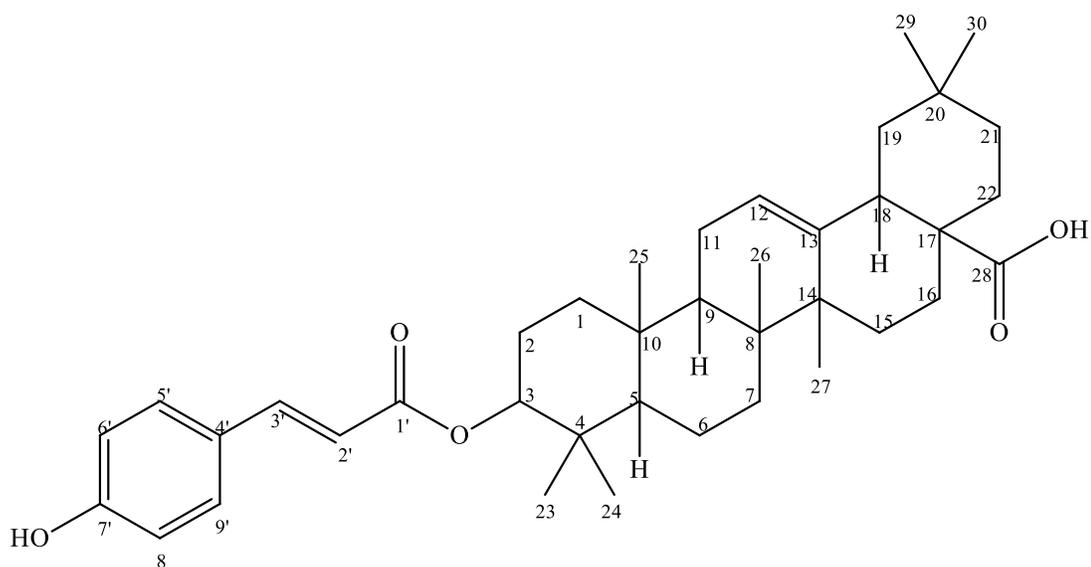


Gambar 15. Spektrum HMBC proton δ_H 4.58 ppm korelasi δ_C 167.21 ppm.

Tabel 4. Data spektrum 1H -NMR, ^{13}C -NMR, dan HMBC senyawa hasil isolasi

Posisi	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (ppm) (integrasi, multiplisitas, J (Hz))	HMBC
1	38,8	1,67(1H, <i>m</i>), 1,12 (1H, <i>m</i>)	
2	24,4	1,67 (2H, <i>m</i>)	C1,C3,C5,C10
3	80,9	4,58 (1H, <i>br dd</i> $J= 11,3; 4,5$)	C2,C1', C23,C24
4	38,6	-	
5	56,1	0,97 (1H, <i>m</i>)	
6	19,0	1,57(1H, <i>m</i>), 1,44(1H, <i>m</i>)	
7	33,5	1,77(1H, <i>m</i>), 1,56 (1H, <i>m</i>)	
8	40,1	-	
9	48,3	1,71 (1H, <i>m</i>)	C10, C8, C25, C26,C1,
10	37,7	-	
11	19,0	1,91 (2H, <i>m</i>)	C12,C9,C8,C13
12	122,9	5,25 (1H, <i>t</i>)	C14,C11
13	144,9	-	
14	42,5	-	
15	28,4	1,09(1H, <i>m</i>), 1,8(1H, <i>m</i>)	C14,C27.C16
16	23,7	2,01(1H, <i>m</i>), 1,62(1H, <i>m</i>)	C17,C28
17	46,8	-	
18	42,2	2,91 (1H, <i>m</i>)	C12, C13, C19, C28
19	46,8	1,72(1H, <i>m</i>) 1,16(1H, <i>m</i>)	

20	31,3	-	
21	34,4	1,42(1H, <i>m</i>), 1,21(1H, <i>m</i>)	
22	33,5	1,35 (2H, <i>m</i>)	C29,C30
23	17,2	0,96 (3H, <i>s</i>)	C3, C5, C4
24	28,4	0,91 (3H, <i>s</i>)	
25	15,8	1,00 (3H, <i>s</i>)	C10, C1, C9, C5
26	17,6	0,82 (3H, <i>s</i>)	C7, C8, C14, C9
27	26,2	1,20 (3H, <i>s</i>)	C15, C8, C14, C13
28	178,9	-	
29	23,8	0,94 (3H, <i>s</i>)	C30, C19, C20, C21
30	33,3	0,92 (3H, <i>s</i>)	C29, C20, C21, C19
1'	167,2	-	
2'	116,1	6,36 (1H, <i>dJ</i> =16)	C1', C4'
3'	145,0	7,6 (1H, <i>dJ</i> =16)	C5',C1', C2',C4'
4'	127,0	-	
5',9'	130,9	7,54 (1H, <i>dJ</i> = 8,6)	C3', C7'
6',8'	116,6	6,89 (1H, <i>dJ</i> =8,6)	C4', C7',
7'	160,5	-	



Gambar 16. Struktur asam 3 β -O-(*E*)-4-hidroksil sinamoilleanolat

Berdasarkan studi literatur asam 3β -O-(*E*)-4-hidroksisinamoiloleanolat telah dilaporkan Hiranrat *et al.*, 2012 dari fraksi diklorometana batang *Rhodomyrtus tomentosa*. Perbandingan data spektrum NMR (Tabel 5) dilaporkan oleh Hiranrat, 2008 menunjukkan adanya kesesuaian antara data NMR senyawa struktur hasil isolasi dengan asam 3β -O-*E* kumaroiloleanolat, tetapi ada perbedaan sedikit nilai δ_H dan δ_C disebabkan karena perbedaan pelarut yang digunakan saat proses pengukuran NMR dimana senyawa hasil isolasi menggunakan pelarut (aseton d_6), sedangkan senyawa pembandingan menggunakan pelarut $CDCl_3$ dan CD_3OD .

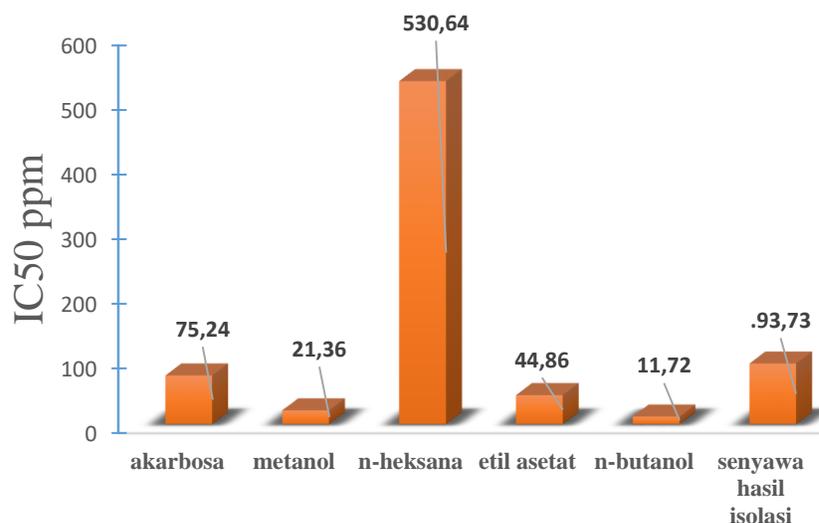
Tabel 5. Data perbandingan 1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa hasil isolasi dengan senyawa pembandingan.

Posisi	Senyawa hasil isolasi (CD_3COCD_3)		3β -O-Coumaroyloleanolic acid ($CDCl_3 + CD_3OD$) Hiranrat <i>et al.</i> , 2012	
	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (integrasi, multisiplitas, $J=Hz$)	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (integrasi, multisiplitas, $J=Hz$)
1	38,8	1,67(1H, <i>m</i>), 1,12 (1H, <i>m</i>)	37,7	1,34(1H, <i>m</i>), 1,19(1H, <i>m</i>)
2	24,4	1,67 (2H, <i>m</i>)	27,5	1,69 (2H, <i>m</i>)
3	80,9	4,58 (1H, <i>br dd</i> $J= 11,3; 4,5$)	84,9	4,61 (1H, <i>br dd</i> $J= 10,7; 5,3$)
4	38,6	-	43,2	-
5	56,1	0,97 (1H, <i>m</i>)	59,2	0,89 (1H, <i>m</i>)
6	19,0	1,57(1H, <i>m</i>), 1,44(1H, <i>m</i>)	22,1	1,85(1H, <i>m</i>), 1,4 (1H, <i>m</i>),
7	33,5	1,77(1H, <i>m</i>), 1,56 (1H, <i>m</i>)	36,44	1,77 (2H, <i>m</i>)
8	40,1	-	43,16	-
9	48,3	1,71 (1H, <i>m</i>)	51,44	1,6 (1H, <i>m</i>)
10	37,7	-	40,83	-
11	19,0	1,91 (2H, <i>m</i>)	26,91	1,91 (2H, <i>m</i>)
12	122,9	5,25 (1H, <i>t</i>)	126,12	5,25 (1H, <i>t</i>)
13	144,9	-	147,76	-
14	42,5	-	45,62	-
15	28,4	1,09(1H, <i>m</i>), 1,8(1H, <i>m</i>)	31,54	1,73 (2H, <i>m</i>)
16	23,7	2,01(1H, <i>m</i>), 1,62(1H, <i>m</i>)	27,37	1,89(1H, <i>m</i>), 1,69 (1H, <i>m</i>),
17	46,8	-	50,31	-
18	42,2	2,91 (1H, <i>m</i>)	45,12	2,85 (1H, <i>s</i>)
19	46,8	1,72(1H, <i>m</i>) 1,16(1H, <i>m</i>)	49,84	1,65(1H, <i>m</i>), 1,15(1H, <i>m</i>),
20	31,3	-	34,53	-

21	34,4	1,42(1H, <i>m</i>), 1,21(1H, <i>m</i>)	41,83	1,68 (2H, <i>m</i>)
22	33,5	1,35 (2H, <i>m</i>)	36,54	1,55(1H, <i>m</i>), 1,35(1H, <i>m</i>),
23	17,2	0,96 (3H, <i>s</i>)	20,69	0,91 (3H, <i>s</i>)
24	28,4	0,91 (3H, <i>s</i>)	31,92	0,94 (3H, <i>s</i>)
25	15,8	1,00 (3H, <i>s</i>)	19,2	0,97 (3H, <i>s</i>)
26	17,6	0,82 (3H, <i>s</i>)	20,69	0,80 (3H, <i>s</i>)
27	26,2	1,20 (3H, <i>s</i>)	29,7	1,16 (3H, <i>s</i>)
28	178,9	-	184,94	-
29	23,8	0,94 (3H, <i>s</i>)	27,37	0,94 (3H, <i>s</i>)
30	33,3	0,92 (3H, <i>s</i>)	36,89	0,91 (3H, <i>s</i>)
1'	167,2	-	171,79	-
2'	116,1	6,36 (1H, <i>d J</i> =16)	119,03	6,28 (1H, <i>d J</i> =15,9)
3;	145,0	7,6 (1H, <i>d J</i> =16)	148,63	7,6 (1H, <i>d J</i> =15,9)
4'	127,0	-	129,12	-
5' 9'	130,9	7,54 (1H, <i>d J</i> = 8,6)	133,81	7,42 (1H, <i>d J</i> = 8,7)
6' 8'	116,6	6,89 (1H, <i>d J</i> =8,6)	119,69	6,81 (1H, <i>d J</i> =8,7)
7'	160,5	-	163,13	

4.4 Uji Penghambatan Aktivitas Enzim α -Glukosidase.

Ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, dan senyawa hasil isolasi dilakukan uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase. Pengujian penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan dalam beberapa variasi konsentration agar dapat menentukan nilai IC₅₀ dari setiap sampel uji (Lorenza, 2012). Semakin kecil nilai IC₅₀ maka suatu sampel semakin besar kemampuannya dalam menghambat kerja enzim α -glukosidase. Kontrol positif yang digunakan berupa akarbosa. Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian ini karena akarbosa telah digunakan sebagai obat anti diabetes.

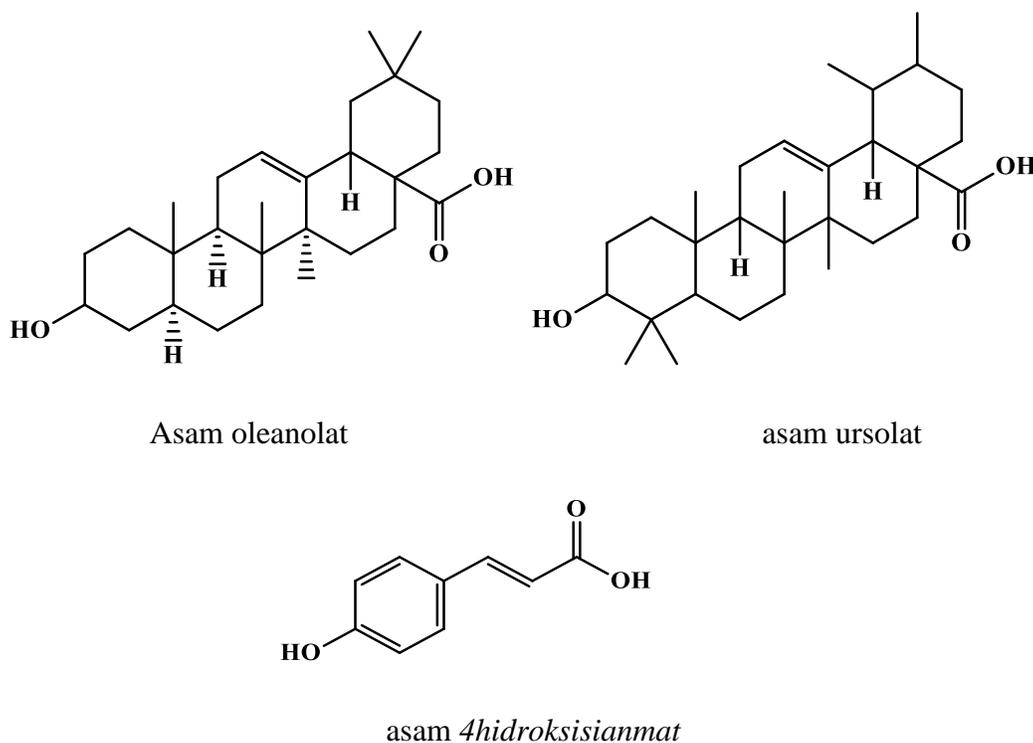


Gambar 17. Kurva penghambatan aktivitas enzim α -glukoisdase terhadap ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol dan senyawa hasil isolasi dari batang *R. tomentosa*

Berdasarkan data pengujian penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase (Gambar 26) nilai IC₅₀ masing-masing ekstrak metanol 21,36 ppm, fraksi *n*-heksana 530,64 ppm, etil asetat 44,86 ppm, *n*-butanol 11,72 ppm, dan senyawa hasil isolasi 93,73 ppm. Nilai akarbosa sebagai kontrol positif memiliki nilai IC₅₀ 75,24 ppm. Ekstrak metanol mempunyai nilai IC₅₀ lebih besar dari pada akarbosa, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki kemampuan lebih besar dalam menghambat kerja enzim α -glukosidase daripada akarbosa. Fraksi *n*-heksana memiliki nilai IC₅₀ lebih tinggi dari akarbosa, hal ini memperlihatkan bahwa fraksi *n*-heksana memiliki daya hambat yang sangat lemah dari pada akarbosa. Fraksi etil asetat dan *n*-butanol memiliki nilai IC₅₀ lebih besar dari pada akarbosa. Lazimnya senyawa-senyawa yang dapat menghambat kerja enzim α -glukosidase mempunyai

Senyawa hasil isolasi memiliki nilai IC₅₀ lebih tinggi dari pada akarbosa, hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi mempunyai kemampuan lebih lemah dalam menghambat kerja enzim α -glukosidase daripada akarbosa. Tetapi ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan *n*-butanol mempunyai kemampuan lebih kuat dalam menghambat kerja enzim α -glukosidase daripada akarbosa. Berdasarkan studi literatur

menurut Yin *et al.*, 2014 senyawa terpenoid seperti asam oleanolat dan asam ursolat yang diisolasi dari tumbuhan *Luculia pinceana* dilaporkan bahwa kedua senyawa tersebut menghambat kerja enzim α -glukosidase dengan nilai IC_{50} 3,30; dan 2,88 ppm. Daya hambat tersebut lebih kuat dibandingkan dengan akarbosa, hal ini membuktikan bahwa bagian triterpenoid dari senyawa hasil isolasi memiliki kemampuan untuk menghambat enzim α -glukosidase lebih kuat disbanding akarbosa. Laporan lain yang menyebutkan bahwa asam *p*-kumarat diisolasi dari tumbuhan *Triticum aestivum L* yang merupakan bagian fenolik dari senyawa hasil isolasi memiliki nilai $IC_{50} > 30$ mmol/L. Nilai tersebut jauh lebih tinggi dari dibandingkan dengan akarbosa memiliki nilai $IC_{50} 1,7 \pm 0,1$ mmol/L. Diasumsikan bahwa lemahnya kemampuan senyawa hasil isolasi dibandingkan dengan akarbosa pada penelitian ini disebabkan karena adanya bagian *4-hidroksisianoil* pada senyawa hasil isolasi.



Gambar 18. Struktur senyawa turunan triterpenoid dan asam sinamat yang dapat menghambat aktivitas enzim α -glukosidase (Yin, *et al.*, 2014).