



ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI KULIT BATANG BINTANGUR (*CALOPHYLLUM BICOLOR*)

Dede Sukandar^{1*}, Jamillah Abbas², Nurfitriany Habibah¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta, Tangerang Selatan, 15412

²Pusat Riset Kimia Maju-Baban Riset dan Inovasi Nasional Kawasan Puspiptek Serpong

*Corresponding author:

INFO ARTIKEL

Riwayat Artikel

Diterima

Direvisi

Diterima

Tersedia online

* Email (penulis korespondensi):

sukandarkimia@uinjkt.ac.id/sukandardede10@gmail.com

ABSTRAK

Abstract

Isolation and identification of secondary metabolite compounds from stem bark of Bintangur (*Calophyllum bicolor*) have been reported. Isolation was carried out using the maceration method with 70% ethanol solvent and fractionation of the ethanol extract by column chromatography using n-hexane solvent. The n-hexane fraction resulting from column chromatography was subjected to gravity chromatography with the mobile phase n-hexane: ethyl acetate (8:2) producing isolate 1. The results of purification of isolate 1 using fast column chromatography with the mobile phase dichloromethane: methanol (1:1) and a UV light detector at λ 254 nm, compound 1 was obtained. Meanwhile, identification of compound 1 was carried out through UV-Vis spectroscopy, FTIR and LCMS analysis. The identification results of compound 1 using UV-Vis spectroscopy showed the presence of an aliphatic ring double bond chromophore (λ_{max} 233.5; 295 nm). FTIR results indicated the presence of vibrations of the OH group (3417 cm^{-1}), CH alkanes (2933 ; 2864 ; 1456 ; 545 cm^{-1}), and C=C alkenes (1618 cm^{-1}). Analysis results using LCMS showed a molecular ion peak at $[M]^+ m/z = 386.96$ at a retention time of 11.6 minutes, indicating a molecular weight of 386 and a molecular formula ($C_{27}H_{46}O$) that corresponds to a terpenoid compound.

Keywords: isolation, identification, terpenoid, bintangur (*Calophyllum bicolor*)

Abstrak

Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari kulit batang bintangur (*Calophyllum bicolor*) telah dilaporkan. Isolasi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan fraksinasi ekstrak etanol dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut n-heksana. Fraksi n-heksana hasil kromatografi kolom dikromatografi grafitasi dengan fase gerak n-heksana : etil

asetat (8:2) menghasilkan isolat 1. Hasil pemurnian isolat 1 menggunakan kromatografi kolom cepat dengan fase gerak diklorometana : metanol (1:1) dan detektor sinar UV pada λ 254 nm diperoleh senyawa 1. Sedangkan identifikasi senyawa 1 dilakukan melalui analisis spektroskopi UV-Vis, FTIR, dan LCMS. Hasil identifikasi senyawa 1 menggunakan spektroskopi UV-Vis menunjukkan adanya kromofor ikatan rangkap cincin alifatik (λ_{maks} 233,5 nm; 295 nm). Hasil FTIR mengindikasikan adanya vibrasi gugus OH (3417 cm^{-1}), CH alkana (2933 ; 2864 ; 1456 ; 545 cm^{-1}), dan C=C alkena (1618 cm^{-1}). Hasil Analisa menggunakan LCMS menunjukkan puncak ion molekul pada $[M]^+$ $m/z = 386,96$ pada waktu retensi 11,6 menit, menunjukkan berat molekul 386 dan rumus molekul ($C_{27}H_{46}O$) yang sesuai dengan senyawa terpenoid.

Kata kunci: isolasi, elusidasi, terpenoid, bintangur (*Calophyllum bicolor*)

1. Pendahuluan

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar kedua di dunia setelah Brazil, dan digolongkan sebagai salah satu *megadiversity country*. Tidak kurang dari 54 % spesies tumbuhan di dunia tersebar di hutan tropis, dan itu setara dengan 250.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi dan 30.000 spesies diantaranya terdapat pada hutan tropis Indonesia [1]. Sehingga Indonesia dipandang sebagai sumber bahan kimia alami yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat dan bahan baku industri kimia [2]. Pemanfaatan bahan-bahan alami dapat dilakukan dengan menemukan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya serta mencari sifat kimia yang bertanggung jawab untuk menyebabkan aksi pengobatan [3].

Salah satu genus tumbuhan tingkat tinggi Indonesia yang mempunyai potensi sebagai sumber senyawa kimia bioaktif adalah *Calophyllum*. Genus *Calophyllum* (bintangur) merupakan kelompok tumbuhan hutan tropis yang sangat besar jumlahnya, yakni terdiri dari 190-200 spesies. Tanaman ini tersebar luas di wilayah Indonesia, Malaysia, Mikronesia, Melanesia, Thailand, Singapura, Srilanka dan Australia bagian utara [4]. *Calophyllum* merupakan salah satu tumbuhan yang menarik dari segi fitokimia, dikarenakan memiliki kandungan metabolit sekunder serta bioaktivitas.

Kelompok senyawa bahan alam yang telah diisolasi dari bintangur cukup beragam. Berdasarkan kerangka dasarnya, senyawa yang diisolasi dari golongan aromatis meliputi turunan santon, kumarin, kromanon, sedangkan dari golongan senyawa non aromatis yang diisolasi meliputi senyawa turunan asilploroglusinol, terpenoid dan steroid [5].

Hasil penelitian terhadap *Calophyllum* telah berhasil diisolasi berbagai senyawa, diantaranya zeylosanton dan trapezifolisanton dari *C. gracilipes* [6]. GUT-70(5-metoksi-2,2-dimetil-6-(2-metil-1-okso-2-butenil)-10-propil-2H-8H-benzol [1,2-b; 3,4-b'] dipiran-8-one) dari *C. brasiliense* [7]. calosanton N dan gerontosanton C dari *C. inophyllum* [8]. 5-hidroksi-8-metoksisanton dan 3,5-dihidroksi-1,2-dimetoksisanton dari *C. caledonicum*, apetalinon C dan apetalinon D dari *C. apetalum* [9]. brasisanton E dan brasisanton F dari *C. brasiliense* [10]. calanolida A dari *C. lanigerum* [11] (Mckee *et al.*, 1996), teysmanon A dari *C. teysmanii* [12]. brasimarin A dari *C. brasiliense* [13].

Bioaktivitas dari genus *Calophyllum* berdasarkan laporan dari NIQFAR (*Núcleo de Investigações Químico-Farmacéuticas*) Brazil, bahwa kаланolid A, kаланolid B dan soulattrolide dari *C. brasiliense* serta calocoumarin A dari *C. inophyllum* memiliki bioaktivitas sebagai inhibitor enzim *reverse transcriptase* HIV-1 [14]. Inophyllum A-E, inophyllum P, inophyllum G-1 dan inophyllum G-2 dari *C. inophyllum* berkhasiat juga sebagai antiHIV [15]. Beberapa senyawa tersebut menarik perhatian karena memiliki aktivitas sebagai antiHIV. Studi terkait hubungan struktur kimia terhadap aktivitas biologis menunjukkan kemungkinan modifikasi struktur dalam molekul dari isolat yang didapat dari beberapa spesies *Calophyllum* dapat digunakan untuk terapi. Genus *Calophyllum* ini kaya akan kandungan kimia yang sebagian besar memiliki aktivitas biologis.

Penelitian genus *Calophyllum* sampai saat ini masih terus berlangsung mengingat besarnya pemanfaatan tanaman ini, ketersediaannya yang luas dan masih banyak jenis lainnya yang belum dieksplorasi kandungan kimianya. Baru sekitar 50 spesies yang diteliti dari total 200 spesies yang ada sehingga belum seluruhnya teridentifikasi kandungan kimianya [16].

Salah satu spesies dari genus *Calophyllum* adalah *Calophyllum bicolor*. Berdasarkan penelusuran literatur diketahui bahwa belum banyak laporan mengenai komponen kimia dari spesies *C. bicolor* yang diteliti.

Penelitian terhadap kulit batang tumbuhan ini dengan fraksinasi yang dilakukan dalam 3 pelarut yaitu n-heksana, aseton dan metanol. Pendekatan penelitian secara kemotaksonomi yaitu berpeluang menemukan senyawa kimia atau kerangka dasar yang sama seperti jenis *Calophyllum* lainnya. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan mengisolasi, memurnikan dan mengelusidasi struktur senyawa kimia yang terkandung di dalam kulit batang *C. bicolor* dengan menggunakan kromatografi kolom, lapis tipis dan elusidasi struktur dengan alat spektroskopi.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan utama adalah sampel kulit batang *C. bicolor* yang diperoleh dari hutan Kalimantan, aquades, aseton (Merck), etanol 70 % (Merck), asam sulfat 10 % (Merck), KLT (Merck), silika gel 60 GF 254 (230-400 mesh Merck), Sephadex, pelarut *n*-heksana, diklorometana, etil asetat dan methanol berkualitas teknis terdestilasi.

2.2. Metode

2.2.1 Preparasi Sampel

Kulit batang *C. bicolor* yang diperoleh dari hutan Kalimantan dikeringkan dan dihaluskan.

2.2.2 Ekstraksi dan Pemekatan

Kulit batang *C. bicolor* yang telah kering dan halus ditambahkan pelarut etanol 70 % hingga terendam. Maserasi dilakukan selama 5 x 24 jam dengan tiga kali pengulangan, kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C hingga diperoleh ekstrak mengental [2].

2.2.3 Partisi

Ekstrak hasil maserasi, dipartisi dengan menggunakan pelarut organik non-polar hingga polar secara berurutan yaitu *n*-heksana, aseton, dan metanol. Masing-masing ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C, dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C.

2.2.4 Fraksinasi dan Pemurnian

Sebanyak 20 g fraksi *n*-heksana *C. bicolor* difraksinasi menggunakan kromatografi kolom vakum dengan diameter kolom 9 cm menggunakan fase diam 120g silika gel 60 (200-300 mesh). Sebagai fase gerak digunakan campuran pelarut mulai dari *n*-heksana dengan etil asetat dan etil asetat dengan metanol. Pelarut *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan sebagai berikut; 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10 dan etil asetat : metanol dengan perbandingan, diantaranya 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 masing-masing perbandingan digunakan 400 ml pelarut. Setiap 400 ml eluat ditampung dan diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh 19 fraksi (F1-F19).

Hasil kolom dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fasa diam silika gel Merck Kieselgel 60 GF₂₅₄ menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8:2. Pola noda diidentifikasi pada sinar UV dengan λ_{maks} 254 nm dan 366 nm, agar noda dapat terlihat lebih jelas, plat KLT disemprot dengan pereaksi warna H₂SO₄ 10 %.

Fraksi 2 sejumlah 452 mg dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom sebanyak 4 kali kolom, dengan fase diam sephadex dan fase gerak diklorometana:metanol perbandingan 1:1. Pemurnian lebih lanjut dilakukan dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2) lalu direkristalisasi dengan menggunakan aseton - *n*-heksana.

2.2.5 Identifikasi dengan cara fisika

Terhadap isolat dikarakterisasi titik lelehnya menggunakan *Fisher-Jhon Melting Point apparatus* [17]. Yaitu dengan cara meletakkan sebutir kristal pada wadah yang ada pada alat tersebut. Selanjutnya suhu dinaikkan secara perlahan-lahan. Titik leleh ditandai dengan mulai meleburnya kristal hingga seluruhnya berubah menjadi cair.

2.2.6 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 1,1 mg sampel dilarutkan dalam diklorometana 1 ml sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 µg/ml. Larutan induk diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 10, 5, 2 atau 1 µg/ml. Masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam kuvet, pelarut dimasukkan pada kuvet lain dan diukur absorbansinya secara bersamaan. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dilakukan untuk mengetahui serapan dari gugus kromofor isolat yang didapat pada daerah panjang gelombang 200 – 800 nm.

2.2.7 Identifikasi dengan Spektrofotometer IR.

Sebanyak 1 mg sampel digerus dengan 100 mg KBr secara homogen, kemudian dipress dengan alat tekan sehingga berbentuk film tipis. Setelah itu ditempatkan dalam tempat sampel spektrofotometer infra merah lalu diukur serapannya pada bilangan gelombang 400-4000 cm⁻¹.

2.2.8 Identifikasi dengan LC-MS

Senyawa isolat murni yang diperoleh dilarutkan dalam metanol yang mengandung 0,3% asam asetat dan dibuat konsentrasi 1000 ppm. Sebanyak 20 µl larutan sampel dimasukkan dalam *syringe* kemudian diinjeksi ke dalam alat LC-MS *Mariner Biospectrometry Workstation*.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Isolasi dan Pemurnian Senyawa

Sampel *C. bicolor* sebanyak 2000 g dimaserasi dengan etanol dan menghasilkan ekstrak *n*-heksana sebanyak 40 g. Ekstrak kering hasil partisi sebanyak 20 gr ini dipisahkan dengan menggunakan KCV menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat (9:1); (8:2); (7:3); (6:4); (5:5); (4:6); (3:7); (2:8); (1:9); (0:10); etil asetat : metanol (9:1); (8:2); (7:3); (6:4); (5:5); (4:6); (3:7); (2:8); (1:9). Masing-masing dari hasil KCV diperoleh 19 fraksi dengan berat : F1 (10,13 g), F2 (4,0743 g), F3 (1,7525 g), F4 (1,0514 g), F5 (0,6584 g), F6 (0,4182 g), F7 (0,1450 g), F8 (0,1695 g), F9 (0,0787 g), F10 (0,072 g), F11 (0,0792 g), F12 (1,8175 g), F13 (0,1097 g), F14 (0,0355 g), F15 (0,0453 g), F16 (0,0174 g), F17 (0,019 g), F18 (0,0263 g) dan F19 (0,015 g).

Fraksi 2 direkristalisasi dengan *n*-heksana : diklorometana sehingga diperoleh kristal sebanyak 452 mg. Kristal tersebut dimurnikan kembali menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam sephadex sebanyak 4 kali, masing-masing menggunakan eluen diklorometana : metanol perbandingan 1:1. Hasil dari fraksinasi ini kemudian di KLT menggunakan eluen *n*-heksana : EtOAc (8:2). Rekristalisasi dilakukan agar didapat kristal yang lebih murni dari pengotornya dengan cara pencucian dengan *n*-heksana dilanjutkan dengan rekristalisasi menggunakan campuran metanol dan diklorometana.

Hasil kolom sephadex 1-4 dilakukan penggabungan sesuai dengan pola pemisahan spot sehingga dihasilkan 12 fraksi sebagai berikut: A1 (1-23), A2 (24-38), A3 (39-48), B1 (1-10), B2 (11-24), B3 (25-33), C1 (1-10), C2 (11-18), C3 (19-31), D1 (1-9), D2 (10-15), D3 (16-22).

Spot tunggal pada A3 dan B3 digabung dan dilakukan KLT bersamaan dengan Spot tunggal pada C3 dan D3. Spot pada C3 dan D3 masih terlihat 2 spot sehingga C3 dan D3 digabung untuk dimurnikan kembali dengan kromatografi kolom (sephadex 5) dengan fase diam sephadex menggunakan eluen diklorometana : metanol perbandingan 1:1 menghasilkan spot tunggal. Gabungan A3B3 dan sephadex 5 menghasilkan satu spot tunggal yang telah murni sebagai isolat 1 berbentuk padatan kuning dengan berat 25 mg yang sebelumnya direkristalisasi dengan *n*-heksana – aseton.

Uji kemurnian dilakukan pula dengan cara pengujian titik leleh pada kristal tersebut. Titik leleh dari isolat 1 yaitu 220-221 °C. Jarak titik leleh sebesar 1°C ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi ini sudah murni. Titik leleh pada padatan murni selalu tajam dengan rentang suhu yang kecil yaitu, 1-2° [18].

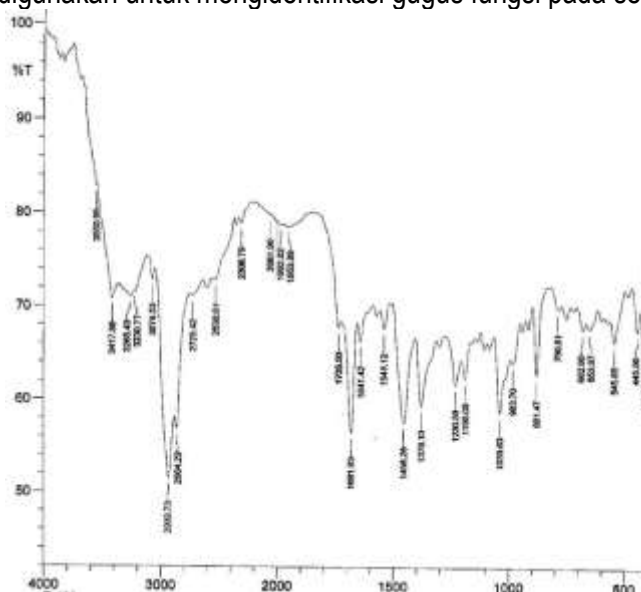
3.2 Analisa Spektroskopi UV-Vis

Analisis spektroskopi UV-Vis dengan pelarut diklorometana dengan rentang panjang gelombang 200-360 nm menunjukkan adanya 2 serapan pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 233,5 nm (pita 1) dan 295 nm (pita 2). Berdasarkan pita serapan yang diperoleh, mengindikasikan adanya gugus kromofor yang khas untuk sistem ikatan rangkap cincin alifatik.

Serapan pada panjang gelombang 233,5 nm merupakan transisi elektronik dari π ke π^* dan diduga merupakan transisi elektronik gugus OH. Sedangkan serapan panjang gelombang 295 nm diduga merupakan transisi elektronik n ke π^* dan diduga merupakan transisi elektronik gugus C=C [19].

3.3 Analisa Spektroskopi FTIR

Spektrometer FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada senyawa 1 (Gambar 1).



Gambar 1. Hasi analisa spektroskopi FTIR senyawa 1

Pita-pita serapan muncul pada daerah panjang gelombang seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Prediksi puncak spektrum FTIR senyawa 1

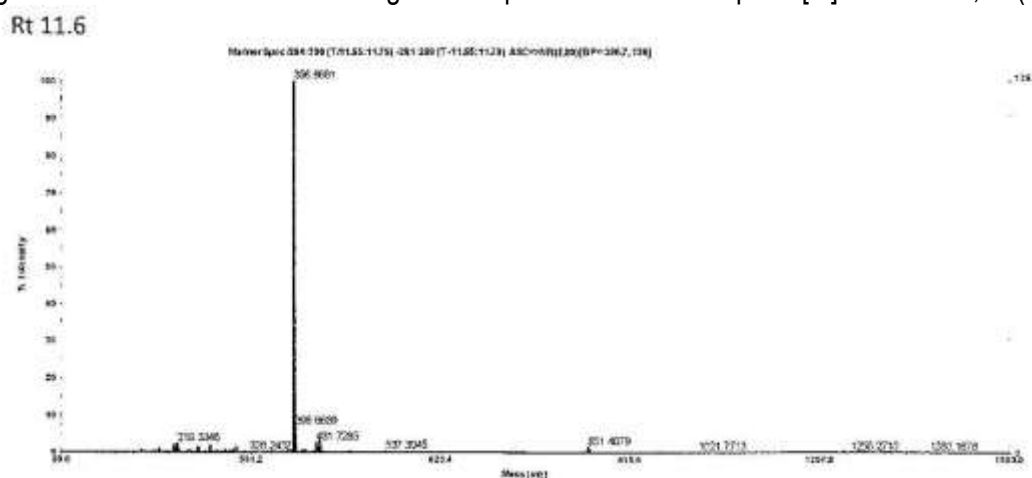
Gugus Fungsi		Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)
OH		3417
CH	Alkana	2933
CH	Alkana	2864
C=C	Alkena	1681
CH	Alkana (bending)	1456
CH	Alkana tersubstitusi	545

Hasil analisis spektrum FTIR menunjukkan bahwa senyawa 1 mempunyai gugus-gugus fungsi dengan puncak serapan pada bilangan gelombang 3417 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus -OH (3210-3550 cm⁻¹) [20]. Adanya gugus OH diperkuat dengan data karbon NMR yang muncul pada sinyal 78,5 ppm. Puncak serapan pada 2933 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus fungsi -CH alifatik (CH₃) dan 2864 cm⁻¹ (CH₂). Hal ini diperkuat pada daerah sidik jari bilangan gelombang 1456 cm⁻¹ menunjukkan adanya vibrasi tekuk (bending) gugus -CH. Pada daerah sidik jari bilangan gelombang 545 cm⁻¹ menunjukkan adanya gugus -CH alkana tersubstitusi yaitu sikloalkana. Munculnya serapan 1681 cm⁻¹ menunjukkan

adanya vibrasi ulur gugus fungsi C=C alkena [19].

3.4 Analisa Spektroskopi MS

Hasil identifikasi menggunakan MS terlihat satu senyawa yang dominan dengan waktu retensi 11,6 menit dengan luas area sebesar 100% menghasilkan puncak ion molekul pada $[M]^+$ $m/z = 386,96$ (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Analisa LCMS senyawa 1

Berdasarkan data tersebut menunjukkan bahwa senyawa 1 mempunyai berat molekul 386 dan rumus molekul ($C_{27}H_{46}O$) yang sesuai dengan senyawa terpenoid.

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak etanol kulit batang bintangur (*C. bicolor*) dari sub fraksi kedua n-heksana yang dipisahkan dengan kolom kromatografi didapat isolat 1. Dapat disimpulkan bahwa isolat 1 merupakan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid dengan rumus molekul ($C_{27}H_{46}O$) dan berat molekul 386 m/z.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Riset Kimia Maju-Badan Riset dan Inovasi Nasional Kawasan Puspiptek Serpong yang telah memfasilitasi kegiatan penelitian.

Daftar Pustaka

- [1] E. R. Sukandar, S. Kaennakam, P. Raab, X. Nöst, K. Rassamee, R. Bauer, P. Siripong, T. Ersam, S. Tip-pyang and W. Chavasiri, Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Dihydroisocoumarin and Xanthone Derivatives from *Garcinia picrorhiza*, *Molecules*. vol. 26 , no.6626 , pp.2-11 , 2021
- [2] I. D. Dewijanti, W. Mangunwardoyo, A. Dwiranti, M. Hanafi, N. Artanti, Short communication: Effects of the various source areas of Indonesian bay leaves (*Syzygium polyanthum*) on chemical content and antidiabetic activity, *Biodiversitas*, vol 21, no. 3, pp. 1190-1195, 2020.
- [3] Sardjoko, *Rancangan Obat*, Yogyakarta, Gajah Mada University Press. 1993.
- [4] Soerjanegara & R.H.M.J. Lemmens. 1994. *Plant Resources of Sout-East Asia 5. Prosea*, Bogor: Pudoc.
- [5] Su, Xiao-Hui, M-L. Zhang, Li-Geng-Li, C-H. Huo, and Y-C. Gu. 2008. *Chemical Constituents of The Plants of The Genus Calophyllum, Chemistry and Biodiversuty*, Vol. 5. Issue 12.2579–2608
- [6] Nasir, R. Mawardi, S. Khozirah, K. Nur, G. Rusea, S. Johnson, and J. Ethel. 2013. Xanthenes from *Calophyllum gracilipes* and Their Cytotoxic Activity. *Sains Malaysiana*. 42 (9): 1261 – 1266.
- [7] Kimura, C. Ito, N. Jyoko, H. Segawa, J. Kuroda, M. Okada, S. Adachi, T. Nakahata, T. Yuasa, F. Cechinel, H. Furukawa, and T. Maekawa. 2005. *International Journal Cancer*. 113, 158.

- [8] Xiao, Yan, Wen L, You X, Yuan Y, Hao F. 2008. Cytotoxic Prenylated Xanthenes from *Calophyllum inophyllum*. *Journal of Asian Natural Product Research* Vol. 10, No. 10.
- [9] C. Morel, A. Emmanuelle, M. Litaudon, T. Sevenet, D. Seraphin, J. Bruneton, and P. Richomme. 2002. Thirteen New Xanthone Derivatives from *Calophyllum caledonicum* (Clusiaceae). *Planta Med.*
- [10] M. Inuma, H. Tosa, T. Tanaka, and S. Yonemori. 1994. Two Xanthenes from Root Bark of *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*. Vol 35. No 7, 527-532.
- [11] T.C. Mc Kee, R.W. Fuller, C.D. Covington, J.H. Cardellina, and R. J. Gulakowski. 1996. Chemical Constituent of The Plants of Genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 5.
- [12] S.G. Cao, K.Y. Sim, J. Pereira, and S.H. Goh. 1997. Coumarins from *Calophyllum teysmanii*. *Phytochemistry*, Vol. 47.No. 5, 773-777.
- [13] C. Ito, M. Itoigawa, Y. Mishina, V.C. Filho, and F. Enjo. 2003. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense* 2 Structure of Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. *Journal Natural Product*. Vol. 66. No. 3
- [14] Noldin, V. Floriani, D.B. Isaias and Valdir Chechin Filho, 2006. *Calophyllum genus: Chemical and Pharmacological Importance*, Quim: Nova, Vol. 29.
- [15] F. Laurea, P. Raharivelomanana, J-F Butauda, J-Pe Bianchinia, E.M. Gaydou. 2008. Screening of anti-HIV-1 inophyllums by HPLC-DAD of *Calophyllum inophyllum* leaf extracts from French Polynesia Islands. *analytica chimica acta* 624 (2008), 147-153.
- [16] J. Abbas. 2008. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia & Uji Aktivitas Biologi Kulit Batang Marga *Calophyllum spp.* Depok : FMIPA UI.
- [17] D.S. Shriner, E.B. Cowling. 1980. Effects of Rainfall Acidification on Plant Pathogens. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, 1 Oak Ridge, Tennessee 37830
- [18] R.L. Pecsok, L.D. Shields, T. Chairs and I.G. McWilliam. 1976. *Modern Methods of Chemical Analysis*. John Wiley & Sons: United States of America.
- [19] U. Supratman. 2010. *Elucidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya Padjajaran.
- [20] Underwood dan J. R. Day. 1986. Diterjemahkan oleh Aloysius Hadyana. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi Kelima. Jakarta: Erlangga.