

Isolasi, Identifikasi Dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Fraksi n-Heksana Kayu Akar Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.) Yang Tidak Aktif Terhadap Udang *Artemia salina* Leach.

Jamius B. Stepanus*¹ dan Nunuk H. Soekamto²

¹Fakultas Teknik, Universitas Papua, Manokwari, Indonesia

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar Indonesia

*alamat email korespondensi: j.stepanus@unipa.ac.id

Abstract

*Ethnobotany exploration and base on chemotaxonomy and phylogenetic study, shown that root wood of *Kleinhovia hospita* Linn (Paliasa) plant potentially produces various structure and bioactive of secondary metabolite. This research aimed was to isolate, identify and determine the bioactivity of secondary metabolite of n-hexane fraction that not active towards *Artemia salina* Leach shrimp from root wood of *Kleinhovia hospita* Linn plant. Isolation methods that used were extraction, fractionation and purification. Secondary metabolite identification by analyses IR spectroscopy while bioactivity test based on Brine Shrimp Lethality Test (BST) using *A. salina*. Result showed that two compounds were obtained, predicted as steroidal alkaloid with their toxicity value (LC_{50}) were $> 1000 \mu\text{g/mL}$ dan $107,54 \mu\text{g/mL}$ respectively.*

Keywords: *Artemia salina* Leach., *Kleinhovia hospita* Linn., IR spectrum, Sterculiaceae, steroidal alkaloid.

Abstrak

*Penelusuran secara etnobotani dan berdasarkan kajian kemotaksonomi serta filogenetik menunjukkan kayu akar tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) berpotensi menghasilkan metabolit sekunder dengan stuktur beragam dan bersifat bioaktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menentukan bioaktivitas metabolit sekunder pada fraksi n-heksan yang tidak aktif terhadap udang *Artemia salina* Leach dari kayu akar tumbuhan *K. hospita*. Metode isolasi yang digunakan terdiri dari ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian. Identifikasi metabolit sekunder melalui analisis spektroskopi IR sedang uji bioaktivitas senyawa berdasarkan metode Brine Shrimp Lethality Test (BST) menggunakan *A. salina*. Hasil penelitian diperoleh dua senyawa yang diduga sebagai*

steroid alkaloidal dengan nilai toksisitas (LC₅₀) masing-masing senyawa adalah > 1000 µg/mL dan 107,54 µg/mL.

Kata Kunci: *Artemia salina* Leach., *Kleinhovia hospita* Linn., spektrum IR, Sterculiaceae, steroid alkaloidal.

I. PENDAHULUAN

Salah satu famili tumbuhan tropis Indonesia yang cukup besar adalah Sterculiaceae yang terdiri atas 70 genus dan sekitar 1500 spesies (Mabberley, 1997). Penelusuran secara etnobotani menunjukkan bahwa tumbuhan famili Sterculiaceae memiliki khasiat pengobatan dan telah dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Misalnya, *P. celebicum* telah dimanfaatkan oleh masyarakat Sulawesi Selatan sebagai obat penyakit disentri, luka pada gusi dan sebagai obat anti infeksi (Marzuki et al., 2014). Akar *Helicteres isora* digunakan untuk radang ginjal kronik dan buahnya sebagai jamur untuk membasmi cacing pita (Kamiya et al., 2001). Sementara itu, daun *Sterculia africana* digunakan sebagai obat kejang-kejang (Hamza et al., 2006).

Hasil survei etnobotani memperlihatkan bahwa salah satu tumbuhan potensial yang banyak ditemukan di daerah Sulawesi Selatan adalah spesies tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. dikenal dengan nama daerah paliasa (Makassar) atau aju pali (Bugis). *K. hospita*

merupakan spesies tumbuhan berkhasiat dari famili Sterculiaceae (WHO, 2009). Kayu akar *K. hospita* berpotensi besar menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang beragam dan yang memiliki sifat bioaktif. Hal ini didukung oleh penyelidikan secara kemotaksonomi dan filogenetik, yaitu spesies-spesies tumbuhan dari famili yang sama memiliki anatomi dan morfologi yang mirip, akibatnya akan mengalami proses fisiologi yang mirip pula. Karena fisiologi berkaitan dengan sel, maka spesies-spesies tumbuhan dari famili yang sama berkemungkinan besar akan memiliki kandungan senyawa kimia yang sama pula.

Penelitian terhadap akar spesies tumbuhan lainnya dari famili Sterculiaceae memperlihatkan potensi senyawa bioaktif. Misalnya, ekstrak etanol dari akar *Hermania depressa*, bermanfaat sebagai antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* (Reid et al., 2005). Ekstrak etanol akar *Helicteres isora* bermanfaat sebagai antidiabetes dan efek hipolipidemik (Chakrabarti et al., 2002). Bagian akar

tumbuhan *Helicteres angustifolia* menunjukkan aktivitas penghambat yang signifikan terhadap pertumbuhan sel-sel *in vivo* melanoma SK-MEL-28 yang akut (Chen et al., 2006). Hoelzel et al. (2005) melaporkan adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol kulit akar *Waltheria douradinha*. Penelitian lainnya menunjukkan ekstrak metanol dari kulit akar *Cola nitida* dan *Cola milleni* memiliki aktivitas antimikrobakteria (Adeniyi et al., 2004).

Berdasarkan studi literatur di atas, diduga bahwa bagian kayu akar dari tumbuhan *K. hospita* yang juga termasuk famili Sterculiaceae berkemungkinan mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif. Hasil kajian terhadap penelitian-penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa hasil ekstrak diperoleh hanya dari pelarut polar. Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi dan menentukan bioaktivitas metabolit sekunder pada fraksi *n*-heksan (sebagai pelarut non polar) yang tidak aktif terhadap udang *Artemia salina* Leach dari kayu akar tumbuhan *K. hospita*.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Sampel

Kayu akar tumbuhan *K. hospita* didapatkan dari Desa Jambu, Kecamatan Bajo, Kabupaten Luwu, Sulawesi Selatan.

Spesimen tumbuhan diidentifikasi di Herbarium Bogoriensis, LIPI Bogor.

2.2 Isolasi

Kayu akar tumbuhan *K. Hospita* yang telah digiling menjadi serbuk dimaserasi dengan pelarut metanol selama 1 x 24 jam sebanyak beberapa kali. Maserat kemudian dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut metanol, lalu dipartisi dengan pelarut *n*-heksan. Hasil partisi *n*-heksan selanjutnya difraksinasi melalui kromatografi kolom vakum (KKV), kromatografi kolom tekan (KKT) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan setiap hasil dari fraksinasi dimonitor kembali melalui analisis dengan KLT.

2.3 Analisis KLT

Analisis dengan KLT dilakukan terhadap maserat, ekstrak hasil partisi, fraksi dan isolat tunggal menggunakan berbagai variasi pelarut/eluen. Eluen yang digunakan dapat berupa campuran dua atau tiga pelarut. Nilai *retention factor* (R_f) dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh noda (cm)}}{\text{Jarak tempuh eluen (cm)}} \quad \text{Persamaan (1)}$$

2.4 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan 3 jenis kromatografi kolom yaitu KKV, KKG dan KKT dengan menggunakan eluen yang bervariasi. Hasil fraksinasi dianalisis dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai agar dapat menggabungkan fraksi-fraksi dengan nilai *retention factor* (R_f) yang sama.

2.5 Uji Toksisitas

Fraksi dan isolat tunggal yang didapatkan diuji toksisitasnya terhadap udang *A. salina* (Meyer et al., 1982).

2.6 Identifikasi

Isolat tunggal/murni diuji kemurniannya melalui pengukuran titik leleh dan melalui analisis KLT dengan menggunakan tiga jenis sistem eluen. Penentuan golongan isolat tunggal dilakukan melalui uji golongan. Elusidasi struktur isolat melalui analisis data spektroskopi IR (Merek Shimadzu Type Alat IRPrestige-21).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Maserasi dan Ekstraksi

Sampel kayu akar *K. hospita* dihaluskan menjadi serbuk (5,09 kg) lalu dimaserasi dengan pelarut metanol selama 1 x 24 jam sebanyak 5 kali. Maserat metanol kemudiannya dievaporasi menghasilkan maserat metanol pekat dengan berat 76,84 g.

Selanjutnya, maserat metanol pekat dipartisi secara kontiniu mulai dari pelarut non polar yaitu *n*-heksana, pelarut semipolar yaitu klorofom (CHCl_3) dan pelarut polar yaitu etil asetat (EtOAc). Hasil partisi diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi

Pelarut	Warna Residu	Berat (g)
<i>n</i> -heksana	Hijau Kehitaman	7,59
CHCl_3^*	Coklat Kemerahan	12,40
EtOAc*	Coklat	11,55

Sumber: Hasil Penelitian (2022)

* Hasil Partisi oleh Peneliti Lain

3.2 Fraksinasi dan Pemurnian

Ekstrak *n*-heksana berwarna hijau kehitaman seberat 7,59 g difraksinasi melalui KKV (diameter kolom 7 cm) dengan peningkatan kepolaran eluen yaitu *n*-heksana, *n*-heksana : EtOAc (eluen 99,5% *n*-heksana : 0,5% EtOAc memberikan $R_f = 0,3$), aseton dan metanol. Hasil fraksinasi diperoleh 26 fraksi utama dan berdasarkan kromatogram hasil analisis KLT diperoleh 16 fraksi gabungan, A-P. Penggabungan fraksi-fraksi berdasarkan nilai R_f yang sama. Penentuan fraksi aktif dan tidak aktif didasarkan metode *Brine Shrimp Test* (BST) dan nilai toksisitas (LC_{50}) masing-masing fraksi gabungan, A-P diperlihatkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Toksisitas (LC_{50}) Fraksi-Fraksi dari Ekstrak *n*-Heksana

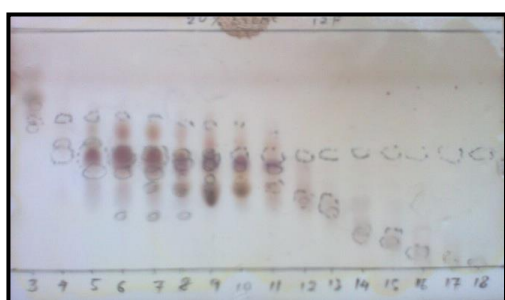
Fraksi	Nilai toksisitas (LC_{50}) ($\mu\text{g/mL}$)
A	-
B	-
C	-
D	769,16
E	836,37
F	> 1000
G	682,67
H	> 1000
I	408,91
J	427,41
K	836,30
L	807,38
M	14,61
N	47,62
O	> 1000
P	665,41

Sumber: Hasil Penelitian (2022)

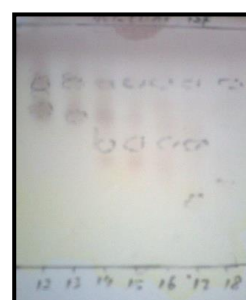
Keterangan :

- (i) Fraksi dengan nilai $LC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ bersifat toksik (fraksi aktif) dan fraksi dengan nilai $LC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ bersifat tidak toksik (fraksi tidak aktif).
- (ii) Nilai LC_{50} fraksi A, B dan C tidak ditentukan karena merupakan fraksi berminyak dan sukar larut dengan pelarut uji.

3.3 Senyawa I



(i) Eluen 80% *n*-heksana : 20% EtOAc

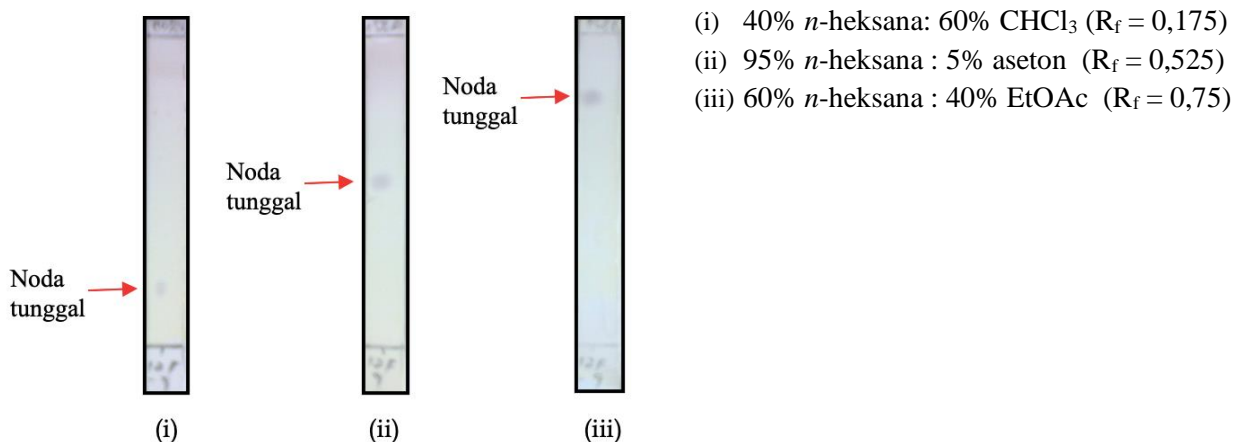


(ii) Eluen 60% *n*-heksana : 40% EtOAc

Gambar 1. Kromatogram Hasil Analisis KLT Fraksi $H_{F,1}$ - $H_{F,22}$ (Sumber: Hasil Penelitian (2022))

Filtrat fraksi H seberat 540,3 mg (berat setelah filtrat dievaporasi) berwarna oranye kekuningan, difraksinasi melalui KKV (diameter kolom 3 cm) dengan peningkatan kepolaran eluen yaitu *n*-heksana, *n*-heksana : EtOAc (eluen 95% *n*-heksana : 5% EtOAc memberikan $R_f = 0,3$), aseton dan metanol. Berdasarkan kromatogram hasil analisis KLT terhadap 22 fraksi dari fraksinasi tersebut (Gambar 1), diperoleh 11 fraksi gabungan yaitu $H_{F,1-2}$, $H_{F,3}$, $H_{F,4}$, $H_{F,5-7}$, $H_{F,8-9}$, $H_{F,10}$, $H_{F,11}$, $H_{F,12-13}$, $H_{F,14-18}$, $H_{F,19-20}$ dan $H_{F,21-22}$.

Endapan putih yang terbentuk pada fraksi $H_{F,8-9}$ (55,4 mg) dikristalisasi dan rekristalisasi dengan pelarut *n*-heksana, CHCl_3 dan aseton menghasilkan kristal putih (42,8 mg). Selanjutnya, diuji kemurniannya melalui analisis KLT menggunakan tiga jenis sistem eluen (Gambar 2). Berdasarkan 3 kromatogram tersebut, maka kristal dari fraksi gabungan $H_{F,8-9}$ merupakan isolat murni dan dinyatakan sebagai **senyawa I**. Senyawa I tidak berpendar di bawah lampu UV.

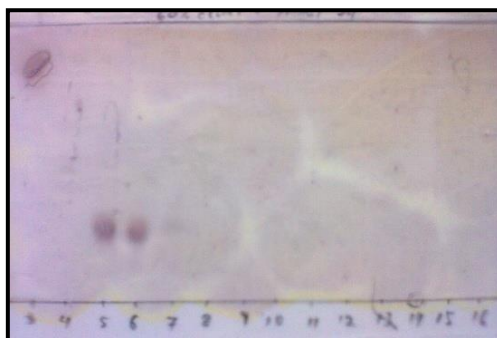


Gambar 2. Kromatogram Hasil Analisis KLT Kristal dari Fraksi Gabungan H_F 8-9
Sumber: Hasil Penelitian (2022)

3.4 Senyawa II

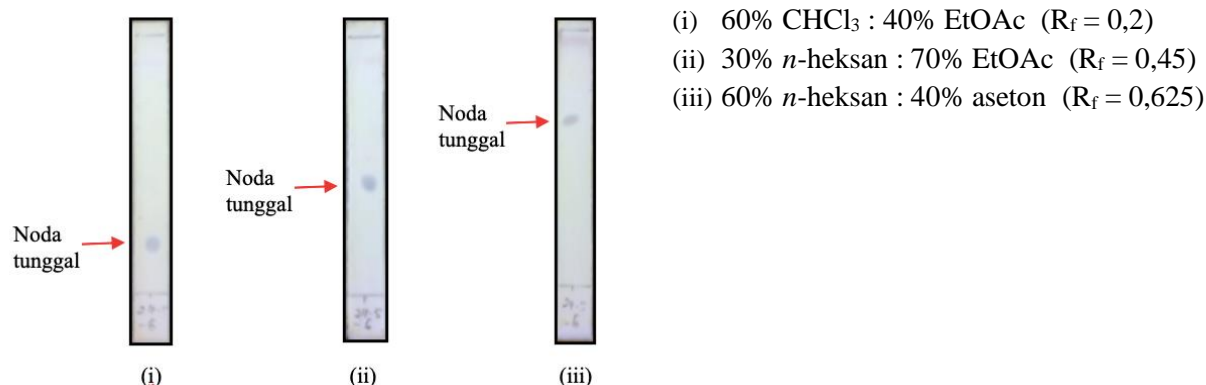
Crude crystal fraksi O berwarna kuning dengan berat 50,9 mg difraksinasi melalui KKG (diameter kolom 7,5 mm) dengan eluen *n*-heksana, 40% *n*-heksana : 60% EtOAc, aseton dan metanol. Hasil fraksinasi diperoleh 16 fraksi dan berdasarkan kromatogram hasil analisis KLT (Gambar 3) diperoleh 6 fraksi gabungan yaitu O₁₋₂, O₃, O₄, O₅₋₆, O₇₋₉, O₁₀₋₁₆. Noda-noda yang teramati pada kromatogram tidak berpendar di bawah lampu UV. Pada fraksi gabungan O₅₋₆, terbentuk

endapan kuning seberat 28,9 mg. Kristalisasi dan rekristalisasi terhadap endapan dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, CHCl₃ dan aseton menghasilkan kristal berwarna kuning yang kemudiannya diuji kemurnian melalui analisis KLT menggunakan tiga jenis sistem eluen (Gambar 4). Noda tunggal pada 3 kromatogram tersebut mengindikasikan bahwa kristal fraksi gabungan O₅₋₆ merupakan isolat murni yang selanjutnya dinyatakan sebagai **senyawa II**. Senyawa II tidak berpendar di bawah lampu UV.



(Eluen 40% *n*-heksana : 60% EtOAc)

Gambar 3. Kromatogram Hasil Analisis KLT Fraksi O₁-O₁₆ (Sumber: Hasil Penelitian (2022))



Gambar 4. Kromatogram Hasil Analisis KLT Kristal Fraksi Gabungan O₅₋₆
 Sumber: Hasil Penelitian (2022)

Tabel 3. Karakteristik Senyawa I dan II

Senyawa	Warna Kristal	Berat (mg)	Titik Leleh (°C)	Pereaksi Liebermann-Buchard	Pereaksi Dragendorff	Nilai Toksisitas (LC ₅₀) (µg/mL)
I	Putih	42,8	135-136	Warna Biru Kehijauan	Endapan Berwarna Kuning	> 1000
II	Kuning	22,3	202-204	Warna Merah Kebiruan	Endapan Berwarna Kuning	107,54

Sumber: Hasil Penelitian (2022)

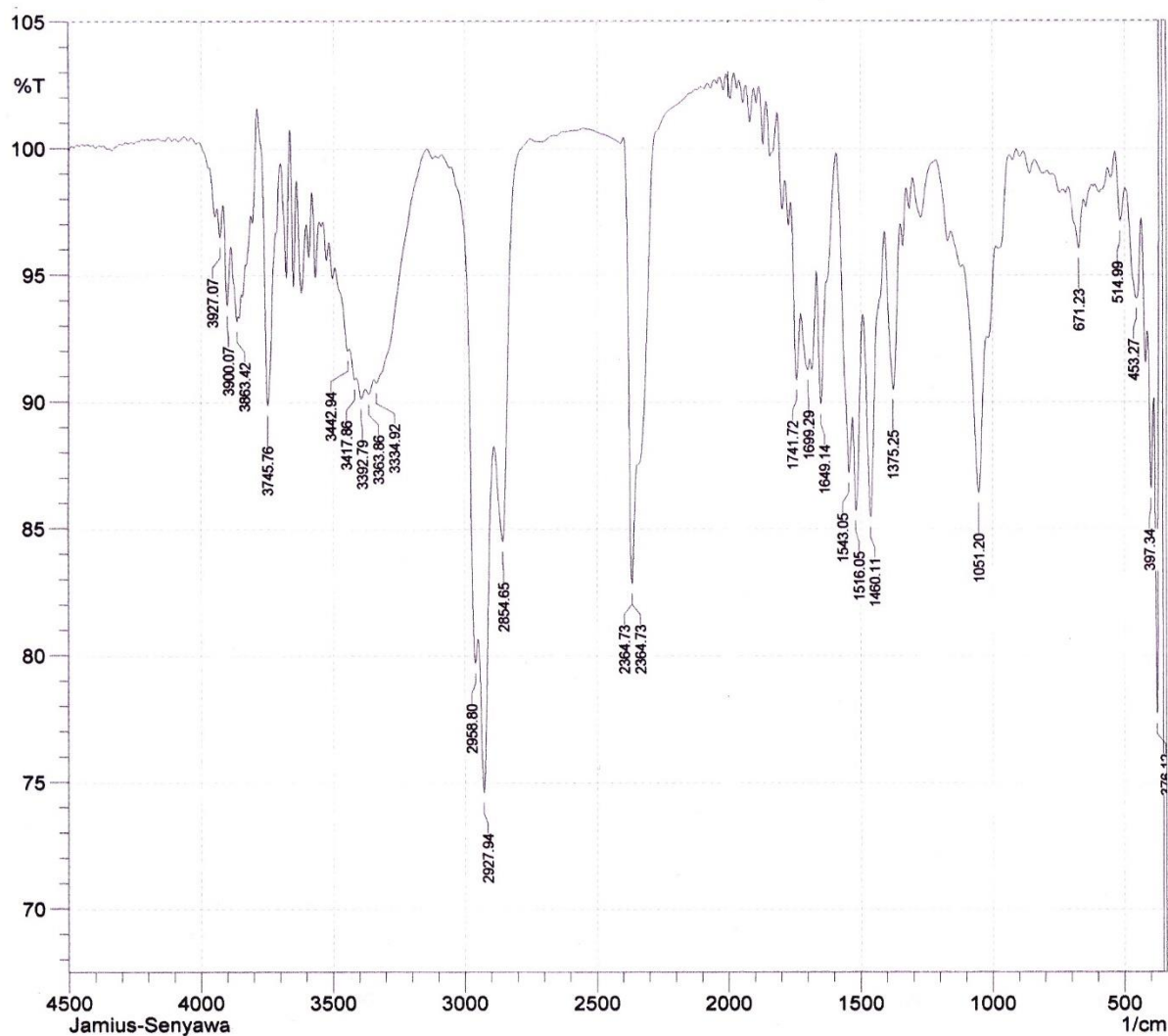
Anderson et al. (1991) melaporkan bahwa suatu ekstrak bersifat toksik jika nilai toksisitasnya (LC₅₀) adalah kurang dari 500 µg/mL sementara suatu senyawa murni bersifat toksik jika nilai toksisitasnya (LC₅₀) adalah kurang dari 200 µg/mL. Nilai LC₅₀ bagi senyawa I dan II masing-masing adalah >1000 µg/mL dan 107,54 µg/mL. Berdasarkan nilai LC₅₀ tersebut, maka senyawa I bersifat tidak toksik sebaliknya senyawa II tergolong sebagai senyawa yang bersifat toksik terhadap benur udang *A. salina*.

3.5 Spektrum *Infra Red* (IR) senyawa I dan senyawa II

Spektrum IR (KBr) senyawa I dapat dilihat pada Gambar 5. Spektrum IR senyawa I memperlihatkan pita serapan (ν_{maks}) pada bilangan gelombang 3392 cm⁻¹ (O-H *stretching*) yang mengidentifikasi gugus OH. Ini didukung oleh serapan pada 1051 cm⁻¹ (C-O *stretching*) sebagai gugus CO. Selanjutnya, teramati gugus CH alifatik pada serapan 2958 cm⁻¹, 2927 cm⁻¹ dan 2854 cm⁻¹ (C-H *stretching*) dan ini diperkuat oleh serapan dari gugus CH₃ dan CH₂ dengan

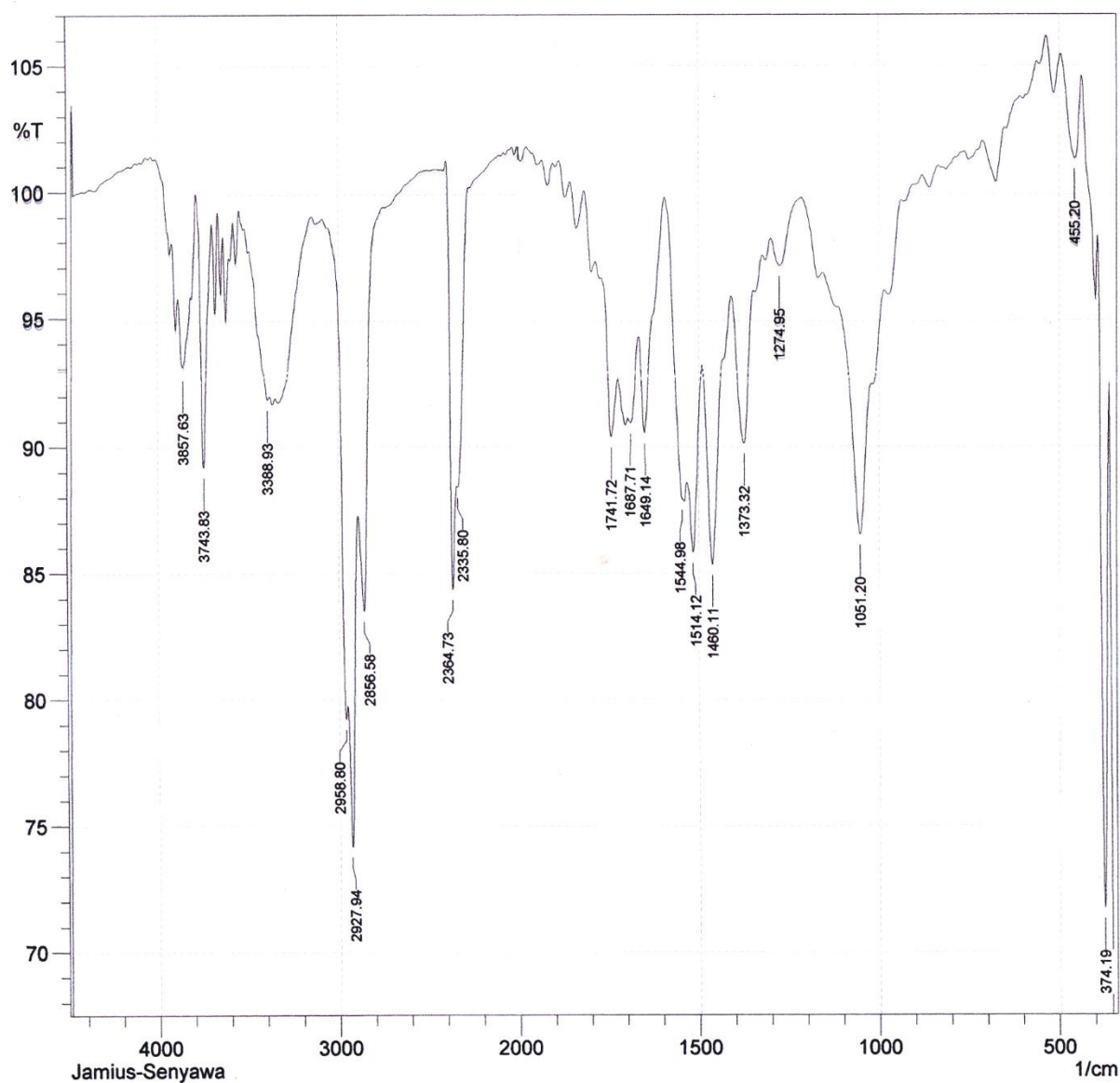
masing-masing bilangan gelombang 1375 cm^{-1} (CH_3 *bending*) dan 1460 cm^{-1} (CH_2 *bending*). Gugus olefin teramati pada serapan 1649 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ *stretching*). Dua gugus karbonil yaitu

$\text{C}=\text{O}$ ester dan $\text{C}=\text{O}$ karboksil masing-masing terlihat pada serapan 1741 cm^{-1} dan 1699 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ *stretching*).



Gambar 5. Spektrum IR Senyawa I

Sumber: Hasil Penelitian (2022)



Gambar 6. Spektrum IR Senyawa II

Sumber: Hasil Penelitian (2022)

Sementara itu, gugus C ikatan rangkap tiga N diperhatikan pada serapan tajam pada bilangan gelombang 2364 cm^{-1} dan ini didukung dengan adanya gugus C-N pada serapan 1543 cm^{-1} dan 1516 cm^{-1} . Hasil uji golongan senyawa I memberikan warna biru

kehijauan setelah penambahan pereaksi Liebermann-Buchard yang menunjukkan bahwa senyawa I positif sebagai senyawa steroid. Dengan adanya gugus C-N pada spektrum, maka dilakukan uji golongan lainnya yaitu uji Dragendorff untuk penentuan

kandungan senyawa alkaloid. Hasil uji Dragendorff terhadap senyawa I memberikan endapan berwarna kuning yang menyatakan bahwa senyawa I positif alkaloid. Berdasarkan data tersebut, diduga senyawa I adalah senyawa steroid alkaloidal.

Hasil uji golongan dengan pereaksi Liebermann-Buchard memperlihatkan warna merah kebiruan yang menyatakan bahwa senyawa II positif steroid. Sementara hasil uji golongan dengan pereaksi Dragendorff teramati endapan berwarna kuning yang menyatakan bahwa senyawa II positif alkaloid. Spektrum IR senyawa II (Gambar 6) memperlihatkan kemiripan dengan spektrum IR senyawa I, sehingga kedua senyawa tersebut memiliki gugus fungsi yang sama. Dengan demikian, senyawa II juga diduga sebagai senyawa steroid alkaloidal.

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian terhadap fraksi *n*-heksana yang tidak aktif terhadap *A. salina* dari kayu akar *K. hospita* telah diisolasi dua metabolit sekunder steroid alkaloidal yaitu senyawa I seberat 42,8 mg (0.56 % untuk setiap gram ekstrak *n*-heksana) dan senyawa II seberat 22,3 mg (0.29 % untuk setiap gram ekstrak *n*-heksana). Senyawa I bersifat tidak toksik dengan nilai toksisitas $LC_{50} > 500$ $\mu\text{g/mL}$ sedangkan senyawa II bersifat toksik dengan nilai toksisitas (LC_{50}) 107,54 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeniyi, B. A., Groves, M. J., & Gangadharam, P. R. J. (2004). In vitro anti-mycobacterial activities of three species of Cola plant extracts (Sterculiaceae). *Phytotherapy Research*, 18(5), 414–418. <https://doi.org/10.1002/ptr.1468>.
- Anderson, J. E., Goetz, C. M., & McLaughlin, J. L. (1991). 107-I I I. *Phytochemical Analysis*, 2, 107–111.
- Chakrabarti, R., Vikramadithyan, R. K., Mullangi, R., Sharma, V. M., Jagadheshan, H., Rao, Y. N., Sairam, P., & Rajagopalan, R. (2002). Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Helicteres isora* in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3), 343–349. [https://doi.org/10.1016/S0378-741\(02\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0378-741(02)00120-4)
- Chen, W., Tang, W., Lou, L., & Zhao, W. (2006). Pregnane, coumarin and lupane derivatives and cytotoxic constituents from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry*, 67(10), 1041–1047. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.005>
- Hamza, O. J. M., van den Bout-van den Beukel, C. J. P., Matee, M. I. N., Moshi, M. J., Mikx, F. H. M., Selemani, H. O., Mbwambo, Z. H., Van der Ven, A. J. A. M., & Verweij, P. E. (2006). Antifungal

- activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 124–2. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.026>
- Hoelzel, S. C. S. M., Vieira, E. R., Giacomelli, S. R., Dalcol, I. I., Zanatta, N., & Morel, A. F. (2005). *An unusual quinolinone alkaloid from Waltheria douradinha*. 66, 1163–1167. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.03.019>
- Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Endang, H., Umar, M., & Satake, T. (2001). Flavonoid glucuronides from *Helicteres isora*. *Phytochemistry*, 57(2), 297–301. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00005-X)
- Mabberley, D. J. (1997). *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants* (Second). Cambridge University Press.
- Marzuki, A., Noor, A., Soekamto, N., & Harlim, T. (2014). *Elusidasi Struktur Molekul Asam 2,3, 32-trihidroksi-12-oleanen-28-oat Ekstrak Kloroform Pterospermum celebicum Miq* [Universitas Hasanuddin]. <http://repository.unhas.ac.id/handle/123456789/10212>
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(1), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Reid, K. A., Jäger, A. K., Light, M. E., Mulholland, D. A., & Van Staden, J. (2005). Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.010>
- WHO, W. H. O. (2009). *Medical Plants in Papua New Guinea*. WHO Press.