

Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksan Batang Brotowali (*Tinospora crisper* Linn)

Isolation and Identification of Secondary Metabolite Compound of n-Hexane Stem Extract of Brotowali (*Tinospora crisper* Linn)

¹⁾ Marlina, ²⁾ Sudding, ³⁾ Pince Salempa

Universitas Negeri Makassar, Jalan Mallengkeri Raya, 90224

Chemist_lina@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini adalah penelitian eksplorasi yang bertujuan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak n-heksana daun *Tinospora crisper* Linn. yang berasal dari kelurahan desa Padang, kecamatan Gantarang, kabupaten Bulukumba, Sulawesi Selatan. Isolasi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu maserasi, partisi dengan n-heksana, fraksinasi, uji kemurnian dan identifikasi. Hasil penelitian diperoleh isolat murni berupa kristal jarum berwarna putih bening dengan titik leleh 108,5-109,5⁰C. Hasil uji dengan pereaksi Liebermann-Buchard membentuk cincin hijau menunjukkan positif steroid. Isolat diidentifikasi dengan menganalisis spektrum infra merah yang menunjukkan bilangan gelombang (cm⁻¹) yakni: 1055,06 (C-O); 1462,02 dan 1377,17 (CH₂ dan CH₃), 1653,00 (C=C); 2933,73 (C-H); 3439,08 (OH alkohol) dan hasil GC-MS menunjukkan massa molekul senyawa 396. Berdasarkan hasil analisis dan penelusuran literatur serta membandingkan pada database Willey Library menunjukkan bahwa isolat adalah senyawa golongan steroid dengan struktur yang disarankan stigmastan-3,5-dien dengan nama trivial cholestadiena.

Kata kunci: Isolasi, *T.crispa* Linn., steroid, GC-MS, stigmastan-3,5-dien, cholestadiena

ABSTRACT

This study is exploratory research that aim to isolate the secondary metabolite compound contained in the n-hexane extract of stem of *Tinospora crisper* Linn from Padang villages, districts Gantarang, regency Bulukumba, Sulawesi Selatan. Isolation is done in several stages, maceration, partitioning with n-hexane, fractionation, purity testing and identification. The result is obtained pure isolate white needle crystal with a melting point of 108,5-109,5⁰C. The test result with the Liebermann-Buchard reagent to form a green ring indicated a positive steroid. Isolate is identified by analyzing the infra red spectrum which showed the wave number (cm⁻¹) are: 1055,06 (CO); 1462,02 and 1377,17 (CH₂ and CH₃), 1653,00 (C = C); 2933,73 (C-H); 3439,08 (OH alcohol) and the result of GC-MS showed a compound molecular weight of 396. Based on the analysis and literature and compare the Willey Library database showed that isolate is steroid compound it is suggested a Stigmastan-3,5-diene with trivial name Cholestadiene.

Keyword: Isolation, *T.crispa* Linn., Steroid, GC-MS, Stigmastan-3,5-diene,, Cholestadiene

PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati Indonesia merupakan sumber kekayaan sangat melimpah dan tak ternilai harganya. Keanekaragaman tersebut sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat atau bahan baku obat baik penggunaannya secara tradisional maupun modern. Pengetahuan obat tradisional diusahakan agar dapat sejalan dengan pengobatan modern karena setiap tumbuhan menghasilkan satu atau lebih senyawa bioaktif dengan aktivitas tertentu. Pengetahuan akan kandungan kimia suatu tumbuhan merupakan suatu langkah awal pemahaman tumbuhan sebagai obat modern karena tumbuhan mengandung senyawa bioaktif dalam bentuk metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, tanin, dan kumarin. Keberadaan senyawa metabolit sekunder inilah yang menyebabkan tumbuhan telah banyak digunakan sebagai obat, zat pewarna, perasa,

Salah satu tanaman yang sering digunakan oleh masyarakat untuk obat tradisional adalah tanaman brotowali (*Tinospora crispa* Linn). Brotowali merupakan tanaman yang berasal dari family menispermaceae yang banyak mengandung alkaloid, damar lunak, pati, glikosida pikroretosid, zat pahit pikroretin, harsa, berberin, palmatin dan kolumbin (Pachaly, et al, 1992).

Famili menispermaceae terdiri dari 70-75 genus dan sekitar 450 spesies. Menispermaceae kaya akan alkaloid dan daun-daunan dari berbagai spesies menispermaceae telah digunakan di Afrika, Asia dan Amerika. Beberapa jenis menispermaceae dipakai sebagai

bahan ramuan obat adalah *T. cordifolia*, *T. malabarica* dan *T. crispa* (Barneby, 2004)

Habitus (perawakan) dari tumbuhan ini tergolong tumbuhan panjat (liana) yang dapat membelit (kekanan) dengan batang atau ranting (bentuk spiral). Batang bulat, warna hijau-cokelat, sukulen (succulent), batang tua disertai benjolan-benjolan (tuberculatum); dari batang dapat keluar "akar gantung" yang tumbuh dan dapat mencapai tanah. Daun tunggal, tanpa stipula, bentuk jantung ujung daun runcintepi rata, tulang daun menjari (5-7 tulang daun), Ukuran helai daun (6-13 cm) x (7-14) cm; helai daun hijau muda dan halus, tangkai daun panjang (3-11 cm), pangkal, bengkok dan membesar, filotaksis tersebar (folio sparsa). Bunga kecil, hijau keputihan (kuning muda), aksiler atau cauliflorous, perbungaan (infloresensi) rasemos (pendulus), bentuk bunga aktinomorfi, uniseksual, bunga jantan dengan 6 sepal (hijau), petal 3, stamen 6, bunga betina jarang diketemukan. Buah batu (kecil) dan sangat jarang diketemukan. Seluruh bagian tumbuhan rasanya sangat pahit (terutama batang); batang jika diiris akan keluar cairan (getah) jernih, rasa pahit (Zenta, 1998).

Tumbuhan brotowali ini tersebar di Indonesia terutama di bagian timur seperti Sulawesi, Maluku dan Irian, sedangkan di bagian barat yaitu pulau Jawa, Kalimantan dan Sumatera.

Studi pustaka terhadap kandungan kimia jenis-jenis tumbuhan dari keluarga Menispermaceae menunjukkan

adanya beberapa macam alkaloid, yaitu berberina, palmatina, kolumbamina, yatorrhiza. Flavanoid adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat pada tumbuh brotowali. Senyawa flavanoid terbukti mempunyai efek hormonal, khususnya efek estrogenik. Khasiat Batangnya dimanfaatkan untuk rematik, memar, demam, merangsang nafsu makan, sakit kuning, cacingan, dan batuk. Air rebusan daun Brotowali sering dimanfaatkan untuk mencuci luka pada kulit atau gatal-gatal. Sedangkan rebusan daun dan batang brotowali dipergunakan untuk penyakit kencing manis. Seluruh bagian tanaman ini bisa digunakan untuk mengobati penyakit kolera (Kresnady,2003).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkaji kandungan kimia tumbuhan brotowali. Penelitian sebelumnya pada jaringan batang tumbuhan ini telah ditemukan senyawa alkaloid dari ekstrak methanol. pada penelitian ini kembali akan dilakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak n-heksan kulit batang tumbuhan brotowali (*T. crispa*).

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat untuk tahap preparasi sampel yaitu blender dan baskom. Alat untuk proses ekstraksi dan identifikasi yaitu, bejana maserasi, evaporator, corong Buchner, kolom kromatografi cair vakum, kolom flash, labu erlenmeyer berbagai ukuran, gelas ukur, corong biasa, gelas kimia, pipet tetes, plat tetes, pipa kapiler, botol semprot, botol vial, batang pengaduk, lampu UV (panjang

gelombang 254 nm dan 365 nm), penangas air, oven, chamber, alat pengukur titik leleh, spektrofotometer FTIR dan spektrofotometer GC-MS. . Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, n-heksan, etil-asetat, kloroform, aquadest, beberapa reagen seperti pereaksi Liebermann-Buchard, FeCl_3 , Mayer, Wagner, silika gel G 60, pelat KLT aluminium berlapis silika gel 60 GF₂₅₄, aluminium foil dan kertas saring.

B. Prosedur Kerja

1. Ekstraksi

Batang brotowali dicuci terlebih dahulu kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Batang yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender. Sebanyak 4,5 kilogram serbuk halus batang brotowali dimaserasi dengan metanol selama 3x24 jam. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan evaporator sampai kira-kira tinggal seperempat dari volume awal (ekstrak kental). Selanjutnya dilakukan uji pendahuluan terhadap ekstrak kental yang diperoleh dengan berbagai pereaksi diantaranya pereaksi Liebermann-Burchard (terpenoid dan steroid), FeCl_3 (flavonoid), Mayer (alkaloid), dan Wagner (alkaloid).

2. Fraksinasi

Sebelum difraksinasi, ekstrak kental dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan eluen etil asetat : n-heksan, n-heksan : kloroform, dan etil asetat : kloroform pada berbagai perbandingan untuk mengetahui jenis pelarut dan perbandingan yang sesuai pada kromatografi kolom cair vakum. Ekstrak kental yang terdiri dari

beberapa komponen tersebut difraksinasi dengan metode kromatografi kolom cair vakum menggunakan silika gel 60 H Merck dan silika gel G 60 (230 – 400 mesh) sebagai fasa diam, sedangkan eluennya menggunakan eluen dari hasil KLT. Hasil fraksinasi di KLT dengan eluen yang sama, kemudian yang sama nilai R_f nya digabungkan.

Selanjutnya fraksi gabungan difraksinasi dengan kromatografi kolom flash. Tujuan dari kromatografi kolom flash adalah untuk memisahkan senyawa yang diperoleh yang berasal dari fraksinasi kromatografi kolom cair vakum sehingga lebih murni. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis menggunakan KLT. Fraksi-fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama digabung kemudian diuapkan hingga diperoleh padatan.

3. Pemurnian

Komponen padatan yang diperoleh dikristalisasi atau direkristalisasi. Kemurnian senyawa yang diperoleh ditentukan dengan melakukan KLT sistem tiga eluen dengan eluen etil asetat:*n*-heksan, *n*-heksan:kloroform, etil asetat:kloroform dan uji titik leleh. Jika titik leleh senyawa menunjukkan trayek titik leleh yang tajam, maka senyawa tersebut dinyatakan murni secara KLT dan titik leleh.

4. Identifikasi

Kristal diuji menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard, $FeCl_3$, Wagner dan Mayer untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dan identifikasi lebih lanjut dilakukan uji spektroskopi dengan

menggunakan spektrofotometer inframerah dan spektrofotometer massa untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

Preparasi sampel dan ekstraksi

Batang brotowali yang telah dibersihkan kemudian dipotong kecil dan dikeringkan dalam suhu ruangan. Sampel kering digiling menggunakan blender hingga diperoleh serbuk halus sebanyak 4,5 kg.

Maserasi dilakukan selama 3x24 jam selanjutnya diuapkan menggunakan rotaryvapor menghasilkan ekstrak metanol kental $\pm 3,5$ L berwarna hijau pekat. Partisi dengan *n*-heksana diperoleh ekstrak *n*-heksana berwarna hijau sebanyak $\pm 3,5$ L. Ekstrak *n*-heksana hasil partisi diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana berwarna hijau pekat dengan berat $\pm 21,0628$ g.

B. Uji golongan

Ekstrak *n*-heksana yang diperoleh dilakukan uji warna dengan menggunakan pereaksi $FeCl_3$, Lieburmann-Buchard, Mayer dan Wagner.

Tabel 1. Hasil Uji Warna Ekstrak *n*-Heksan

Pereaksi	Perubahan warna yang terjadi	Ket
Wagner	Hijau \rightarrow Kuning	(-) Alkaloid
Meyer	Hijau \rightarrow Orange	(-) Alkaloid
$FeCl_3$ 1%	Hijau \rightarrow Hijau	(-) Flavonoid
Lieberman-Burchard	Hijau \rightarrow Biru	(+) Steroid

C. Fraksinasi dan Pemurnian

Sebanyak 8,003 g ekstrak n-heksan diidentifikasi menggunakan KLT dengan beberapa uji eluen yang digunakan pada KLT yaitu kombinasi etilasetat:n-heksan, n-heksana:kloroform dan kloroform:etil asetat dalam berbagai perbandingan. Dari hasil KLT diperoleh bahwa eluen kombinasi etil asetat:n-heksan memberikan pola pemisahan yang lebih baik dan penampakan nodanya jelas. Fraksinasi dilakukan dengan metode kromatografi kolom cair vakum (KKCV) menggunakan silika gel G 60 sebagai fasa diam dan fase gerak dimulai dari pelarut non-polar n-heksana 100%, kemudian kepolaran ditingkatkan mulai dari kombinasi etil asetat dengan n-heksana dalam berbagai perbandingan hingga etil asetat 100%. Hasil KKCV diperoleh 34 fraksi. Fraksi 1-34 yang diperoleh diidentifikasi melalui KLT dengan eluen kombinasi etil asetat:n-heksana (1:9). Fraksi-fraksi yang menunjukkan pola kromatogram yang sama digabung, sehingga diperoleh 16 fraksi gabungan. Fraksi gabungan G dengan berat 1,06 gram yang dipilih terdapat isolat yang Fraksi G difraksinasi lebih lanjut kromatografi kolom flash (KKF) dengan menggunakan silika gel G 60 H Merck sebagai fasa diam, sedangkan fasa gerak menggunakan eluen n-heksana 100%, kombinasi etil asetat : n-heksana dengan perbandingan (1:9) kemudian etil asetat 100% dan terakhir dengan metanol 100%. Eluen ditampung dalam botol vial diperoleh sebanyak 125 fraksi. Fraksi

hasil KKF diidentifikasi dengan KLT untuk mengetahui komponen senyawa kimia yang terdapat pada fraksi. Fraksi yang memiliki pola kromatogram sama digabung sehingga diperoleh 19 fraksi gabungan. Fraksi-fraksi diuapkan pada suhu ruang. Fraksi yang memiliki isolat yang paling banyak adalah fraksi G₇ yang membentuk kristal jarum berwarna kuning putih.

B. Pembahasan

1. Uji Kemurnian

Kemurnian isolat diuji dengan KLT tiga macam eluen dengan pelarut dan perbandingan yang berbeda untuk memastikan kemurnian dari isolat dengan munculnya satu noda pada tiap KLT. Analisis KLT pada tiga macam eluen yaitu eluen etil asetat:kloroform (2:8), etil asetat:n-heksana (3:7) dan kloroform:n-heksana (9:1) menunjukkan satu noda. Deteksi dengan lampu UV 254 dan UV 366 tidak menunjukkan adanya noda yang berpendar, ini menunjukkan bahwa struktur kimia isolat tidak memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Noda hasil elusi yang tidak tampak di bawah lampu UV disemprot dengan reagen penampak noda CeSO₄ 2% dan dipanaskan di atas *hotplate* sehingga diperoleh noda yang berwarna kemerahan dan dapat disimpulkan bahwa isolat fraksi G₇ relatif murni secara KLT.

2. Uji golongan

Identifikasi dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard menunjukkan bahwa isolat G₇ positif steroid yang ditandai dengan adanya perubahan warna dari bening menjadi hijau yang berasal

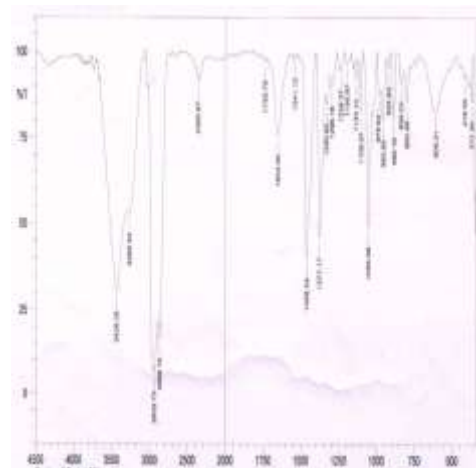
dari reaksi antara sterol tidak jenuh dengan asam.

3. Uji Spektroskopi

a. Uji FTIR

Identifikasi isolat dilakukan dengan analisis spektroskopi infra merah (IR) Shimadzu Prestige-21 dengan pellet KBr. Analisis spektrum IR isolat G₇ memberikan serapan pada daerah bilangan gelombang (ν) 3439,08 cm⁻¹ yaitu pita yang agak lebar dengan intensitas sedang yang diidentifikasi sebagai vibrasi ulur O-H. Vibrasi ikatan ini diduga merupakan vibrasi dari gugus O-H sehingga terjadi ikatan hidrogen antarmolekul didukung dengan adanya serapan tajam dengan intensitas sedang pada daerah ν 1055,06 cm⁻¹ yang diidentifikasi sebagai vibrasi ulur C-O alkohol sekunder siklik. Senyawa hidroksilat memperlihatkan pita rentangan O-H pada 3650-3200 cm⁻¹

dan pita deformasi ke dalam bidang pada 1450-1250 cm⁻¹ serta keluar bidang pada 750-650 cm⁻¹ ditambah pita vibrasi rentangan C-O pada daerah 1210-1000 cm⁻¹. Kedudukan O-H dalam molekul berada pada posisi 3 β (ekuatorial) tabel 2 dan Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Spektrum Infra merah isolat G₇

Tabel 2. Interpretasi Spektrum Infra Merah dari Isolat Fraksi G₇

Isolat	Pita Serapan FTIR (cm ⁻¹)			Gugus Fungsi
	β -sitosterol ^{*)}	Clionasterol ^{**)}	Pustaka ^{***)}	
3439,08	3440,62	3417,36	3450-3200	O-H
2933,73	2936,69	2936,87	2800-3000	C-H alifatik
1653,00	1646,55	1661,53	1680-1620	C=C
1462,04	1463,42	1464,54	1475-1300	C-H (pada CH ₂)
1377,17	1381,65	1376,22	1475-1300	C-H (pada CH ₃)
1055,06	1053,89	1051,74	1050-1260	C-O alkohol
960,55	970,32	956,64	995-710	=CH (alkena)

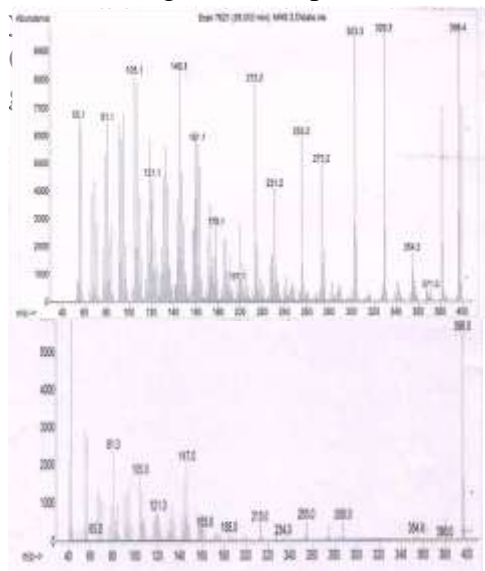
Sumber : ^{*)} Fitriani, 2013.

^{**)} Saleh, C., 2007.

^{***)} Creswell, *et al.*, 1982.

b. Spektroskopi GC-MS

Frakasi G₇ telah dinyatakan murni secara KLT dan telah diketahui gugus fungsinya, dan pada pengujian dengan spektroskopi massa masih terdapat beberapa senyawa yang struktur dan puncak ion molekulnya hampir sama sehingga yang diambil adalah base peak yang dominan. Base peak 35 Menunjukkan m/z 396 yang merupakan puncak ion molekul [M]⁺ dan m/z 43 merupakan fragmen yang paling stabil dalam spektrometer massa dengan kelimpahan 100%

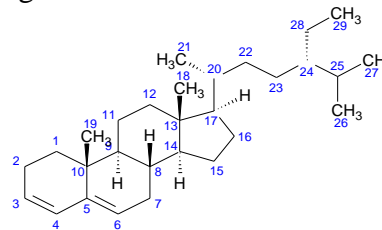


Gambar 2. Perbandingan Spektrum Massa Isolat G₇ dengan Literatur

Mekanisme fragmentasi cincin A dan cincin B pada fraksi G₇ menandakan adanya puncak ion m/z 329, puncak tersebut merupakan fragmentasi dari Δ^5 -sterol yang disertai dengan pemutusan rantai samping yang terikat pada C₃H₇ sehingga memberikan puncak ion dengan m/z 213.

Jenis ikatan tertentu biasanya meregang pada kisaran sempit dengan frekuensi tertentu dan jumlah

energi tiap kisaran tersebut mempengaruhi getaran (vibrasi) ikatan, hal ini terjadi pada gugus OH yang terbaca pada spektrum inframerah dan tidak terbaca oleh spektroskopi massa, karena pada hasil analisa GC-MS masih terdapat beberapa senyawa yang memiliki ion molekul yang hampir sama. Spektrum inframerah yang menunjukkan keberadaan gugus fungsi hidroksi (-OH, 3 β ekuatorial), alkil (CH₃ dan CH₂), ikatan rangkap (ena) non-konjugasi (Δ^5), dan geminal dimetil -CH(CH₃)₂, dari gugus fungsi tersebut menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah steroid. Dugaan ini dikuatkan dengan adanya data interpretasi dari spektrum massa dengan puncak ion molekul m/z 396 dan m/z 43 merupakan fragmen yang paling stabil dalam spektrometer massa dengan kelimpahan 100% yang diduga sebagai puncak dasar (*base peak*). Sehingga, senyawa tersebut diduga steroid kelompok stigmastan dengan struktur stigmastan-3,5-diena dengan nama trivial cholestadiena.



Gambar 3. Struktur Senyawa Stigmastan-3,5-diena

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diisolasi dari batang *Tinospora crispa* L. dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder ekstrak n-heksan yang

berupa kristal putih berbentuk jarum dengan titik leleh 108,5°C-109,5°C merupakan senyawa golongan steroid yaitu Stigmastan. Hal tersebut didukung oleh beberapa data antara lain, uji golongan dengan Liebermann-Burchard yang menunjukkan positif steroid, Penentuan struktur kimia menggunakan spektrometer FTIR dan GC-MS menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa steroid dengan gugus fungsi OH, C=C nonkonjugasi, C-O, dan C-H serta memiliki massa molekul m/z 396. Data interpretasi menunjukkan kemiripan dengan senyawa Δ^3 -sterol sehingga disarankan bahwa isolat adalah steroid jenis stigmastan-3,5-diena dengan nama trivial cholestadiena.

B. Saran

Adapun hal-hal yang disarankan berkaitan dengan penyempurnaan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan penelitian lanjutan terhadap fraksi –fraksi yang tidak dilanjutkan.

2. Perlu dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrometer NMR-¹H, NMR-¹³C, DEPT, HMQC, COSY dan HMBC untuk memantapkan struktur senyawa isolate yang sebenarnya

DAFTAR PUSTAKA

- Barneby, R. & White, P. 2004. *Menispermaceae Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton University Press : Princeton, New Jersey. pp. 247–249.
- Cresswell, C.J. & Runquist, O.A. 1982. *Analisis Spektrum*

Senyawa Organik. Bandung: Penerbit ITB

- Fitriani. 2013. Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa β -sitosterol dari Kulit Batang *Kleinhovia hospita* Linn. *Skripsi*. Makassar: Universitas Negeri Makassar
- Kresnady, Budi. 2003. *Khasiat Dan Manfaat Brotowali*. Jakarta: Agro Media Pustaka.
- Pachaly,dkk. 2006..*NMR assignme of N-acetylporphine alkaloids from Tinosporacrispa* *PlantaMedica*58(2):184<https://www.thiemeconnect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961425/PDF>.
- Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn). *Disertasi*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Zenta, F., & Kumanireng, H.A.S. 1999. *Teknik Laboratorium Kimia Organik*. Makassar: Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin