Metode Isolasi Senyawa Bioaktif pada Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita Linn.*)

Isolation Method of Bioactive Compounds in Paliasa (*Kleinhovia hospita Linn.*)

[1)]Iwan Dini dan [2)]Darminto
[1,2)]Jurusan kimia FMIPA UNM
iwandini@yahoo.com

ABSTRAK

Tumbuhan paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.) yang digunakan sebagai obat diduga memetabolisme banyak jenis senyawa yang bersifat bioaktif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui metode dalam mengisolasi senyawa bioaktif pada tumbuhan paliasa khususnya pada kulit batang. Dua isolat tunggal diperoleh dan berdasarkan uji regen yaitu isolat (1) senyawa fenol, (2) senyawa golongan alkaloid. Uji bioaktivitas dengan metode BST uji terhadap benur udang *Artemia salina* Leach. Keduanya memperlihatkan toksisitas yang cukup tinggi dengan LC_{50} masing-masing 175,02, dan 143,59 μg/mL. Kedua senyawa ini diperoleh melalui metode uji bioaktivitas (BST) terhadap setiap tahap maserasi, partisi dan fraksinasi.

Kata Kunci; *metode isolasi, senyawa bioaktif, paliasa*

ABSTRACT

Paliasa (Kleinhovia hospita Linn.) is used as a drug suspected metabolism many kinds of bioactive compounds. This study was conducted to known the method for isolate bioactive compounds in paliasa especially in bark. Two single isolates was obtained and based on reagent test (1) phenolic compounds, (2) alkaloid groups. Bioactivity test with BST test to fry shrimp *Artemia salina* Leach. Both of them showed high toxicity with LC_{50} respectively 175.02 and 143.59 μg/mL. Both of these compounds obtained by bioactivity test (BST) method on every maceration stage, partition, and fractionation.

Keywords: *isolation method, bioactive compounds, paliasa*

PENDAHULUAN

Penelitian kimia organik bahan alam sudah banyak diarahkan pada tumbuhan tropis, terutama tumbuhan tingkat tinggi untuk menemukan senyawa-senyawa kimia baru yang dapat digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan senyawa-senyawa kimia yang berguna dalam industri farmasi dan agrokimia. Tumbuhan tropis diyakini mempunyai kemampuan merekayasa beranekaragam senyawa kimia yang mempunyai berbagai bioaktivitas yang menarik. Kemampuan tersebut salah satunya akibat mekanisme pertahanan diri terhadap ancaman lingkungan, karena pada umumnya hidup di bawah kondisi lingkungan yang keras, baik faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga, dan hama penyakit. Untuk itu, tumbuhan tropis dapat menghasilkan senyawa-senyawa kimia alami yang

bersifat pestisida, insektisida, antifungal, dan sitotoksik.

Tumbuhan paliasa termasuk salah satu jenis tumbuhan tropis dan tersebar secara luas di kepulauan Indonesia. Tumbuhan ini diyakini dapat menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas menarik dan efek terapetik yang ampuh. Secara tradisional daun tumbuhan paliasa sudah dimanfaatkan sebagai obat tradisional secara luas oleh masyarakat khususnya di Sulawesi Selatan dan dipercaya berkhasiat sebagai obat yang mampu mengobati penyakit liver, hipertensi, dan diabetes.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, ekstrak metanol dan ekstrak eter daun paliasa 15 % mampu meningkatkan regenerasi sel-sel hati mencit (Suryawati, 1991) dan infus daun paliasa mampu menurunkan kolesterol, hipertensi dan glukosa darah pada kelinci (Herlina, 1993). Kambium pohonnya digunakan untuk menyembuhkan pneumonia dan juga menghilangkan kutu rambut dan bisa berfungsi sebagai anti tumor dalam sarkoma mencit (Latif, 1997). Ekstrak daun paliasa juga dapat melindungi radang hati pada tikus putih betina *Strain wistar* yang diakibatkan oleh CCl_4 dan mengandung senyawa saponin, kardenolin, bufadienal dan antarkinon (Raflizar, 2000). Penelitian yang dilakukan oleh Hasni (2002) mengemukakan bahwa daun paliasa mempunyai efek anti diabetes dengan mekanisme penghambatan terhadap transpor aktif glukosa.

Penelitian yang dilakukan dalam mengisolasi senyawa organik yang terdapat dalam daun paliasa berdasarkan beberapa tingkat polaritas pelarut, menunjukkan bahwa sekurang-kurangnya ada 96 isolat tunggal dan secara instrumentasi menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid dan fenolik (Noor dan kumanireng, 2004). Kemudian hasil penelitian yang dilakukan oleh Taebe (2004) berhasil diidentifikasi adanya golongan senyawa flavonoid dan alkaloid. Kemudian pada fraksi metilen klorida dari fraksi aktif diisolasi satu senyawa turunan kumarin yang diduga sebagai skopoletin (Wiwi, 2005).

Penelitian mengenai kandungan kimia khususnya metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan paliasa sampai sekarang ini baru pada daunnya, belum secara keseluruhan meliputi batang dan akarnya. Sedangkan untuk menemukan senyawa kimia yang bersifat bioaktif pada tumbuhan khususnya pada tumbuhan tingkat tinggi tidak hanya pada daunnya. Pada batang dan akar memungkinkan juga bisa ditemukan karena proses metabolisme yang terjadi pada tumbuhan dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder juga terjadi pada kulit batang.

Penelitian terhadap kulit batang paliasa ini dilakukan untuk mendukung informasi yang berbasis ilmiah dan dapat dipertanggungjawabkan. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut terutama kandungan kimianya penting dilakukan secara keseluruhan baik daun, batang, maupun pada akarnya.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan pada metode yang telah sering digunakan dalam mengisolasi senyawa kimia bahan alam yang meliputi pemilihan spesies tumbuhan, penentuan lokasi pengambilan sampel, persiapan dan pengambilan sampel tumbuhan, maserasi, partisi, fraksinasi, pemurnian dan analisis senyawa baik dengan pereaksi regen maupun dengan spektroskopi dari senyawa murni yang ditemukan dan

dilanjutkan dengan uji-uji aktivitas dari senyawa yang ditemukan. Metode penelusuran senyawa bioaktif dilakukan dengan penelusuran disertai dengan pengujian ekstrak. Ekstrak yang bersifat aktif dilanjutkan untuk purifikasi sampai ditemukan senyawa murni yang bersifat bioaktif.

A. Prosedur Kerja

1. Pengumpulan bahan tumbuhan

Kulit batang paliasa diambil dan dikumpulkan dari Kelurahan manggala, Kecamatan Manggala Makassar pada bulan Mei 2012. Sampel kulit batang tumbuhan paliasa yang diambil terlebih dahulu dibersihkan, dikeringkan diudara terbuka (tanpa sinar matahari) kemudian dihaluskan menggunakan blender dan dikeringkan kembali dengan udara terbuka tanpa kena sinar matahari.

2. Ekstraksi dan Fraksinasi

a. Ekstraksi. Serbuk kulit batang paliasa yang telah dihaluskan dan dikeringkan dimaserasi selama 1 x 24 jam sebanyak 4 kali dengan pelarut metanol. Maserat yang diperoleh dari hasil penyaringan menggunakan penyaring Buchner dengan kertas Whatman di evaporasi sampai diperoleh maserat metanol agak kental. Ekstrak metanol diekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut pada kepolaran yang berbeda-beda dimulai dari pelarut yang paling nonpolar yaitu n-heksan, metilen klorida, kemudian kloroform, dan etil asetat. Setiap fraksi yang diperoleh dievaporasi sampai kering dan kemudian ditentukan beratnya serta diuji aktivitasnya.

b. Fraksinasi. Fraksinasi dilakukan pada ekstrak yang paling aktif. Sebelum ekstrak difraksinasi terlebih dahulu dianalisis dengan KLT dan dideteksi dengan lampu UV dan penyemprotan larutan serium sulfat lalu dipanaskan untuk menentukan eluen yang cocok dalam proses fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan KKV, fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan KLT. Fraksi yang mempunyai nilai Rf yang sama digabung kemudian dievaporasi sampai kering, ditentukan beratnya dan dilakukan uji aktivitas. Fraksi fraksi yang aktif kemudian difraksinasi lebih lanjut menggunakan KKT dan KKG yang dilakukan berulang kali sampai diperoleh isolat murni dan selanjutnya diuji bioaktivitasnya.

B. Uji Bioaktivitas

Uji bioaktivitas yang dilakukan adalah *Brine Shirmp Lethality Test* yang dilakukan terhadap benur udang *A. salina*. Uji ini mempunyai korelasi positif dengan uji-uji sekunder yang lain, seperti sebagai anti tumor sel murni leukemia P-388 maupun anti kanker. Prosedur uji aktivitas sebagai berikut; Satu mg sampel dalam tabung ependorf dilarutkan dengan DMSO sebanyak 100 μL kemudian diencerkan dengan 150 μL aquabides. Dari pengenceran tersebut diambil 200 μL diencerkan kembali dengan 600 μL aquabides sehingga konsentrasi sampel menjadi 1000 μg/mL. Selanjutnya pengenceran dilakukan dalam mikroplate dengan variasi konsentrasi 500, 250, 125, 62,5, 31,2 15,6 dan 7,8 μg/mL untuk tiap lubang pada mikroplate dan dilakukan secara triplo. Benur udang *A. Salina* yang berumur 48 jam dipipet menggunakan pipet 100 μL berisi benur 7-15 ekor lalu dimasukkan pada tiap lubang pada mikroplate yang berisi sampel, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Perlakuan ini juga dilakukan pada kontrol sebagai kontrol negatif. Setelah 24 jam jumlah benur udang yang mati dan yang hidup pada tiap lubang dihitung. Data jumlah rata-rata udang yang mati dan jumlah total udang pada tiap variasi konsentrasi sampel kemudian dimasukkan dalam program komputer

"Bliss method" untuk menentukan nilai LC_{50}. pengeceran tambahan mungkin diperlukan untuk zat yang sangat aktif (Meyer, 1982).

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi

Hasil evaporasi Hasil ekstraksi cair-cair dalam corong pisah berturut-turut dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan etil asetat pada penguapan menggunakan alat *rotary vapor* dengan tekanan rendah diperoleh ekstrak n-heksan, metilen klorida, kloroform, dan etil asetat. Ekstrak kloroform difraksinasi menggunakan KKV dengan silika gel G GF_{254} 100 g dan eluen n-heksan, n-heksan-etil asetat, etil asetat, aseton, dan metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan diperoleh 22. Penggabungan ke 22 fraksi berdasarkan analisis KLT diperoleh sepuluh fraksi utama (A-J). Uji aktivitas dalam lethal konsentrasi (LC_{50}) kesepuluh fraksi gabungan dalam μg/mL terhadap benur udang *A. salina* Leach dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai aktivitas (LC_{50} dalam μg/mL) 10 fraksi utama fraksinasi ekstrak kloroform kulit batang palisa.

No.	Fraksi	Berat (mg)	Aktivitas (LC_{50}) (μg/mL)
1.	A	602,8	19161,66
2.	B	470,3	59,63
3.	C	1134,1	9,72
4.	D	100,3	13,21
5.	E	308,2	24,92
6.	F	308,1	66,69
7.	G	1300,6	163,58
8.	H	372,3	96,49
9.	I	382,6	34,44
10.	J	3201,5	1444,32

Fraksi utama keenam (F), difraksinasi lebih lanjut menggunakan KKT dengan eluen etil asetat - n-heksan 20 % diperoleh 32 fraksi dan berdasarkan analisis KLT diperoleh empat fraksi utama (F_1 - F_4). Fraksi G difraksinasi menggunakan KKT dengan eluen etil asetat - n-heksan 30 % diperoleh 26 fraksi. Berdasarkan analisis dengan KLT menghasilkan lima fraksi utama (G_1 - G_5). Selanjutnya analisis dengan KLT menunjukkan bahw fraksi F_3 dan fraksi G_2 mempunya noda dan Rf yang sama sehingga digabung menjadi fraksi Y.

Fraksi (Y) difraksinasi lebih lanjut menggunakan KKT dengan eluen kloroform - etil asetat 0 - 30 % diperoleh 34 fraksi diperoleh empat fraksi utama (Y_1 - Y_4). Pada fraksi utama kesatu (Y_1) setelah dikristalisasi dengan etil asetat - kloroform (1 : 99) diperoleh senyawa (1).

Fraksi utama H terdapat endapan difraksinasi menggunakan KKT dengan eluen etil asetat - n-heksan 40 % diperoleh 46 fraksi. Hasil analisis dengan KLT diperoleh empat fraksi utama (H_1 - H_4). Fraksi utama ketiga (H_3) direkristalisasi dengan etil asetat – n-heksan diperoleh senyawa (2).

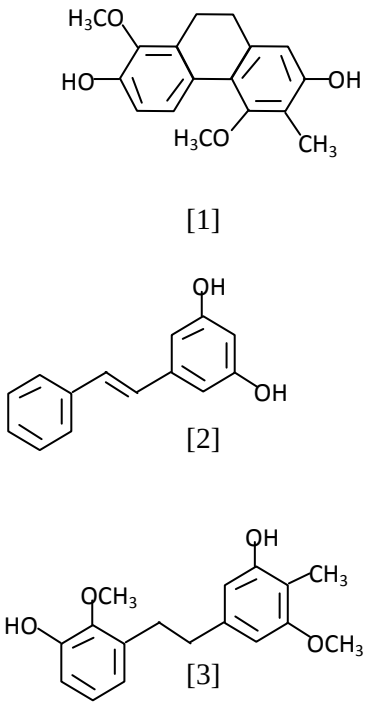
B. Identifikasi dan uji bioaktivitas

Senyawa (1) diperoleh sebagai kristal berbentuk jarum kehijauan dengan titik leleh 182-184 ^oC. Spot pada KLT berpendar putih di bawah sinar UV 254 nm menunjukkan bahwa senyawa ini mempunyai kromofor atau ikatan rangkap terkonjugasi yang mengindikasikan suatu senyawa fenol. Hasil uji bioaktivitas terhadap *A. salina leach* diperoleh LC_{50} 143,59 μg/mL. hasil ini menunjukkan bahwa senyawa yang diisolasi ini bersifat cukup aktif.

Senyawa (2) diperoleh sebagai kristal putih berbentuk jarum dengan titik leleh 100-102 ^oC. Senyawa ini adalah golongan alkaloid, hal ini didukung dengan uji kualitatif yang dilakukan menggunakan pereaksi Dragendroff menghasilkan warna kemerahan yang mengindikasikan sebagai senyawa

alkaloid. Hasil uji aktivitas terhadap *A. salina Leach* toksisitas diperoleh LC_{50} masing 175,02, μg/mL.

Karakterisasi awal senyawa (1) menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh adalah senyawa golongan turunan fenol dan fenol banyak ditemukan dan diisolasi dari tumbuhan yang bersifat bioaktif seperti; Stemanthren A [1], Pinosilivin [2], dan Stilbostemin G [3] Gambar 1. Ketiga senyawa ini aktif sebagai antifungal dan anti jamur (Khatarina dkk., 2003).



Gambar 1. Stemanthren A, Pinosilivin, dan Stilbostemin G

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dikemukakan bahwa ekstrak atau fraksi yang bersifat aktif setelah difraksinasi lebih lanjut akan menghasilkan fraksi atau senyawa murni yang juga bersifat aktif seperti pada fraksi (Y). Tetapi tidak menutup kemungkinan pada ekstrak atau fraksi yang tergolong aktif ditemukan atau terdapat senyawa yang tidak aktif khususnya terhadap benur udang *A. salina.* Kemudian data-data di atas yang menunjukkan toksisitas yang tinggi terhadap benur udang *A. salina* baik pada fraksi, ekstrak maupun senyawa yang diperoleh, menunjukkan korelasi nyata bahwa tumbuhan paliasa merupakan tumbuhan obat yang telah digunakan secara tradisional mengandung senyawa-senyawa bersifat bioaktif.

KESIMPULAN

Pada penelitian terhadap tumbuhan paliasa telah ditemukan isolat murni yang bersifat bioaktif. Dua isolat yang ditemukan berdasarkan metode penelusuran senyawa bioaktif pada tumbuhan. Kedua senyawa ini diperoleh dari ekstrak kloroform kulit kayu yaitu; (1) senyawa fenol dan (2) senyawa golongan alkaloid. Hasil uji aktivitas terhadap benur udang *A. salina* memperlihatkan keduanya aktif dengan toksisitas LC_{50} masing-masing 175,02, dan 143,59 μg/mL. Ditemukannya 2 senyawa metabolit sekunder, dan ekstrak yang cukup toksik pada kulit batang paliasa, diharapkan dapat dieksplorasi lebih jauh kandungan kimia tumbuhan paliasa menggunakan pelarut yang lain. Elusidasi struktur dengan pengukuran spektroskopi diperlukan untuk mengetahui struktur molekul isolat atau senyawa murni yang ditemukan.

DAFTAR PUSTAKA

Hasni, 2002. *Pengaruh Infus Daun Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.*) Terhadap Traspor Aktif Glukosa pada Usush Halus Marmut.* Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

Herlina. 1993. *Pengaruh Infus Daun Kayu Paliasa Klenhovia hospita*

Linn. Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Kelinci. Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Hasanddin.

Kartharina K., Doris E., Thomas P., Otmar H., Srunya V., Harald G., 2003. Dihydrophenantrennes and Other Antifungal Stilbenoids from Stemona cf. Pierrei. *J. Phytochemistry* **65**: 99-106.

Latiff, A., Faridah, H.I., L.J.G Van den Maese, 1997. "*Kleinhovia Hospita* Linn". *Plant Reseorces of South-east Asia* No.II.

Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnan, L.B. Jacobsen, D.E. Nicholas, J.L. McLaughlin 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Department of Medical Chemistry and Pharmacognocy, School of Pharmacy and pharmacal science, and Cell Culture Libratory, Purdue Cancer Center. West lavayette*. USA.

Noor, A. dan Kumanireng A.S., 2004. *Isolasi dan Identifikasi Konstituen Organik Tanaman Daun Paliasa, Kleinhovia hospita Linn. pada Kelarutan Berdasarkan Kelompok Polaritasnya*; Suatu Laporan Reserch. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin. Makassar.

Raflizar, 2000. *Dekok Daun Paliasa (Kleinhovia hospita Linn) Sebagai Obat Radang Hati Akut*. Badan Litbang Kesehatan Jakarta. (Online). (http://digilib.litbang.depkes.go.id/go.php?id=jkpkbppk-gdl-res-2001-raflizar-272-paliasa, diakses 21 Agustus 2004).

Suryawati, 1991. *Pengaruh Pemberian Ekstrak daun Paliasa Klenhovia hospita Linn. Terhadap Hati Hewan Uji Mencit*. Skripsi tidak diterbitkan, Ujung Pandang: Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.

Taebe, B., 2004. *Standarisasi Ekstrak Daun Paliasa (Kleinhovia hospita Liin.) Sebagai Bahan Baku Sedian Fitofarmaka.* Makalah disajikan dalam seminar hasil penelitian pada Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Makassar 23 Pebruari 2004.

Wiwi, 2005. *Eksplorasi Senyawa Kimia Daun Paliasa (Kleinhovia hospita* Linn.*) Pada Fraksi Aktif Metilenklorida.* Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Kimia, Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin.