ISOLASI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT AKAR TUMBUHAN *Kleinhovia hospita* Linn. (PALIASA) DAN UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES FROM ETHYL ACETATE EXTRACT OF THE ROOT BARK OF Kleinhovia hospita Linn. *PLANT (PALIASA) AND TOXICITY ASSAY AGAINST Artemia salina* Leach.

ASRIANI ILYAS

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT AKAR TUMBUHAN *Kleinhovia hospita* Linn. (PALIASA) DAN UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach.

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

PROGRAM STUDI

KIMIA

Disusun dan diajukan oleh

ASRIANI ILYAS

kepada

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008

TESIS

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER DARI
EKSTRAK ETIL ASETAT KULIT AKAR TUMBUHAN
Kleinhovia hospita Linn. (PALIASA)
DAN UJI TOKSISITAS TERHADAP *Artemia salina* Leach.

Disusun dan diajukan oleh

ASRIANI ILYAS
Nomor Pokok P1100206004

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 02 September 2008
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasihat,

Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS. Ketua	Dr. Firdaus, MS. Anggota
Ketua Program Studi Kimia,	Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin,
Dr. Paulina Taba, M.Phill.	Prof. Dr. dr. A. Razak Thaha, M.Sc.

PRAKATA

Assalamu 'Alaikum Wr. Wb.

Alhamdulillah Rabbil Alamin. Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan limpahan karunia-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini. Adapun judul dari tesis ini adalah "Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Akar Tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. (Paliasa) dan Uji Toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach. ". Tesis dalam bidang Kimia Organik Bahan Alam ini tersusun atas dasar kesesuaian minat dan bakat penulis yang didukung oleh pengamatan penulis terhadap permasalahan di masyarakat, diantaranya adalah semakin meningkatnya pemakaian obat tradisional. Pengembangan obat tradisional sebagai sediaan fitofarmaka memerlukan pengetahuan tentang bahan aktif suatu tumbuhan obat melalui proses isolasi dan uji bioaktivitas.

Penulis mengalami banyak kendala selama penelitian dan penyusunan tesis ini namun dapat penulis lalui berkat bantuan berbagai pihak. Berkenaan dengan itu, penulis dengan tulus menyampaikan terima kasih dan penghargaan kepada Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani S., MS dan Bapak Dr. Firdaus, MS sebagai komisi penasehat dan Bapak Prof. Dr. H. Abd. Rauf Patong, Ibu Dr. Hj. Nursiah La Nafie, M.Sc., dan Bapak Dr. Muhammad Zakir, S.Si., M.Si. sebagai tim penguji.

Ucapan terima kasih tidak lupa penulis haturkan kepada:

1. Direktur dan Asisten Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf.
2. Ketua dan seluruh staf dosen Program Studi Kimia Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
3. Ketua dan staf Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Hasanuddin, Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Institut Teknologi Bandung, dan Pusat Penelitian Kimia LIPI.
4. Rekan-rekan mahasiswa S2 Kimia Universitas Hasanuddin angkatan 2006 dan kelompok peneliti Kimia Organik Bahan Alam Universitas Hasanuddin periode 2008.
5. Teristimewa kepada kedua orang tua dan saudariku tercinta yang selalu memberikan semangat dan doa.
6. Seluruh pihak yang telah membantu penulis namun tidak sempat penulis sebut.

Tesis ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhir kata, mudah-mudahan tesis ini mempunyai manfaat dalam proses pembelajaran khususnya bagi mahasiswa sebagai generasi masa depan. ***Wassalam***.

Penulis

2008

ABSTRAK

ASRIANI ILYAS. *Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Akar Tumbuhan Kleinhovia hospita* Linn. *(Paliasa) dan Uji Toksisitas terhadap Artemia salina* Leach. (dibimbing oleh Nunuk Hariani S. dan Firdaus).

Isolasi dan identifikasi metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat kulit akar tumbuhan *Kleinhovia hospita* Linn. telah dilakukan. Uji toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) menggunakan *Artemia salina* Leach. Teknik pemisahan yang digunakan terdiri atas ekstraksi, fraksinasi, dan pemurnian. Senyawa yang diperoleh diuji golongan senyawa dan dielusidasi strukturnya berdasarkan data spektroskopi UV, IR dan NMR. Empat senyawa yang diperoleh adalah senyawa fenolik **[I]**, geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II]**, senyawa steroid **[III]**, dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]**. Senyawa **[I]** dan **[IV]** bersifat toksik dengan LC_{50} 195,24 dan 180,53 μg/ml.

Kata kunci; *Artemia salina* Leach, geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol, *4*-hidroksi sinamida, fenolik, *Kleinhovia hospita* Linn., steroid.

ABSTRACT

ASRIANI ILYAS*. Isolation and Identification of Secondary Metabolites from Ethyl Acetate Extract of the Root Bark of Kleinhovia hospita* Linn. *Plant (Paliasa) and Toxicity Assay against Artemia salina* Leach. (supervised by Nunuk Hariani S. dan Firdaus).

Isolation and identification of secondary metabolites from *ethyl acetate extract of the root bark of Kleinhovia hospita* Linn. *plant* had been performed. Toxicity assay was conducted by *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) method using *Artemia salina* Leach. Separation techniques used consisted of extraction, fractionation, and purification. The classes of compounds obtained were tested and their structures were elucidated based on UV, IR, and NMR spectroscopy data. Four compounds obtained were fenolic **[I]**, geranyl-*1",3"*-dioxo-*para*-chresol **[II]**, steroid **[III]**, and *4*-hydroxy sinamide **[IV]**. Compounds **[I]** and **[IV]** had toxicity with LC_{50} 195,24 and 180,53 µg/ml.

Key word; *Artemia salina* Leach, geranyl-*1",3"*-dioxo-*para*-chresol, *4*-hydroxy sinamide, fenolic, *Kleinhovia hospita* Linn., steroid.

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xiii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Penyelidikan Etnobotani *K. hospita*	7
B. Potensi Kimia *K. hospita*	10
1. Pendekatan kemotaksonomi	10
2. Pendekatan filogenetik	18
III. METODE PENELITIAN	20
A. Alat dan Bahan	20

1. Alat 20

2. Bahan 20

B. Objek Penelitian 21

C. Tempat dan Waktu Penelitian 21

D. Pelaksanaan Penelitian 21

1. Pengumpulan tumbuhan 21

2. Ekstraksi 22

3. Fraksinasi 22

4. Identifikasi 22

5. Uji toksisitas 23

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 24

A. Hasil Penelitian 24

1. Ekstraksi 24

2. Fraksinasi 24

3. Identifikasi 29

4. Uji toksisitas 31

B. Pembahasan 32

1. Isolasi dan identifikasi metabolit sekunder 32

2. Uji toksisitas 43

V. KESIMPULAN DAN SARAN 45

A. Kesimpulan 45

B. Saran 45

DAFTAR PUSTAKA 46

LAMPIRAN 51

DAFTAR TABEL

nomor		halaman
1.	Spesies Sterculiaceae dan aktivitas biologisnya	9
2.	Senyawa pada tumbuhan Sterculiaceae dan bioaktivitasnya	18
3.	Nilai toksisitas fraksi-fraksi dari ekstrak EtOAc	31
4.	Data spektroskopi ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[II]**	37
5.	Data spektroskopi ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[IV]**	42

DAFTAR GAMBAR

nomor		halaman
1.	Senyawa golongan terpenoid dari famili Sterculiaceae	11
2.	Senyawa golongan steroid dari famili Sterculiaceae	12
3.	Senyawa fenol dan asam fenolat	12
4.	Senyawa golongan fenilpropanoid	13
5.	Senyawa flavonoid dari tumbuhan Sterculiaceae	15
6.	Senyawa alkaloid dari spesies Sterculiaceae	17
7.	Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama A - J	25
8.	Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama E_1 – E_{10}	25
9.	Kromatogram hasil analisis KLT fraksi E_4	26
10.	Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama F_1 – F_{11}	26
11.	Kromatogram KLT fraksi F_8	27
12.	Kromatogram hasil analisis KLT Kristal F_8	27
13.	Kromatogram hasil analisis KLT fraksi X	28
14.	Spektrum UV dan IR senyawa **[II]**	33
15.	Spektrum ^{1}H-NMR senyawa **[II]**	34
16.	Spektrum ^{13}C-NMR senyawa **[II]**	36
17.	Struktur senyawa **[II]** (geranil-*1”,3”*-diokso-*para*-kresol)	37
18.	Spektrum UV dan IR senyawa **[IV]**	39
19.	Spektrum ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[IV]**	41
20.	Struktur senyawa **[IV]** (*4*-hidroksi sinamida)	43

DAFTAR LAMPIRAN

nomor		halaman
1.	Ekstraksi dan Isolasi	51
2.	Kromatogram KLT hasil fraksinasi ekstrak etil asetat	52
3.	Bagan isolasi senyawa dari fraksi B	53
4.	Bagan isolasi senyawa dari fraksi E	54
5.	Bagan isolasi senyawa dari fraksi F	55
6.	Bagan isolasi senyawa dari fraksi gabungan F_6-F_7	56
7.	Kromatogram KLT hasil fraksinasi fraksi E, F, dan X	57
8.	Prosedur identifikasi golongan senyawa	58
9.	Prosedur *Brine Shrimp Lethality Test*	59
10.	Spektrum DEPT senyawa **[II]**	61
11.	Spektrum HMQC senyawa **[II]**	62
12.	Spektrum COSY senyawa **[II]**	63
13.	Spektrum HMBC senyawa **[II]**	64
14.	Spektrum DEPT senyawa **[IV]**	65
15.	Spektrum HMQC senyawa **[IV]**	66
16.	Spektrum COSY senyawa **[IV]**	67
17.	Spektrum HMBC senyawa **[IV]**	68

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

µL	=	mikroliter
g/mL	=	gram per liter
µg/mL	=	mikrogram per milliliter
µM	=	mikromolar
CCl_4	=	karbontetraklorida
$CHCl_3$	=	kloroform
n-heksan	=	normal heksana
EtOAc	=	etil asetat
MeOH	=	metanol
NaCl	=	natrium klorida
DMSO	=	dimetil sulfooksida
H_2SO_4	=	asam sulfat
$CeSO_4$	=	serium sulfat
p.a.	=	pure analyse
KLT	=	kromatografi lapis tipis
KKG	=	kromatografi kolom gravitasi
KKT	=	kromatografi kolom tekan
KKV	=	kromatografi kolom vakum
Rf	=	ratio of force
LC_{50}	=	Lethality Concentration 50
MIC	=	minimum inhibition concentrate

IC_{50}	=	inhibition concentration 50
BST	=	brine shrimp lethality test
UV	=	ultraviolet
λ_{maks}	=	panjang gelombang
bh	=	bahu
IR	=	infrared
υ_{maks}	=	bilangan gelombang
NMR	=	nuclear magnetic resonance
δ	=	geseran kimia
ppm	=	part per million
J	=	konstanta kopling
Hz	=	hertz
m	=	multiplet
t	=	triplet
d	=	doublet
dd	=	doublet-doublet
s	=	singlet
brs	=	broadsinglet
DEPT	=	distortionless enchancement due to polarization transfer
HMQC	=	heteronuclear magnetic quantum correlation
HMBC	=	heteronuclear magnetic bond correlation
COSY	=	correlated spectroscopy

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Keanekaragaman hayati merupakan istilah untuk menerangkan keragaman ekosistem dan berbagai bentuk tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Saat ini terdapat sedikitnya 250.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi, jutaan spesies jamur dan serangga yang bersama-sama dalam berbagai ekosistem dan saling berinteraksi. Semua organisme ini menghasilkan beranekaragam senyawa kimia yang berguna dalam interaksi tersebut. Penelitian yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa organisme memproduksi dua jenis senyawa, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Senyawa metabolit primer adalah produk esensial yang terdapat pada semua makhluk hidup; yaitu protein, polisakarida, lemak dan asam nukleat, sedangkan senyawa metabolit sekunder adalah produk khas yang ditemukan pada organisme tertentu saja, biasanya digunakan dalam sistem pertahanan diri dan interaksi simbiosis. Sekarang ini tercatat lebih dari 100.000 metabolit sekunder yang berasal dari sejumlah spesies organisme yang telah dipelajari (Achmad, 2007).

Metabolit sekunder merupakan senyawa organik yang dapat mempengaruhi aktivitas fisiologis organ, jaringan, atau sel tertentu sehingga dijadikan bahan dasar obat. Lebih dari 30% bahan obat yang beredar di perdagangan adalah berasal dari bahan alam (Atun, 2005).

Pengobatan dipandang sebagai suatu proses interaksi molekular antara obat dengan molekul biologis dari sumber penyakit. Interaksi tersebut bersifat dinamis sesuai dengan kondisi dan situasi sehingga resistensi obat terhadap penyakit dapat terjadi. Hal ini adalah suatu tantangan dan sekaligus peluang bagi para peneliti kimia bahan alam pada masa-masa yang akan datang.

Penelitian kimiawi tumbuhan sebagai sumber metabolit sekunder baru adalah salah satu alternatif yang dapat menjawab dan memecahkan permasalahan kesehatan tersebut (Ersam, 2004). Penelitian ini didasarkan pada penyelidikan etnobotani yang didukung dengan sifat farmakologi dan potensi kimia tumbuhan.

Hasil survei etnobotani yang dilakukan memperlihatkan bahwa salah satu tumbuhan yang potensial adalah tumbuhan tropika Indonesia yang dikenal dengan nama kayu katimahar. Tumbuhan tersebut banyak ditemukan di daerah Sulawesi Selatan dengan nama daerah *paliasa* (Makassar) atau *aju pali* (Bugis) (Heyne, 1987), dan nama latinnya ***Kleinhovia hospita*** **Linn.** (famili Sterculiaceae). Daun *K. hospita* digunakan untuk pengobatan penyakit hati, penyakit kuning, dan hepatitis yang didukung dengan sifat farmakologis sebagai anti radang hati (Raflizar *et al.*, 2006). Potensi kimia *K. hospita* terlihat dari metabolit sekunder yang telah diisolasi, diantaranya adalah kaemferol **(23)** dan quercetin **(24)** yang diperoleh dari daun (Latiff, 1997) dengan aktivitas anti inflamasi dan anti viral (Lyu *et al.*, 2005), scopoletin **(12)**, dan beberapa

senyawa dari kulit batang yang belum diketahui strukturnya namun bersifat toksik terhadap udang *Artemia salina* Leach (korelasi positif sebagai anti kanker) (Anderson *et al*., 1990), yaitu turunan stilben dengan LC_{50} 198,67 µg/mL, turunan asam karboksilat dengan LC_{50} 128,99 µg/mL (Dini, 2005); dua senyawa fenilpropanoid bentuk ester dengan LC_{50} 86,62 dan 29,14 µg/mL, triterpenoid asam karboksilat dengan LC_{50} 42,97 µg/mL, dan golongan alkaloid dengan LC_{50} 5,07 µg/mL (Ulfa, 2006).

Jaringan daun dan kulit batang tumbuhan *K. hospita* berpotensi sebagai sumber molekul bioaktif. Berdasarkan skrining bioaktivitas jaringan tumbuhan ini melalui uji toksisitas terhadap udang *A. salina* memperlihatkan tingkat letalitas (LC_{50}) berturut-turut adalah 65,61 µg/mL untuk kayu batang; 97,36 µg/mL untuk kayu akar; 162,80 µg/mL untuk kulit batang; 193,77 µg/mL untuk kulit akar; dan 230,19 µg/mL untuk daun (Gaffar *et al.,* 2007). Kayu batang dan kayu akar termasuk kategori toksisitas tinggi (<100 µg/mL); sedangkan kulit batang, kulit akar, dan daun termasuk kategori toksisitas rendah (>100 µg/mL). Sebagaimana diketahui bahwa jaringan dengan toksisitas tinggi terhadap *A. salina* seperti kayu batang dan kayu akar merupakan sumber utama senyawa-senyawa anti kanker. Meskipun demikian, senyawa-senyawa tersebut dapat pula diisolasi dari jaringan dengan toksisitas rendah seperti pada kulit batang dan daun *K. hospita*.

Sebagian besar senyawa bioaktif yang telah diisolasi dari *K. hospita* termasuk dalam golongan senyawa fenol seperti flavonoid, stilben, dan

fenilpropanoid (Latiff, 1997; Dini, 2005; Ulfa, 2006). Penelitian tentang kandungan fenol dalam tumbuhan menunjukkan bahwa senyawa fenol terdistribusi berdasarkan jenis pelarut yang digunakan, dan jumlah fenol tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat (Pambayun *et al.,* 2007). Penelitian ini didukung oleh penemuan senyawa-senyawa bioaktif golongan fenol yang diisolasi dari ekstrak EtOAc, misalnya morusin dan artonin E dari kulit batang, serta sikloartobilosanton dari kulit akar *Artocarpus altilis* (Moraceae) yang bersifat toksik terhadap *A. salina* dengan LC_{50} berturut-turut: 55,0; 5,6 dan 33,7 μg/mL (Ersam *et al.*, 2000); dan satu senyawa fenilpropanoid turunan kumarin pada batang *Garcinia balica* Miq. yang memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antioksidan (Mudjirahmini dan Ersam, 2006).

Berdasarkan uraian di atas maka dalam penelitian ini eksplorasi metabolit sekunder pada kulit akar tumbuhan *K. hospita* dilakukan dengan menggunakan pelarut EtOAc. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang berharga terhadap pemberdayaan keanekaragaman hayati Indonesia, terutama yang berpotensi sebagai tumbuhan obat .

B. Rumusan Masalah

Tumbuhan *K. hospita* diduga mengandung senyawa-senyawa yang toksik terhadap udang *A. salina* (korelasi positif sebagai anti kanker), dan dapat diisolasi dari ekstrak etil asetat kulit akarnya. Hal yang menjadi permasalahan adalah:

1. Senyawa metabolit sekunder apa yang ada pada ekstrak etil asetat kulit akar *K. hospita* dan termasuk golongan senyawa apa?
2. Bagaimana tingkat toksisitasnya terhadap *A. salina*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi metabolit sekunder dalam ekstrak EtOAc kulit akar *K. hospita* dan menentukan struktur senyawa murninya, serta menguji toksisitasnya terhadap udang *A. salina*.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat;

1. Memberikan data ilmiah tentang metabolit sekunder dalam ekstrak EtOAc kulit akar tumbuhan *K. hospita* dan toksisitasnya terhadap udang *A. salina*.
2. Memberikan kontribusi yang berharga bagi ilmu pengetahuan khususnya bagi ilmu kimia organik bahan alam.
3. Menjadi rujukan dalam pengembangan tumbuhan obat ke arah fitofarmaka.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Penelitian bahan alam berupa tumbuhan dilakukan melalui suatu evaluasi kimiawi yang diawali dengan satu tahapan penting, yaitu seleksi (pemilihan) tumbuhan. Bahan alam yang dipilih menjadi objek penelitian ini adalah *K. hospita.* Adapun klasifikasi spesiesnya adalah:

Kingdom	: Plantae
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Klass	: Magnoliopsida/ Dikotyledon
SubKlass	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: *Kleinhovia*
Spesies	: *Kleinhovia hospita* Linn.

(United States Departement of Agriculture - *Natural Resources Conservation Service* [USDA-NRCS], 2000).

Berdasarkan data ASEAN Regional Centre for Biodiversity (ARCBC) dalam "*Checklist of Medicinal Plants in South east Asia*", spesies *K. hospita* hanya terdistribusi di daerah Indonesia. Nama indonesia dari spesies ini adalah kayu katimahar, namun oleh masyarakat dikenal dengan nama yang berbeda-beda, tergantung pada daerah

tumbuhnya; seperti kinar [Ambon], mangar [Lampung], tangkolo [Sunda], katimaha [Jawa], katimahan [Bali], bintangar [Sulawesi utara], kayu paliasa [Makassar], aju pali [Bugis], ngaru [Ternate], dan binak [Timor] (Heyne, 1987). Ciri morfologisnya adalah tinggi mencapai 20 m dan besar batang 70 – 90 cm, bagian luar tampak keabu-abuan dan bagian dalam nampak kekuningan, serta bentuk dasar daun adalah berbentuk hati (Latiff, 1997).

Tumbuhan *K. hospita* memiliki daya tarik untuk diteliti. Hal ini didasarkan pada penyelidikan etnobotani yang didukung dengan data bioaktivitas ekstrak tumbuhan (etnofarmakologi), dan potensi kimia dalam pendekatan kemotaksonomi dan filogenetik terhadap spesies tumbuhan yang satu famili dengan *K. hospita* (famili Sterculiaceae).

A. Penyelidikan Etnobotani *K. hospita*

Penyelidikan etnobotani didasarkan pada pengetahuan dan kebiasaan masyarakat tradisional dalam memanfaatkan tumbuhan untuk mengobati penyakit tertentu. Tumbuhan Sterculiaceae telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Misalnya, kayu batang *Herrania cuatrecasana* digunakan untuk penawar gigitan ular, dan kulit batangnya untuk mengobati iritasi tenggorokan dan batuk kering (Wiedemann *et al.*,1999). Daun *Sterculia africana* digunakan sebagai obat kejang-kejang (Hamza *et al.*, 2006); akar *Helicteres isora* digunakan untuk mengobati radang ginjal kronik, dan buahnya sebagai jamu untuk

membasmi cacing pita (Kamiya *et al.*, 2001). Daun *Pterospermum acerifolium* yang telah dilayukan di atas api dapat menghilangkan gatal pada kaki akibat terbenam di dalam lumpur. Seduhan dingin kayu *Sterculia foetida* digunakan sebagai obat penggugur (oabortivum), daunnya yang dilumat ditempelkan pada bagian tubuh yang terkilir atau luka dalam karena benturan, dan kulit buahnya yang dibakar menjadi abu dicampur air lalu diminum guna mengobati penyakit kencing nanah (Heyne, 1987).

Spesies *K. hospita* khususnya telah dimanfaatkan di Indonesia dan negara tetangga seperti Malaysia sebagai obat tradisional untuk menghilangkan kudis. Daunnya digunakan untuk pengobatan penyakit hati, penyakit kuning, dan hepatitis, dengan cara meminum air rebusannya (Raflizar *et al.*, 2006). Jus daunnya membuat mata menjadi bersih, dan khusus daun yang masih muda dimakan sebagai sayur. Bahkan di Papua New Guinea dan Kepulauan Solomon, kambium pohonnya digunakan untuk mengobati pneumonia (Latiff, 1997). Namun perlu diperhatikan bahwa biji-bijinya diduga sangat beracun (Heyne, 1987).

Penelusuran etnobotani tumbuhan *K. hospita* ini didukung oleh penelitian kimiawi pada spesies Sterculiaceae yang membuktikan adanya aktivitas biologis (etnofarmakologi) dari beberapa ekstrak tumbuhan. Beberapa spesies yang diketahui aktivitas biologisnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Spesies Sterculiaceae dan aktivitas biologisnya

Spesies [Lokasi sampling]	Aktivitas Biologis
Cola greenwayi **[Kwazulu-Natal (Afrika Selatan)]**	Daun dan ranting (ekstrak CH_2Cl_2 dan etanol) → Anti inflamasi {Reid *et al.*, 2005}
Cola nitida **dan** ***Cola milleni*** **[Nigeria]**	Kulit akar (ekstrak MeOH) → Anti mycobakterial [terhadap *Mycobacterium Bovis* dan *M. vaccae*] {Adeniyi *et al.*, 2004}
Dombeya burgessiae **[Kwazulu-Natal (Afrika Selatan)]**	Daun dan ranting (ekstrak CH_2Cl_2 dan etanol) → Anti inflamasi {Reid *et al*., 2005}
Guazuma ulmifolia **Lam. [Pichincha (Ekuador)]**	Daun dan bunga (ekstrak etanol) → Anti inflamasi [pada tikus *Wistar* jantan dan betina] {Berenguer *et al.*, 2007}
Helicteres gardneriana **[Gresso de Sul & Sao Paulo (Brazil)]**	Ujung ranting (ekstrak etanol) → Anti parasit [terhadap *Leishmania braziliensis* (parasit yang menimbulkan noda pada kulit, selaput lendir)] {Truiti *et al.*, 2005}
Helicteres isora **[Tamil Nadu & Andhra Pradesh (India), Jawa (Indonesia)]**	Batang (ekstrak H_2O) → Anti diabetes [penurunan kadar glukosa darah pada tikus *Wistar albino* jantan] {Kumar *et al.*, 2006}; Akar (ekstrak etanol) → Anti diabetes & efek hypolipidemik [pengurangan kadar glukosa plasma, trigliserida & insulin pada tikus C57BL/KsJdb/db] {Chakrabarti *et al.*, 2002}
Hermannia depressa **[Kwazulu-Natal (Afrika Selatan)]**	Batang dan akar (ekstrak CH_2Cl_2) → Anti inflamasi ; Akar (ekstrak etanol) → Anti bakteri [terhadap *Bacillus subtilis*] {Reid *et al.*, 2005}
Kleinhovia hospita **Linn. [Sulawesi Selatan (Indonesia)]**	Daun (ekstrak alkohol) → Anti radang hati [pada tikus betina *Strain* Wistar akibat CCl_4] {Raflizar *et al.*, 2006}; Infus daun → Anti hipertensi [pada kelinci] {Herlina, 1993}, Anti diabetes [penghambatan terhadap transport aktif glukosa pada usus halus marmut] {Hasni, 2002}; Kambium batang → Anti tumor [dalam sarkoma mencit] {Latiff, 1997}.
Melochia arenosa **Benth. [Gresso de Sul & Sao Paulo (Brazil)]**	Ujung ranting (ekstrak etanol) → Anti parasit [terhadap *Trypanosoma cruzi* (menyebabkan sindrom gila)] {Truiti *et al.*, 2005}
Sterculia africana **(Lour)Fiori. [Dar es Salaam (Tanzania)]**	Daun (ekstrak MeOH) → Anti fungal [terhadap jamur *Cryptococcus neoformans, Cancida krusei, C.tropicalis, C.parapsilosis* (jenis jamur pada pasien HIV)] {Hamza *et al.*, 2006}

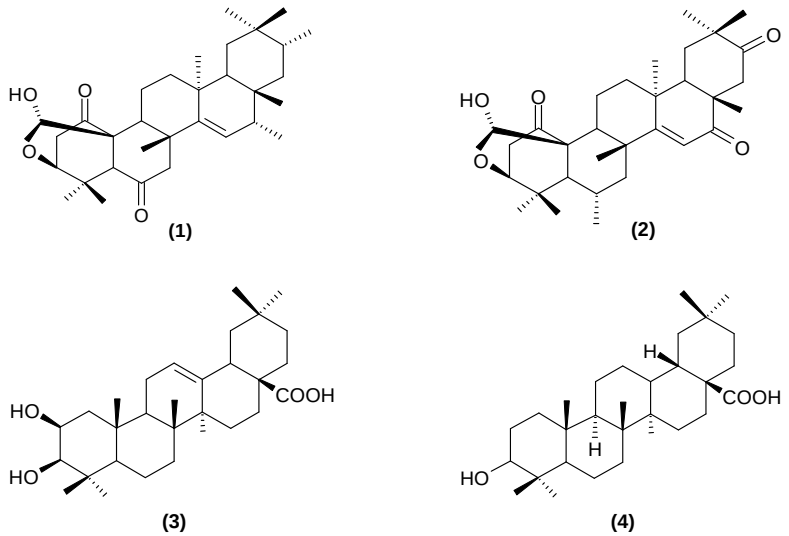
B. Potensi Kimia *K. hospita*

Gambaran potensi kimia tumbuhan *K.hospita* dapat ditinjau dengan pendekatan kemotaksonomi dan filogenetik tumbuhan dalam famili Sterculiaceae.

1. Pendekatan kemotaksonomi

Pendekatan kemotaksonomi didasarkan pada struktur senyawa yang lazim ditemukan pada tumbuhan yang berkerabat dekat dengan tumbuhan yang akan diteliti. Secara kemotaksonomi, spesies-spesies tumbuhan yang terdapat dalam satu famili cenderung mempunyai model molekul yang relatif sama pula. Adapun senyawa-senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi dari beberapa spesies Sterculiaceae dapat dibagi dalam beberapa golongan, yaitu terpenoid, steroid, senyawa fenol, asam fenolat, fenilpropanoid, flavonoid dan alkaloid.

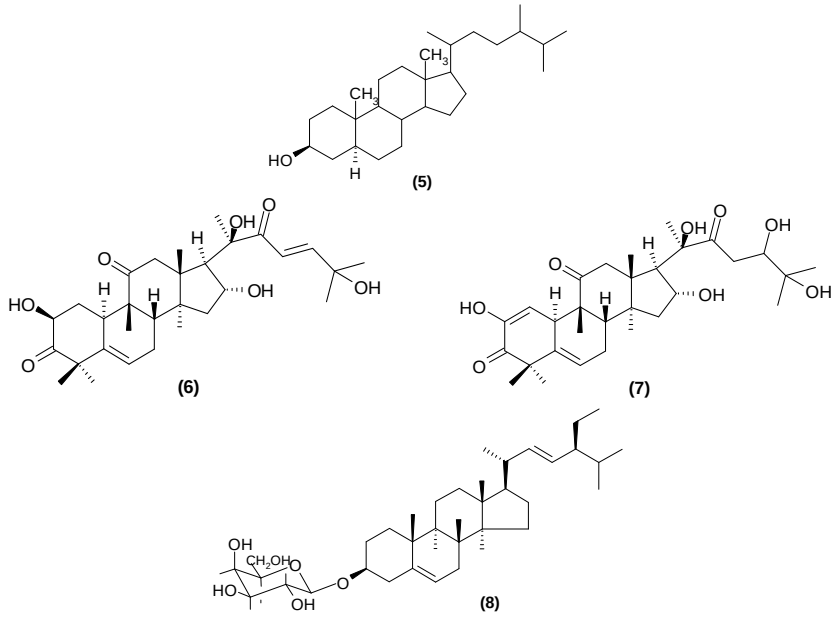
Terpenoid. Terpenoid dibedakan berdasarkan model kerangka dan jumlah unit isoprennya. Beberapa jenis terpen pada famili Sterculiaceae ditemukan dalam bentuk triterpen, diantaranya adalah herranon **(1)** dan herrantrion **(2)** yang diisolasi dari kayu batang *H. cuatrecasana* masing-masing dalam ekstrak *n*-heksan dan EtOAc (Wiedemann *et al.*, 1999); asam augustat **(3)** dari ekstrak EtOAc akar *Abroma augusta* (Alam *et al.*, 1995); serta asam oleanolat **(4)** dari ekstrak metanol kayu batang *Scaphopetalum thonneri* (Vardamides *et al.*, 2003) dan ekstrak kloroform akar *Helicteres angustifolia* (Chen *et al.*, 2006).



Gambar 1. Senyawa golongan terpenoid dari famili Sterculiaceae

Steroid. Senyawa steroid memiliki kerangka dasar yang spesifik yaitu kerangka 1,2-siklopentanoperhidrofenantren. Kerangka ini merupakan ciri khusus yang membedakan steroid dengan senyawa organik bahan alam lainnya.

Senyawa steroid dari famili Sterculiaceae diantaranya adalah β-sitosterol **(5)** yang diisolasi dari ekstrak sikloheksan biji *Sterculia lychnophora* (Wang *et al.*, 2003), ekstrak kloroform akar *H. angustifolia* (Chen *et al.*, 2006), dan pada kulit batang ***K. hospita*** dalam ekstrak *n*-heksan dan kloroform (Dini, 2005; Ulfa, 2006); cucurbitacin D **(6)** dan cucurbitacin J **(7)** dari ekstrak kloroform ujung ranting *H.angustifolia* (Chen *et al.*, 2006); serta glukosida stigmasterol **(8)** dari ekstrak EtOAc akar *A. augusta* (Alam *et al.,* 1995).

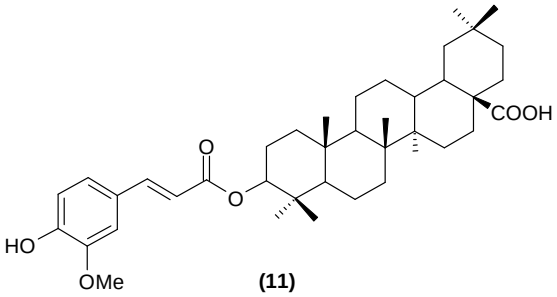


Gambar 2. Senyawa golongan steroid dari famili Sterculiaceae

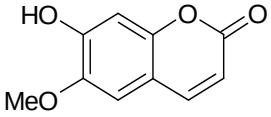
Senyawa fenol dan asam fenolat. Senyawa fenol mempunyai ciri khas cincin aromatik yang mengandung satu atau lebih substituen hidroksil. Namun tidak semua gugus hidroksil tersebut berada dalam keadaan bebas, terkadang dalam keadaan tersubstitusi. Senyawa fenol dan asam fenolat yang terdapat pada tumbuhan Sterculiaceae diantaranya adalah katekol **(9)** yang diisolasi dari biji *Cola nitida* dan *Cola acuminata* (Hutchings *et al*., 1996) dan asam 2,4-dihidroksi benzoat **(10)** yang diisolasi dari ekstrak sikloheksan biji *S. lychnophora* (Wang *et al.*, 2003).

Gambar 3. Senyawa fenol dan asam fenolat

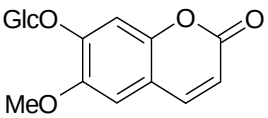
Fenilpropanoid. Fenilpropanoid adalah senyawa fenol yang mempunyai cincin aromatik dengan rantai samping terdiri atas tiga atom karbon. Berdasarkan kerangka dasarnya, kelompok senyawa ini dibedakan menjadi beberapa jenis, yaitu turunan sinamat, alilfenol, lignan dan kumarin. Senyawa fenilpropanoid dalam famili Sterculiaceae diantaranya adalah scaphopetalumat **(11)** [turunan sinamat], scopoletin **(12),** dan scopolin **(13)** [turunan kumarin]. Ketiga senyawa ini diisolasi dari ekstrak metanol kayu batang *S. thonneri* (Vardamides *et al*., 2003). Senyawa **(12)** juga telah ditemukan pada daun ***K. hospita*** (Latiff, 1997). Propacin **(14),** satu senyawa turunan kumarinolignoid, juga telah diisolasi dari ekstrak kloroform akar tumbuhan *Melochia chamaedrys* (Dias *et al.*, 2007).



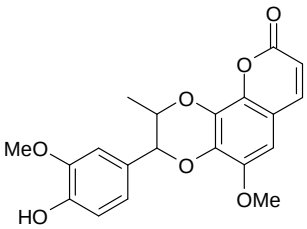
(11)



(12)



(13)



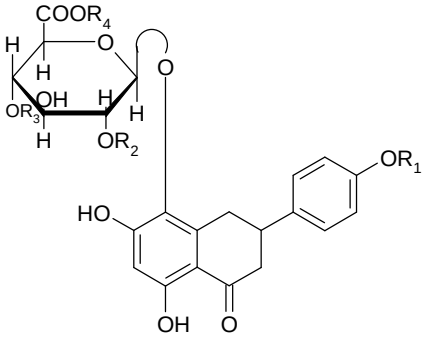
(14)

Gambar 4. Senyawa golongan fenilpropanoid

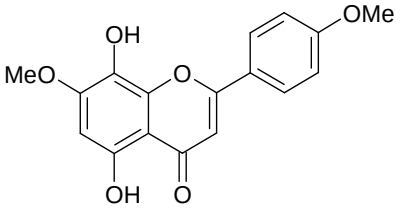
Flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa fenolik alam dengan kerangka dasar yang dibangun dari 15 atom karbon yang terdiri atas dua bagian cincin benzena yang dihubungkan oleh rantai karbon propana (C_6-C_3-C_6).

Senyawa dari Sterculiaceae yang termasuk golongan flavonoid diantaranya: lima jenis flavonoid glukosida yang ditemukan pada buah *H. Isora,* yakni Isoscutellarein 4'-metil eter 8-O-β-D-glukuronida **(15)** dan Isoscutellarein 4'-metil eter 8-O-β-D-glukuronida 6"-n-butil ester **(16)** yang diisolasi dalam ekstrak butanol, serta senyawa Isoscutellarein 4'-metil eter 8-O-β-D-glukuronida 2"-sulfat **(17)**, Isoscutellarein 4'-metil eter 8-O-β-D-glukuronida 2",4"-disulfat **(18),** dan Isoscutellarein 8-O-β-D-glukuronida 2",4"-disulfat **(19)** yang diisolasi dalam ekstrak H_2O (Kamiya *et al*., 2001).

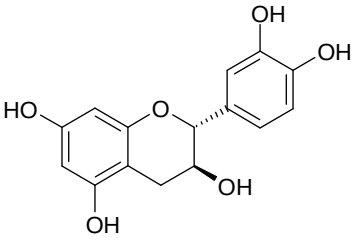
Flavonoid sederhana juga banyak yang telah ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae, misalnya 5,8-dihidroksi-7,4'-dimetoksi flavon **(20)** dari ekstrak *n*-butanol akar *H. Angustifolia* (Chen *et al*., 2006); katecin **(21)** dan (-)-epi-katecin **(22)** dari ekstrak EtOAc biji *Theobroma cacao* (Porter and Chan, 1991) dan akar *M. chamaedrys* (Dias *et al*., 2007); serta kaemferol **(23)** dan quercetin **(24)** dari bunga *G. ulmifolia* (Lyu *et al.*, 2005) dan daun ***K. hospita*** (Latiff, 1997).



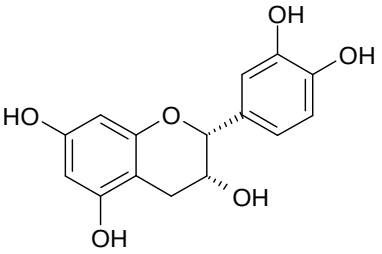
(15) R_1=Me, R_2=R_3=R_4=H
(16) R_1=Me, R_2=R_3=H, R_4=n-Bu
(17) R_1=Me, R_2=SO_3^-, R_3=R_4=H
(18) R_1=Me, R_2=R_3=$SO3^-$, R_4=H
(19) R_1=H, R_2=R_3=SO_3^-, R_4=H



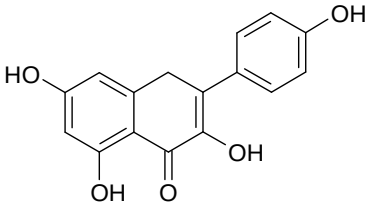
(20)



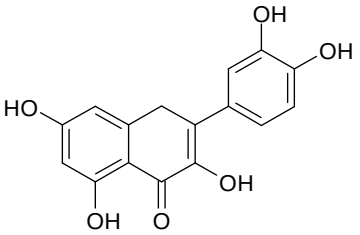
(21)



(22)



(23)



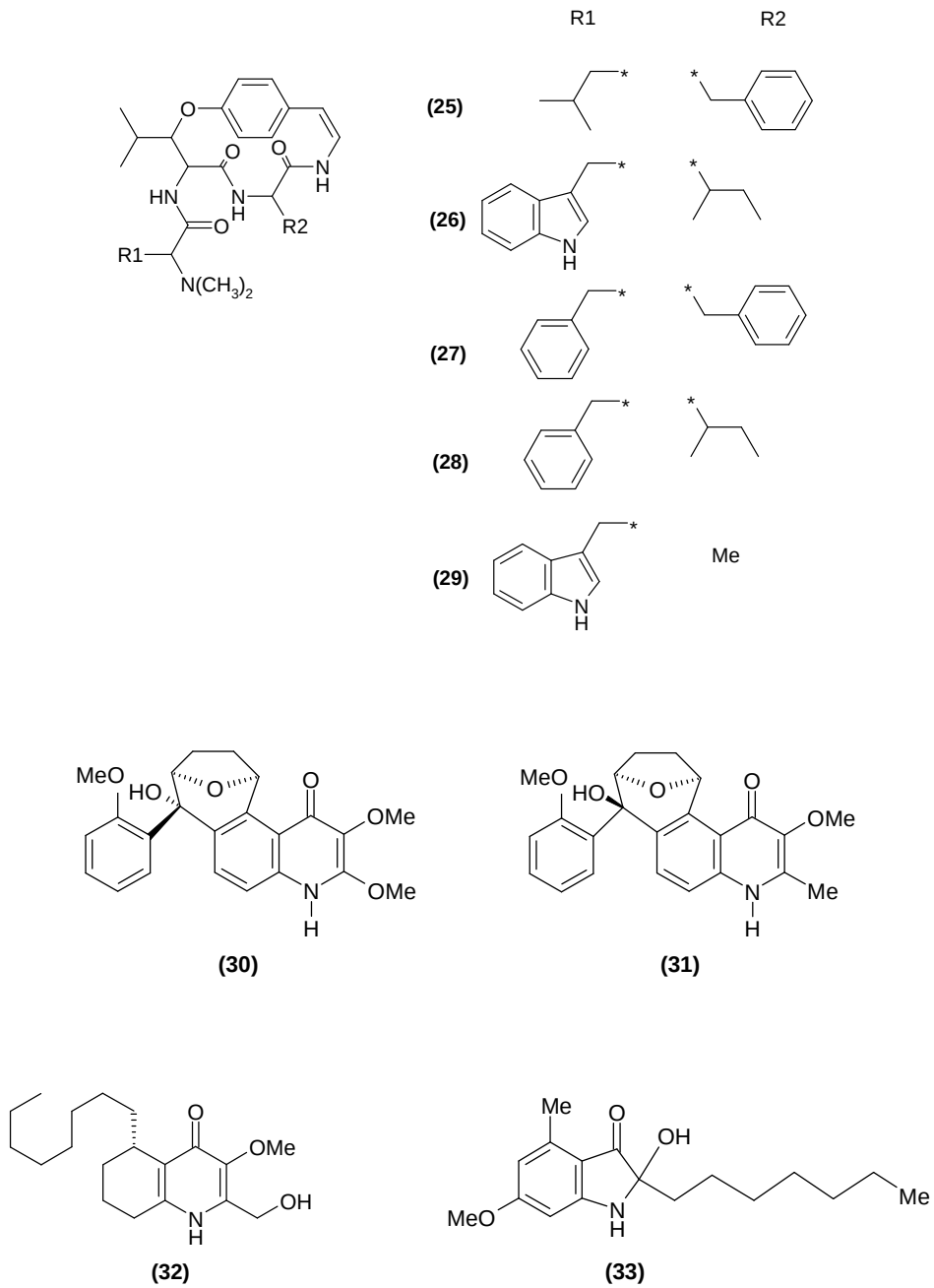
(24)

Gambar 5. Senyawa flavonoid dari tumbuhan Sterculiaceae

Alkaloid. Senyawa alkaloid mengandung sedikitnya satu unsur nitrogen dan umumnya berbentuk heterosiklik. Jika dilihat dari jenis cincin heterosikliknya maka alkaloid dikelompokkan sebagai alkaloid pirol, alkaloid kuinolin, alkaloid indol, alkaloid siklopeptida, alkaloid fenil alanin, dan steroidal alkaloid.

Senyawa alkaloid dari beberapa spesies Sterculiaceae diantaranya adalah lima senyawa jenis alkaloid siklopeptida, yaitu Waltherin A **(25)**, Waltherin B **(26)**, scutianin B **(27)**, adouetin Y' **(28),** dan Waltherin C **(29)** yang diisolasi dari ekstrak metanol batang *Waltheria douradinha* (Morel *et al.*, 1999). Senyawa **(27)** juga berhasil diisolasi dari ekstrak kloroform akar *M. chamaedrys* (Dias *et al*., 2007).

Senyawa jenis alkaloid kuinolin juga telah ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae, yaitu waltherion A **(30)**, waltherion B **(31)** dan vanessin **(32)** yang diisolasi dari ekstrak *n*-heksan kulit batang *W. douradinha* (Gressler *et al.,* 2008). Senyawa **(30)** diperoleh pula dalam ekstrak EtOAc batang *W. douradinha* (Hoelzel *et al*., 2005) dan ekstrak kloroform akar *M. chamaedrys* (Dias *et al*., 2007). Satu senyawa jenis alkaloid indol, melochicorin **(33)** telah diisolasi pula dari ekstrak kloroform ranting tumbuhan *Melochia corchorifolia* (Bhakuni *et al.*, 1991).



Gambar 6. Senyawa alkaloid dari spesies Sterculiaceae

2. Pendekatan filogenetik

Pendekatan filogenetik didasarkan pada hubungan kekerabatan tumbuhan yang diketahui mempunyai jenis-jenis senyawa tertentu yang berguna. Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan Sterculiaceae memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif (bahan dasar obat) yang terbukti melalui uji bioaktivitas (Tabel 2).

Tabel 2. Senyawa pada tumbuhan Sterculiaceae dan bioaktivitasnya

Nama senyawa	Asal tumbuhan	Bioaktivitas
Golongan terpenoid		
Asam 3β-hidroksi-27-benzoiloksilup-20(29)-en-28-oat.	*H. angustifolia*	Sitotoksik [pada sel melanoma malignan (SK-MEL28 cell line), IC_{50} 20.5 μM] (Chen *et al.*, 2006).
Asam helicterat	*H. angustifolia*	Sitotoksik [pada sel melanoma malignan (SK-MEL28 cell line), IC_{50} 81.7 μM] (Chen *et al.*, 2006).
Golongan steroid		
β-sitosterol **(5)**	*G. ulmifolia* *H. angustifolia* *K. hospita* *S. lychnophora*	Anti inflamasi dan immunomodulator (Delporte *et al.,* 2005)
Cucurbitacin D **(6)**	*H. angustifolia*	Sitotoksik [pada sel karsinoma hepatocellular (BEL7402 cell line), IC_{50} 1,41 μM; dan melanoma malignan (SK-MEL28 cell line), IC_{50} 1,22 μM] (Chen *et al.*, 2006).
Cucurbitacin J **(7)**	*H. angustifolia*	Sitotoksik [pada sel karsinoma hepatocellular (BEL7402 cell line), IC_{50} 1,37 μM; dan melanoma malignan (SK-MEL28 cell line), IC_{50} 1,28 μM] (Chen *et al.*, 2006).
Golongan flavonoid		
Kaemferol **(23)** & Quercetin **(24)**	*G. ulmifolia* *K. hospita*	Anti inflamasi dan anti viral (Lyu *et al.*, 2005).
Golongan alkaloid		
Vanessin **(32)**	***W. douradinha***	Anti bakteri [pada *Escherichia coli*; *Salmonella setubal* dan *Klebsiella pneumoniae* (MIC 25,0; 50,0 dan 25,0 μg/ml)] (Gressler *et al.*, 2008).

Pada spesies *K. hospita* khususnya dibagian kulit batang ditemukan pula beberapa senyawa bioaktif yang belum diketahui strukturnya. Senyawa-senyawa tersebut bersifat toksik terhadap *A. salina* (uji BST), diantaranya senyawa fenol turunan stilben dengan LC_{50} 198,67 μg/mL, turunan asam karboksilat dengan LC_{50} 128,99 μg/mL (Dini, 2005); dua senyawa fenilpropanoid bentuk ester dengan LC_{50} 86,62 dan 29,14 μg/mL, triterpenoid asam karboksilat dengan LC_{50} 42,97 μg/mL, dan golongan alkaloid dengan LC_{50} 5,07 μg/mL (Ulfa, 2006).

BST (*Brine shrimp lethality test*) merupakan uji toksisitas yang mempunyai korelasi positif dengan uji-uji bioaktivitas yang lain, misalnya sebagai anti tumor sel leukemia P-388 maupun anti kanker. Berdasarkan hasil penelitian maka secara statistik, BST memiliki korelasi kuat terhadap P-388 *murine leukemia assay*. Ini ditunjukkan dengan adanya hasil uji terhadap kanker paru-paru dan usus besar manusia menggunakan BST yang memperlihatkan suatu korelasi yang sangat kuat dengan P-388 *assay* (Anderson *et al*., 1990). Metode ini juga digunakan untuk menganalisis residu pestisida, mycotoxin, aliran polutan, anestesi, senyawa morfin, kadar racun dari penyebaran minyak, dan kadar keracunan dari lingkungan laut (Meyer *et al.*, 1982).

Gambaran kemotaksonomi dan filogenetik tumbuhan Sterculiaceae menunjukkan suatu potensi yang besar pada *K. hospita* untuk menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang beragam dan memiliki sifat bioaktif.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain alat gelas yang umum di Laboratorium, *rotary evaporator*, timbangan digital, corong pisah, alat fraksinasi (KKV, KKT, KKG), alat uji BST (wadah penetasan, mikropipet, mikroplat, tabung Ependorf), peralatan KLT, penyaring kristal, pengukur titik leleh (*Electrothermal Melting Point Apparatus*), dan spektrometer UV (*Varian Cary* 100 *Conc.*), IR (*Shimadzu* FT-IR) dan NMR (*Jeol* ECA 500).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain larutan metanol (teknis), *n*-heksan (teknis dan *p. a.*), etil asetat (teknis), aseton (teknis dan *p. a.*), kloroform (*p. a.*), silika gel kasar untuk impregnasi (*merck*, no.katalog 7733), silika gel untuk KKT/KKG (*merck*, no.katalog 7734), silika gel untuk KKV (*merck*, no.katalog 7730), plat KLT (*merck*, no.katalog 1.05553), $CeSO_4.H_2SO_4$, bahan uji kualitatif (H_2SO_4 *p.a.*, HCl *p.a.*, asam asetat anhidrat, $FeCl_3$, dan serbuk Mg), NaCl laut (*sigma*, no.katalog S-9883), DMSO (*merck*, no.katalog 802912), telur *A. salina* Leach, akuades dan akuabides.

B. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini yaitu tumbuhan *K. hospita* Linn., dan sampel yang diteliti adalah bagian kulit akarnya.

C. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 5 bulan yaitu mulai bulan Maret sampai bulan Juli 2008. Tempat penelitian ada 3, yaitu proses ekstraksi dan isolasi di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Unhas Makassar, pengukuran spektroskopi UV di Laboratorium Kimia Bahan Alam ITB Bandung, dan pengukuran spektroskopi IR dan NMR di Puslit Kimia LIPI Serpong.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengumpulan tumbuhan

Kulit akar tumbuhan *K. hospita* Linn. dikumpulkan dari daerah Mabbiring, Desa Mabbiring, Kecamatan Sibulue, Kabupaten Bone pada bulan Februari 2008 dan telah dikonfirmasi di Herbarium LIPI Cibinong. Sampel kulit akar yang telah dibersihkan, dikeringkan dalam oven suhu 40°C kemudian dihaluskan dengan ukuran penghalus 5 mm sehingga diperoleh serbuk kulit akar seberat 3,2 kg.

2. Ekstraksi

Serbuk kulit akar (3,2 kg) dimaserasi dengan 8 liter larutan metanol pada suhu kamar selama 24 jam sebanyak 4 kali. Maserat yang dihasilkan sebanyak 17 liter dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental 1,5 liter. Ekstrak selanjutnya dipartisi dengan cara ekstraksi cair-cair dari pelarut non polar hingga pelarut polar; yaitu dari *n*-heksan, kloroform, dan EtOAc. Hasil partisi EtOAc diproses lebih lanjut dengan cara fraksinasi.

3. Fraksinasi

Hasil partisi EtOAc difraksinasi melalui kromatografi kolom (KKV, KKT, KKG) menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan analisis dengan KLT. Setiap hasil fraksinasi dimonitor pula melalui analisis dengan KLT.

4. Identifikasi

Isolat tunggal yang diperoleh diidentifikasi golongan secara kualitatif dan diuji kemurniannya melalui analisis KLT dengan varian minimal tiga macam sistem eluen, dan mengukur titik leleh untuk senyawa berbentuk kristal. Penetapan struktur senyawa dilakukan dengan metode spektroskopi UV, IR, dan NMR. Spektroskopi NMR terdiri atas ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT untuk membedakan sinyal-sinyal karbon (C, CH, CH_2, dan CH_3), HMQC untuk menunjukkan hubungan H dan C pada satu ikatan, COSY untuk menunjukkan hubungan H↔H satu ikatan, dan HMBC untuk menunjukkan adanya korelasi jarak jauh H→C maksimal tiga ikatan.

5. Uji toksisitas

Ekstrak, fraksi, dan senyawa murni diuji toksisitasnya terhadap udang *A. salina* dengan metode Meyer *et al.* (1982). Uji ini menggunakan larva udang *A. salina* Leach. Larva ini diperoleh dengan menetaskan telur udang *A. salina* dalam medium air - *sea salt* (NaCl) dan digunakan setelah 48 jam. Jumlah larva yang mati dan yang dapat bertahan hidup dalam ekstrak, fraksi, atau isolat tunggal dengan variasi konsentrasi dicatat; dan nilai LC_{50} dengan interval kepercayaan 95% dihitung menggunakan program komputer *Bliss Method*. Nilai LC_{50} yang diperoleh merupakan nilai konsentrasi sampel yang menyebabkan 50% kematian pada makhluk hidup yang digunakan yakni pada hewan uji (Anonim, 2004).

Nilai LC_{50} yang menyatakan toksisitas dari ekstrak dan senyawa murni masing-masing adalah kurang dari 500 μg/mL dan 200 μg/mL. Nilai toksisitas ini terbagi menjadi dua kategori, yaitu toksisitas tinggi (*high toxic*) untuk LC_{50} <100 μg/mL dan toksisitas rendah (*low toxic*) untuk LC_{50} >100 μg/mL (Anderson *et al*., 1990).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

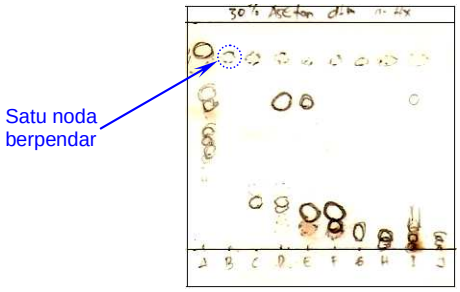
A. Hasil Penelitian

1. Ekstraksi

Hasil maserasi dari 3,2 kg serbuk kulit akar tumbuhan *K. hospita* yang dilanjutkan dengan pengurangan pelarut adalah maserat metanol kental 1,5 liter dan secara konversi berat per volume diperoleh ekstrak metanol sebanyak 59,85 gram. Maserat tersebut kemudian dipartisi secara kontinyu mulai dari pelarut non-polar yaitu *n*-heksan, semipolar $CHCl_3$, dan polar etil asetat. Hasil partisi yang diperoleh setelah dipekatkan adalah ekstrak *n*-heksan berupa residu berwarna kuning seberat 10,53 gram, ekstrak $CHCl_3$ berupa residu berwarna coklat seberat 21,16 gram, dan ekstrak etil asetat berupa residu berwarna merah bata seberat 15,59 gram. (Lampiran 1)

2. Fraksinasi

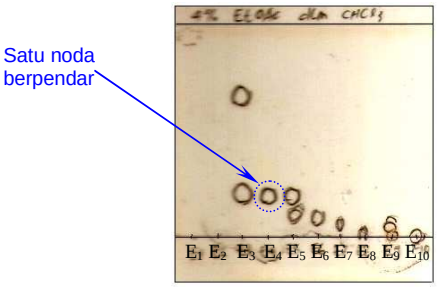
Ekstrak etil asetat (15,59 gram) difraksinasi awal melalui kromatografi kolom vakum dengan eluen *n*-heksan, EtOAc:*n*-heksan, EtOAc, EtOAc:aseton, dan aseton dengan urutan kepolaran yang ditingkatkan (Lampiran 1). Pada tahap ini dihasilkan 22 fraksi dan fraksi-fraksi yang mempunyai nilai Rf sama digabungkan (Lampiran 2), sehingga diperoleh 10 fraksi utama (A – J) seperti terlihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama A - J

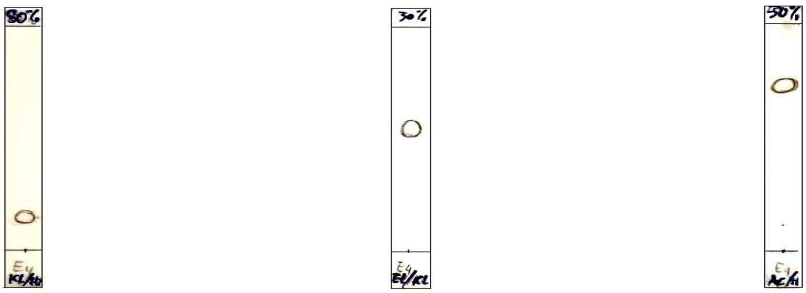
Fraksi B. Pada kromatogram KLT fraksi utama terdapat noda tunggal di fraksi B (Gambar 7). Oleh karena itu, fraksi ini dikristalisasi dan rekristalisasi dengan pelarut yang sesuai, yaitu *n*-heksan sehingga diperoleh isolat berbentuk amorf berwarna coklat seberat 1,9 mg, dan dinyatakan sebagai senyawa **[I]** (Lampiran 3).

Fraksi E. Fraksi E seberat 67,9 mg difraksinasi melalui kromatografi kolom tekan dengan eluen 30% $CHCl_3$ dalam *n*-heksan dan 1% EtOAc dalam $CHCl_3$. Berdasarkan kromatogram hasil analisis dengan KLT dari fraksinasi tersebut, diperoleh 10 fraksi utama yaitu fraksi E_1 sampai E_{10} (Gambar 8).



Gambar 8. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama E_1 – E_{10}

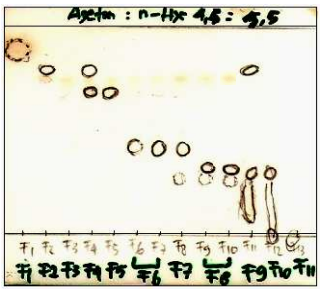
Kromatogram KLT fraksi utama E_1 – E_{10} menunjukkan noda tunggal (pendar biru) pada fraksi E_4, dengan berat fraksi 1,7 mg berupa padatan kuning . Fraksi ini kemudian diuji kemurnian melalui analisis dengan KLT menggunakan tiga macam sistem eluen (Gambar 9). Berdasarkan kromatogram hasil analisis tersebut, dinyatakan bahwa fraksi E_4 merupakan isolat tunggal, dan selanjutnya dinyatakan sebagai senyawa **[II]**. Bagan isolasi senyawa dari fraksi E pada Lampiran 4.



[$CHCl_3$: *n*-heksan/ 8 : 2**]** Rf = 0,17 | **[**EtOAc : $CHCl_3$ / 3 : 7**]** Rf = 0,57 | **[**aseton : *n*-heksan/ 1 : 1**]** Rf = 0,75

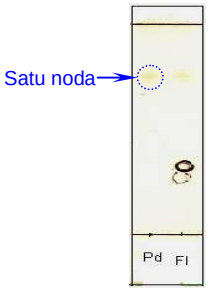
Gambar 9. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi E_4

Fraksi F. Fraksi F seberat 241,7 mg difraksinasi melalui kromatografi kolom tekan dengan eluen 2% aseton/*n*-heksan dan 30% aseton/*n*-heksan. Berdasarkan kromatogram hasil analisis dengan KLT diperoleh 11 fraksi utama, yaitu fraksi F_1-F_{11} (Gambar 10).



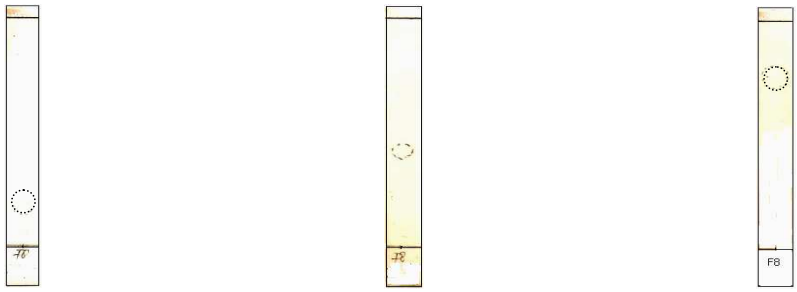
Gambar 10. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi utama F_1 – F_{11}

Kromatogram KLT fraksi utama F_1 – F_{11} pada bagian fraksi F_8 menunjukkan 3 noda dan secara fisik terbentuk endapan. Endapan tersebut disaring sehingga diperoleh padatan putih seberat 1,3 mg, dan pada kromatogram KLT menunjukkan noda tunggal yang tampak setelah disemprot $CeSO_4$ (Gambar 11). Padatan ini dinyatakan sebagai senyawa **[III]**.



Gambar 11. Kromatogram KLT fraksi F_8

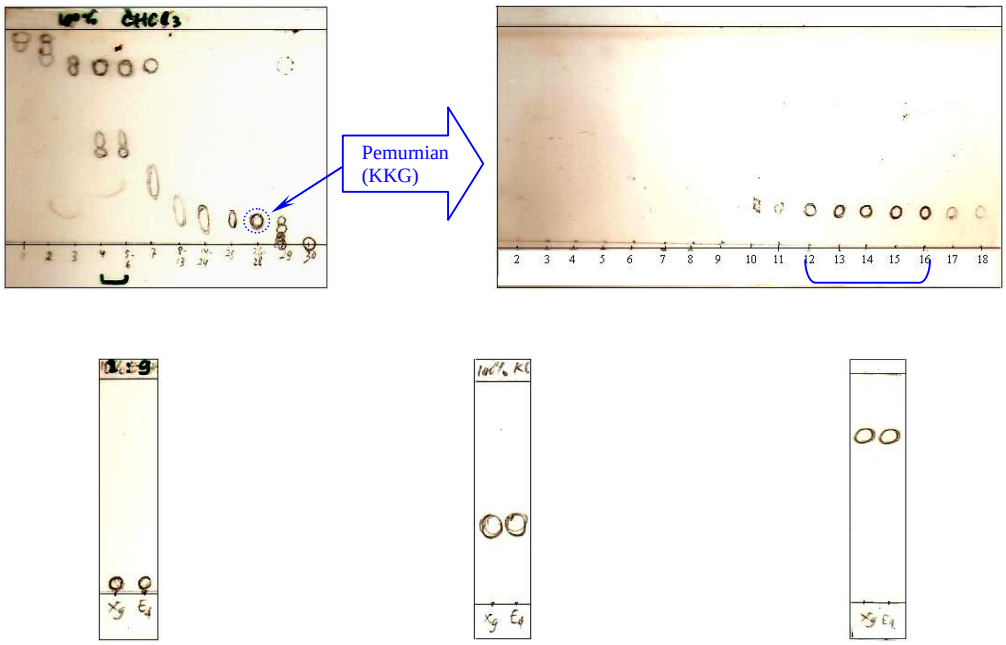
Filtrat fraksi F_8 dikristalisasi dengan 30% aseton dalam *n*-heksan dan direkristalisasi dengan $CHCl_3$ sehingga diperoleh kristal putih seberat 5 mg dengan titik leleh 210 ^oC. Pada analisis dengan KLT (Gambar 12) kristal tersebut memberikan 1 noda dan selanjutnya dinyatakan sebagai senyawa **[IV]**. Bagan isolasi dari fraksi F pada Lampiran 5.



[MeOH : $CHCl_3$/ 1 : 9**]** Rf = 0,2 | **[**EtOAc : $CHCl_3$ /7 : 3**]** Rf = 0,45 | **[**aseton : *n*-heksan/ 7 : 3**]** Rf = 0,8

Gambar 12. Kromatogram hasil analisis KLT kristal F_8

Fraksi X (40,1 mg) yang merupakan gabungan dari fraksi F_6 dan F_7 (berdasarkan kemiripan noda), difraksinasi melalui KKT dengan eluen 30% $CHCl_3$/*n*-heksan. Hasil KLT (Gambar 13) menunjukkan 11 fraksi utama X_1 – X_{11}. Satu noda berpendar terlihat pada fraksi X_9, tetapi masih ada pengotor yang lebih polar. Pemurnian melalui kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan eluen $CHCl_3$: *n*-heksan (1 : 1) memberikan noda tunggal (pendar biru) yang tertampung pada fraksi 12 sampai 16, yang kemudian diuji kemurnian melalui analisis dengan KLT dan dibandingkan dengan senyawa **[II]**. Berdasarkan kromatogram hasil analisis tersebut, dinyatakan bahwa fraksi X_9 (12-16) merupakan isolat tunggal (senyawa **[II]**) dengan berat 2 mg. Bagan isolasi pada Lampiran 6.



[EtOAc : *n*-heksan/ 1 : 9]
Rf = 0,07

[100% $CHCl_3$]
Rf = 0,4

[aseton : *n*-heksan/ 1 : 1]
Rf = 0,75

Gambar 13. Kromatogram hasil analisis KLT fraksi X

3. Identifikasi

Senyawa [I]. Senyawa **[I]** (1,9 mg) berbentuk amorf coklat dan pada kromatogram KLT menunjukkan noda berpendar kuning di bawah lampu UV λ 365 nm. Pada analisis golongan senyawa **[I]** (Lampiran 8) memberikan warna hijau setelah penambahan $FeCl_3$ yang menunjukkan reaksi positif sebagai **senyawa fenolik**.

Senyawa [II]. Senyawa **[II]** (3,7 mg) berbentuk padatan kuning dan pada kromatogram KLT menunjukkan noda berpendar biru di bawah lampu UV λ 254 dan 365 nm. Berdasarkan data spektroskopi, yaitu UV (MeOH) λ_{maks} nm (Abs): 203 (0,4918), 276 (0,0849); UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm (Abs): 203 (2,2555), 335 (0,0661), 368; IR (KBr) υ_{maks} cm^{-1}: 3001 (=C-H aromatik), 1598 dan 1512 (C=C aromatik), 2958, 2920, dan 2850 (-C-H alifatik), 1265 dan 1026 (C-O), 802 (aromatik *di*substitusi *para*) (Gambar 14); ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 7,70 (2H, *dd*, *J* = 9 & 2 Hz, H-2 dan H-6), 7,53 (2H, *dd*, *J* = 9 & 2,5 Hz, H-3 dan H-5), 3,95 (1H, *s*, H-1'), 4,21 (4H, *dd, J* = 15 & 2 Hz, H-1" dan H-3"), 1,66 (2H, *m*, H-2" dan H-7"), 1,24 (4H, *m,* H-4" dan H-6"), 1,32 (2H, *m*, H-5"), 0,92 (3H, *d, J* = 7,4 Hz, H-8"), 1,30 (2H, *m*, H-9"), 0,90 (3H, *t,J* = 6,7 Hz, H-10"), 6,10 (*brs*, 4-OH) (Gambar 15); ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ ppm: 132,5 (C-1), 128,9 (C-2 dan C-6), 131,1 (C-3 dan C-5), 167,9 (C-4), 56,5 (C-1'), 68,3 (C-1" dan C-3"), 38,8 (C-2" dan C-7"), 29,8 (C-4" dan C-6"), 23,8 (C-5"), 11,1 (C-8"), 23,1 (C-9"), 14,3 (C-10") (Gambar 16), dinyatakan bahwa senyawa ini adalah senyawa **geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol**.

Senyawa [III]. Senyawa **[III]** (1,3 mg) berbentuk padatan putih dan pada kromatogram KLT menunjukkan noda yang tampak setelah disemprot $CeSO_4$. Pada analisis golongan senyawa **[III]** (Lampiran 8) memberikan warna hijau setelah penambahan asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 yang menunjukkan reaksi positif sebagai **senyawa steroid**.

Senyawa [IV]. Senyawa **[IV]** (5 mg) berbentuk kristal putih dengan titik leleh 210 ^oC dan pada kromatogram KLT menunjukkan noda berpendar hitam di bawah lampu UV λ 254 nm. Berdasarkan data spektroskopi, yaitu UV (MeOH) λ_{maks} nm (Abs): 210 (0,2960 *bh*), 224 (0,3142), 291 (0,5012), 309 (0,5074 *bh*); UV (MeOH+NaOH) λ_{maks} nm (Abs): 207 (1,9913), 310 (0,4846 bh), 333 (0,6166); IR (KBr) υ_{maks} cm^{-1}: 3338 (-OH), 1674 (C=O amida), 1627 (N-H primer), 3188 (overtone N-H), 3066 dan 3026 (=C-H aromatik), 1598 dan 1510 (C=C aromatik), 2964, 2900, dan 2839 (-C-H alifatik), 1215 (C-O), 975 (*trans 1,2-di*substitusi), 831 (aromatik *di*-substitusi *para*) (Gambar 18); ^{1}H-NMR (500 MHz, Aseton [d_6]) δ ppm: 7,55 (2H, *dd*, *J* = 8,6 & 2,9 Hz, H-2 dan H-6), 6,89 (2H, *dd*, *J* = 8,6 & 3 Hz, H-3 dan H-5), 7,61 (1H, *d, J* = 15,9 Hz, H-1'), 6,33 (1H, *d, J* = 15,9 Hz, H-2'), 7,9 (*s*, 3'-NH_2), 3,00 (*brs*, 4-OH); ^{13}C-NMR (125 MHz, Aseton [d_6]) δ ppm: 127,1 (C-1), 130,9 (C-2 dan C-6), 116,7 (C-3 dan C-5), 160,5 (C-4), 145,5 (C-1'), 115,8 (C-2'), 168,1 (C-3') (Gambar 19), dinyatakan bahwa senyawa ini adalah senyawa ***4*-hidroksi sinamida**.

4. Uji Toksisitas

Nilai toksisitas (LC_{50}) terhadap *A. salina* dari ekstrak awal (ekstrak MeOH) adalah >1.000 μg/ml (bersifat non-toksik). Selanjutnya LC_{50} dari ekstrak hasil partisi, yaitu ekstrak *n*-heksan, ekstrak $CHCl_3$, dan ekstrak EtOAc secara berurut adalah 369, 46,19, dan 16,87 μg/ml (bersifat toksik). Adapun nilai toksisitas fraksi-fraksi dari ekstrak EtOAc dapat dilihat pada Tabel 3. Tiga isolat, yaitu senyawa fenolik **[I]**, geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II],** dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]** memiliki nilai toksisitas secara berurut 195,24 μg/ml (toksik), 544,43 μg/ml (non-toksik), dan 180,53 μg/ml (toksik) sedangkan satu isolat, yaitu senyawa steroid **[III]** tidak diuji sebab tidak larut dalam pelarut uji.

Tabel 3. Nilai toksisitas fraksi-fraksi dari ekstrak EtOAc

Fraksi	LC_{50} (μg/mL)	Keterangan
A	167,14	Toksik
B	334,49	Toksik
C	373,32	Toksik
D	53,11	Toksik
E	175,73	Toksik
F	155,17	Toksik
G	570,00	Non-toksik
H	196,94	Toksik
I	65,12	Toksik
J	7,45	Toksik

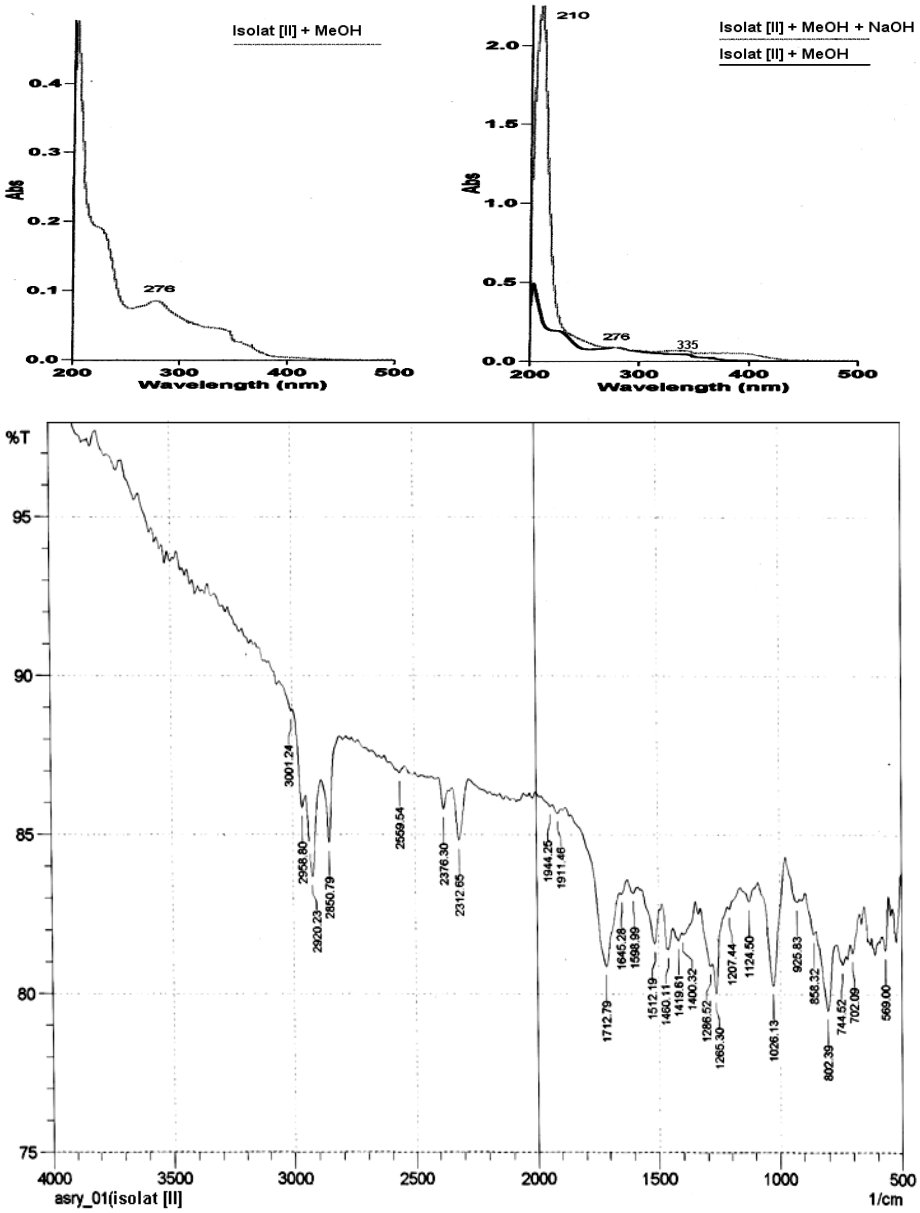
B. Pembahasan

1. Isolasi dan identifikasi metabolit sekunder

Pada penelitian isolasi metabolit sekunder dari ekstrak EtOAc kulit akar *K. hospita* dihasilkan empat senyawa. Dua senyawa diidentifikasi golongan secara kualitatif, yaitu senyawa fenolik **[I]** dan senyawa steroid **[III]**. Dua senyawa lainnya telah ditentukan strukturnya berdasarkan data spektroskopi UV, IR dan NMR yaitu senyawa geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II]** dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]**.

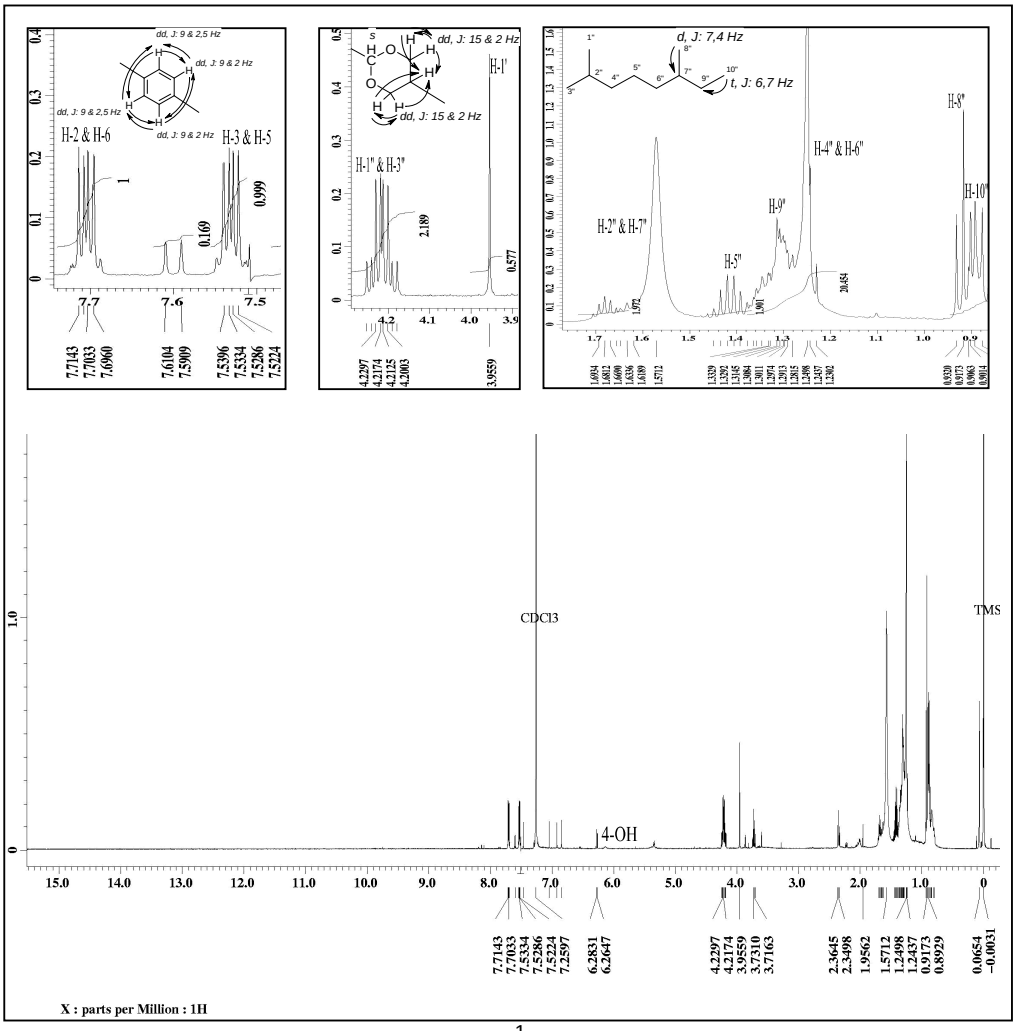
Geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol [II]. Senyawa **[II]** (3,7 mg) berbentuk padatan kuning. Analisis data spektroskopi UV (MeOH) menunjukkan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang (λ_{maks}) 276 nm yang mengindikasikan adanya eksitasi elektron yang sesuai untuk sistem ikatan rangkap terkonjugasi (-C=C-C=C-) homoanular dan disarankan sebagai cincin aromatik yang khas untuk senyawa fenol. Pola konjugasi ini didukung dengan pola spektrum pada penambahan pereaksi geser NaOH dengan pergeseran batokromik sepanjang 39 nm (276 → 335 nm) yang mengindikasikan adanya gugus hidroksil bebas. Analisis data spektroskopi IR (KBr) memperlihatkan pita serapan (υ_{maks}) pada 1598, dan 1512 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi C=C aromatik yang didukung dengan serapan =C-H aromatik pada 3001 cm^{-1} dan overtone pada 2000 – 1667 cm^{-1} serta serapan yang tajam pada 802 cm^{-1} yang menunjukkan pola aromatik *di*substitusi *para*; pada 2958, 2920, dan 2850 cm^{-1} menunjukkan serapan C-H alifatik; dan pada 1265 dan 1026

menunjukkan vibrasi C-O. Serapan OH hanya berupa overtone pada daerah >3400 cm^{-1} yang menunjukkan vibrasi OH bebas tanpa pengaruh ikatan hidrogen intramolekuler (Gambar 14). Berdasarkan hasil analisis data spektroskopi UV dan IR maka dapat diusulkan bahwa senyawa **[II]** mempunyai gugus hidroksil, gugus C-H alifatik dan aromatik.



Gambar 14. Spektrum UV dan IR senyawa **[II]**

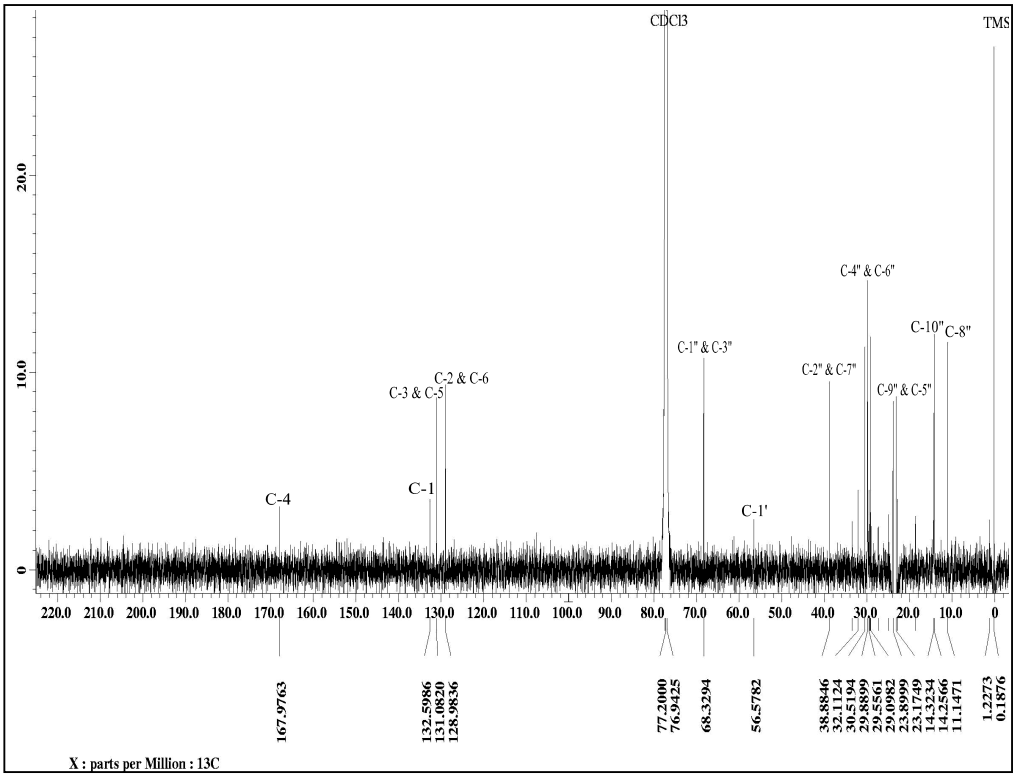
Analisis data spektroskopi ^{1}H-NMR memperlihatkan adanya sinyal pada daerah geseran kimia aromatik, yaitu pada δ 7,70 ppm (2H, *dd, J* = 9 & 2 Hz) dan δ 7,53 ppm (2H, *dd*, *J* = 9 & 2,5 Hz) yang menunjukkan pola kopling *orto/meta* untuk dua atom H yang identik. Pola ini menggambarkan suatu unit aromatik di-substitusi pada posisi *para* dalam sistem spin AA'BB'. Salah satu substituen dari unit aromatik ini adalah OH dengan adanya sinyal pada δ 6,10 ppm (*brs*).



Gambar 15. Spektrum ^{1}H-NMR senyawa **[II]**

Pada daerah alifatik terlihat pula beberapa sinyal yang mengindikasikan suatu unit geranil, yaitu sinyal untuk gugus metil ujung (H-10”) pada δ 0,90 ppm (3H, *t, J* = 6,7 Hz); metil H-8” pada δ 0,92 ppm (3H, *d, J* = 7,4 Hz); enam metilen masing-masing untuk H-9” pada δ 1,30 ppm (2H, *m*), H-6” dan H-4” pada δ 1,24 ppm (4H, *m*), H-5” pada δ 1,32 ppm (2H, *m*), serta H-1” dan H-3” pada δ 4,21 ppm (4H, *dd, J* = 15 & 2 Hz) yang menunjukkan adanya pengaruh elektronegativitas yang menyebabkan pergeseran ke daerah *dishelding*; dan dua metin H-2” dan H-7” pada δ 1,66 ppm (2H, *m*). Sepuluh sinyal H ini membentuk kerangka geranil tanpa ikatan rangkap dengan dua atom C ujung mengikat gugus O (dioksan). Unit geranil dan aromatik dihubungkan oleh satu metin H-1’ pada δ 3,95 ppm (1H, *s*) (Gambar 15).

Analisis data spektroskopi ^{13}C-NMR memperlihatkan 12 sinyal C namun ada lima sinyal yang menunjukkan 2C yang identik sehingga total karbonnya 17, yang teridentifikasi sebagai berikut: pada δ 167,9 ppm menunjukkan karbon oksi-aril (C-4); pada δ 132,5 ppm (C-1), 128,9 ppm (C-2 dan C-6), dan 131,1 ppm (C-3 dan C-5) menunjukkan karbon aromatik; dan pada δ 56,5 ppm (C-1’), 68,3 ppm (C-1” dan C-3”), 38,8 ppm (C-2” dan C-7”), 29,8 ppm (C-4” dan C-6”), 23,8 ppm (C-5”), 11,1 ppm (C-8”), 23,1 ppm (C-9”), dan 14,3 ppm (C-10”) menunjukkan karbon alifatik (Gambar 16), yang didukung dengan spektrum DEPT yang memperlihatkan 2 sinyal metil (CH_3), 6 metilen (CH_2), dan 3 metin (CH) (Lampiran 10).

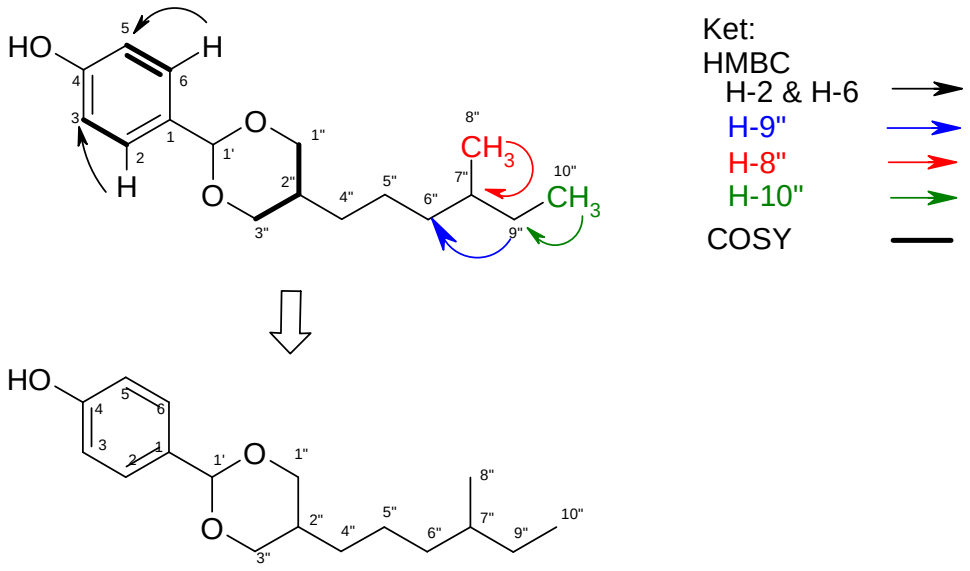


Gambar 16. Spektrum ^{13}C-NMR senyawa **[II]**

Hubungan antara sinyal proton (^{1}H) dan karbon (^{13}C) ditunjukkan pada spektrum 2Dimensi-NMR, yaitu HMQC (Lampiran 11), dan antara sinyal H↔H satu ikatan dapat dilihat pada spektrum COSY (Lampiran 12). Berdasarkan analisis data spektroskopi UV, IR dan NMR dapat diusulkan struktur untuk senyawa **[II],** yaitu geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol. Pembuktian struktur senyawa **[II]** diperlihatkan pada spektrum HMBC yang menunjukkan adanya korelasi jarak jauh H → C (Lampiran 13). Pada spektrum HMBC terlihat adanya korelasi jarak jauh antara H-2/H-6 dengan C-3/C-5, H-8" dengan C-7", H-9" dengan C-6", dan H-10" dengan C-9" sehingga dapat dipastikan bahwa senyawa **[II]** adalah geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol. Data lengkap senyawa **[II]** dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Data spektroskopi ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[II]**

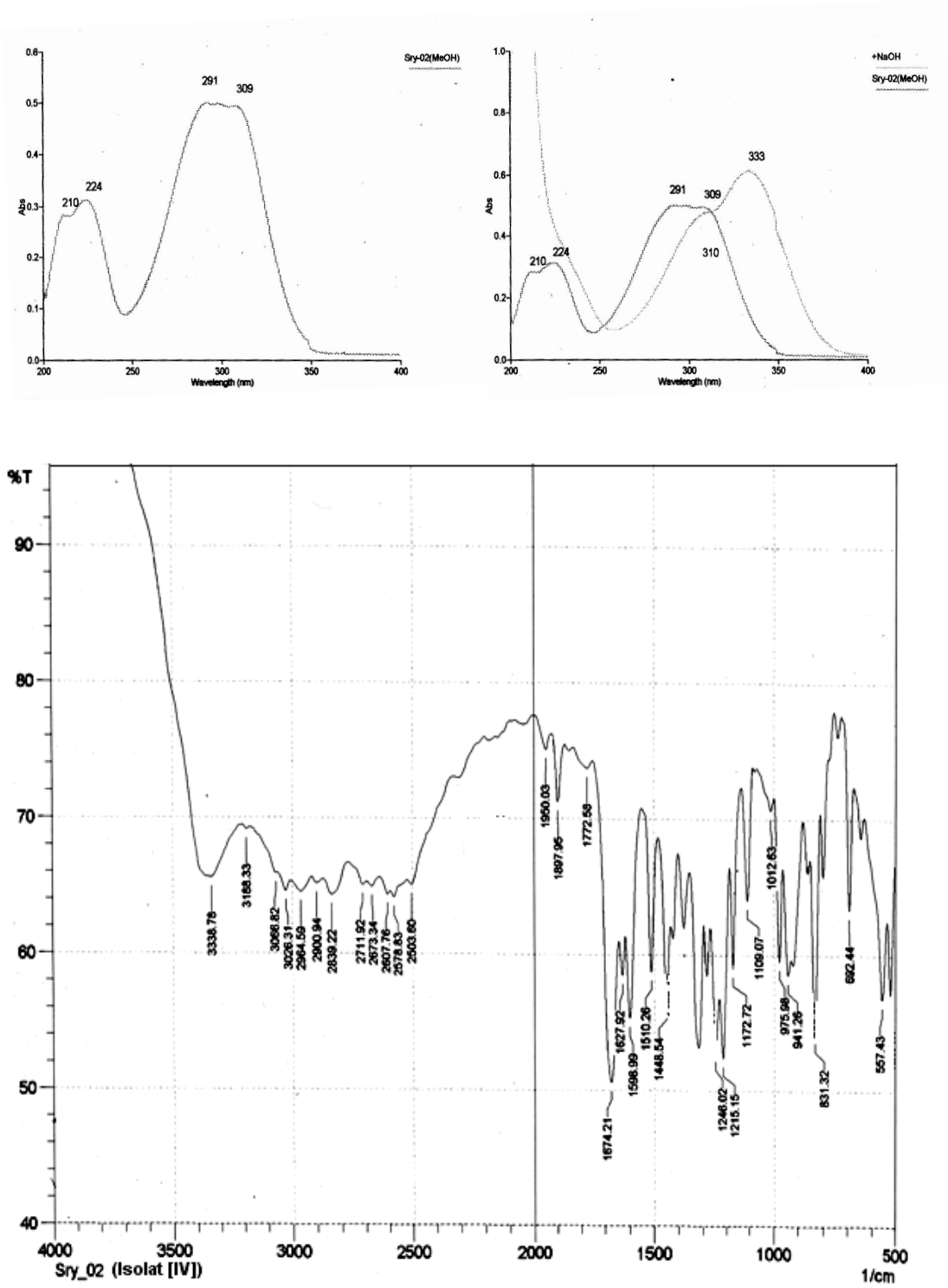
Posisi	^{1}H-NMR δ ppm (H, *multiplisitas*, *konst.kopling*)	^{13}C-NMR δ ppm	HMBC (H→C)	COSY (H↔H)
1	-	132,5	-	-
2 & 6	7,70 (2H, *dd*, *J* = 9 & 2 Hz	128,9	C-3/C-5	H-3/ H-5
3 & 5	7,53 (2H, *dd*, *J* = 9 & 2,5 Hz)	131,1	-	H-2/ H-6
4	-	167,9	-	-
	6,10 (*brs*, 4-OH)			
1’	3,95 (1H, *s*’)	56,5	-	-
1” & 3”	4,21 (4H, *dd, J* = 15 & 2 Hz)	68,3	-	H-2”
2” & 7”	1,66 (2H, *m*)	38,8	-	-
4” & 6”	1,24 (4H, *m*)	29,8	-	-
5”	1,32 (2H, *m*)	23,8	-	-
8”	0,92 (3H, *d, J* = 7,4 Hz)	11,1	C-7”	-
9”	1,30 (2H, *m*)	23,1	C-6”	-
10”	0,90 (3H, *t,J* = 6,7 Hz)	14,3	C-9”	-



[II]

Gambar 17. Struktur senyawa **[II]** (geranil-*1”,3”*-diokso-*para*-kresol)

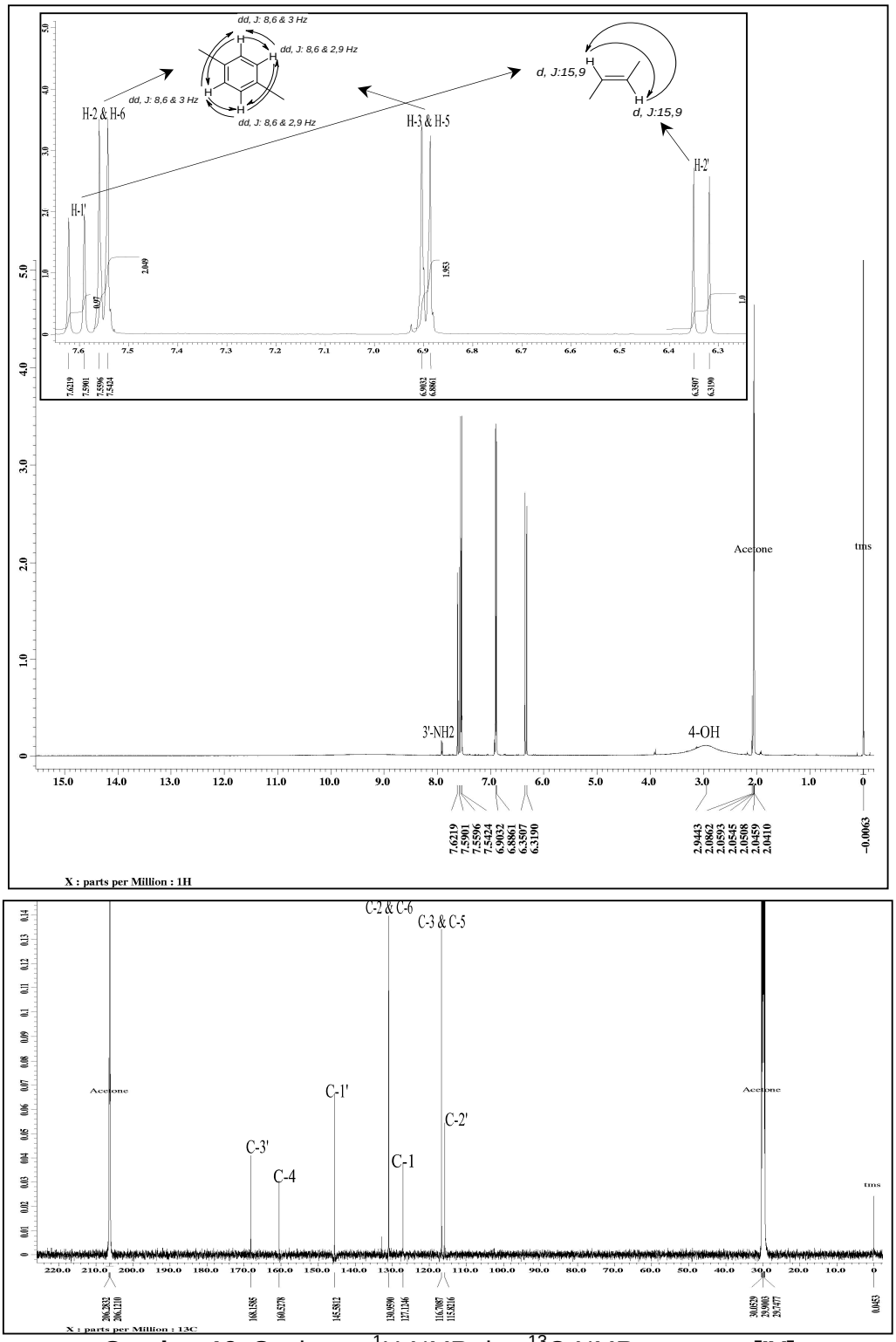
4-hidroksi sinamida [IV]. Senyawa **[IV]** (5 mg) berbentuk kristal putih dengan titik leleh 210°C. Analisis data spektroskopi UV (MeOH) menunjukkan adanya serapan maksimum pada λ_{maks} 291 nm yang mengindikasikan adanya sistem ikatan rangkap terkonjugasi (-C=C-C=C-) yang khas untuk senyawa fenol. Pola konjugasi ini didukung dengan pola spektrum pada penambahan pereaksi geser NaOH dengan pergeseran batokromik sepanjang 42 nm (291 → 333 nm) yang mengindikasikan adanya gugus hidroksil bebas. Analisis data spektroskopi IR (KBr) memperlihatkan pita serapan (υ_{maks}) cukup tajam pada 1674 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karbonil (C=O) dari suatu amida yang didukung dengan serapan pada 1627 cm^{-1} untuk vibrasi N-H primer dan overtone pada 3188 cm^{-1}. Serapan pada 1598 dan 1510 cm^{-1} menunjukkan vibrasi C=C aromatik yang didukung dengan serapan =C-H aromatik pada 3066 dan 3026 cm^{-1} dan overtone pada 2000 – 1667 cm^{-1} serta serapan yang tajam pada 831 cm^{-1} yang menunjukkan pola aromatik *di*substitusi *para.* Sedangkan pada 2964, 2900, dan 2839 cm^{-1} menunjukkan serapan C-H alifatik. Satu pita serapan yang tajam juga terlihat pada 975 cm^{-1} yang menunjukkan suatu alkena dengan pola *trans 1,2-di*substitusi (Gambar 18). Berdasarkan hasil analisis spektrum UV dan IR, maka dapat diusulkan bahwa senyawa **[IV]** mempunyai gugus hidroksi, gugus karbonil amida, gugus C-H alifatik, alkena, dan aromatik (fenol).



Gambar 18. Spektrum UV dan IR senyawa **[IV]**

Analisis data spektroskopi ^{1}H-NMR memperlihatkan beberapa sinyal diantaranya pada daerah geseran kimia aromatik, yaitu pada δ 7,55 ppm (2H, *dd*, *J* = 8,6 & 2,9 Hz) dan δ 6,89 ppm (2H, *dd*, *J* =8,6 & 3 Hz) yang menunjukkan pola kopling *orto/meta* untuk dua atom H yang identik. Pola ini menggambarkan suatu unit aromatik di-substitusi pada posisi *para* dalam sistem spin AA'BB'. Salah satu substituen dari unit aromatik ini adalah OH dengan adanya sinyal pada δ 3,00 ppm (*brs*). Pada δ 7,61 ppm (1H, *d, J* = 15,9 Hz) dan δ 6,33 ppm (1H, *d, J* = 15,9 Hz) juga menunjukkan suatu pola kopling namun bukan untuk sistem aromatik. Pola ini menunjukkan satu ikatan rangkap (alkena) dengan posisi *trans*, dan berada pada lingkungan *dishelding* sehingga geseran kimianya berada pada daerah aromatik. Spektrum ^{1}H-NMR juga memperlihatkan satu sinyal pada δ 7,91 ppm (*s*) yang khas untuk gugus NH_2 yang mendukung adanya gugus amida (Gambar 19).

Analisis data spektroskopi ^{13}C-NMR memperlihatkan 7 sinyal C namun ada dua sinyal yang menunjukkan 2C yang identik sehingga total karbonnya 9, yang teridentifikasi sebagai berikut: pada δ 168,1 ppm menunjukkan karbon karbonil yang spesifik untuk gugus amida; pada δ 160,5 ppm menunjukkan karbon oksi-aril; pada δ 116,7, 127,1, dan 130,9 ppm menunjukkan karbon aromatik; dan pada δ 145,5 dan 115,8 ppm menunjukkan karbon alkena (Gambar 19), yang didukung dengan spektrum DEPT yang memperlihatkan 4 sinyal karbon tersier (CH) (Lampiran 14).

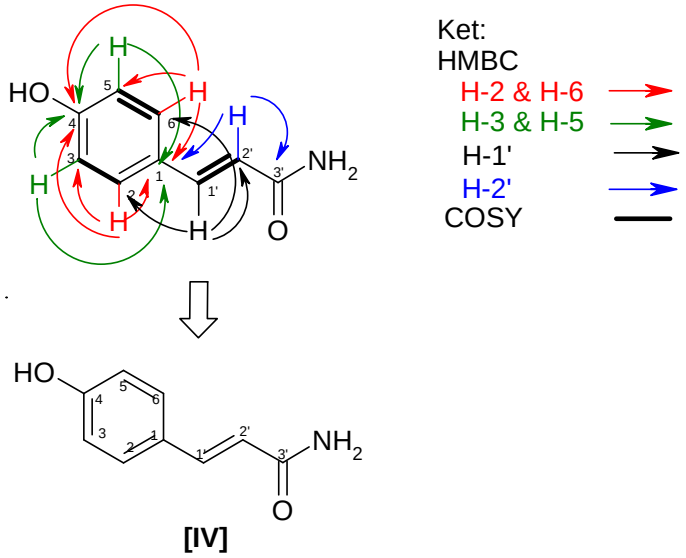


Gambar 19. Spektrum ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[IV]**

Hubungan antara sinyal proton (^{1}H) dan karbon (^{13}C) ditunjukkan pada spektrum 2Dimensi-NMR, yaitu HMQC (Lampiran 15), dan antara sinyal H↔H satu ikatan dapat dilihat pada spektrum COSY (Lampiran 16). Berdasarkan analisis data spektroskopi UV, IR dan NMR dapat diusulkan struktur untuk senyawa **[IV],** yaitu *4*-hidroksi sinamida. Pembuktian struktur senyawa **[IV]** diperlihatkan pada spektrum HMBC yang menunjukkan adanya korelasi jarak jauh H → C (Lampiran 17). Pada spektrum HMBC terlihat adanya korelasi jarak jauh antara H-2/H-6 dengan C-3/C-5, C-1, dan C-4; H-3/H-5 dengan C-1 dan C-4; H-1' dengan C-2/C-6 dan C-2'; serta H-2' dengan C-1' dan C-3' sehingga dapat dipastikan bahwa senyawa **[IV]** adalah *4*-hidroksi sinamida. Data lengkap senyawa **[IV]** dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data ^{1}H-NMR dan ^{13}C-NMR senyawa **[IV]**

Posisi	^{1}H-NMR δ ppm (H, *multiplisitas*, *konst.kopling*)	^{13}C-NMR δ ppm	HMBC (H→C)	COSY (H↔H)
1	-	127,1	-	-
2 & 6	7,55 (2H,*dd,J* =8,6 & 2,9 Hz)	130,9	C-3/C-5, C-1, C-4	H-3/ H-5
3 & 5	6,89 (2H, *dd, J* = 8,6 & 3 Hz)	116,7	C-1, C-4	H-2/ H-6
4	-	160,5	-	-
	3,00 (*brs*, 4-OH)			
1'	7,61 (1H, *d, J* = 15,9 Hz)	145,5	C-2/C-6, C-2'	H-2'
2'	6,33 (1H, *d, J* = 15,9 Hz)	115,8	C-1, C-3'	H-1'
3'	-	168,1	-	-
	7,91 (*s*, NH_2)	-	-	-



Gambar 20. Struktur senyawa **[IV]** (*4*-hidroksi sinamida)

2. Uji toksisitas

Hasil uji toksisitas terhadap *A. salina* pada ekstrak, fraksi, dan isolat tunggal dari kulit akar tumbuhan *K. hospita* menunjukkan tingkat toksisitas yang cukup tinggi berdasarkan ketentuan nilai LC_{50} yang menyatakan toksisitas dari ekstrak dan senyawa murni masing-masing adalah kurang dari 500 μg/mL dan 200 μg/mL (Anderson *et al*., 1990).

Nilai LC_{50} dari ekstrak hasil partisi, yaitu ekstrak *n*-heksan, ekstrak $CHCl_3$, dan ekstrak EtOAc secara berurut adalah 369, 46,19, dan 16,87 μg/ml. Data uji ini menunjukkan ekstrak EtOAc memiliki tingkat toksisitas tertinggi dibandingkan kedua ekstrak lainnya yang mengindikasikan adanya kandungan metabolit sekunder bersifat toksik (korelasi positif sebagai anti kanker). Demikian pula dengan hasil fraksinasi ekstrak EtOAc, dari sepuluh fraksi utama A – J (Tabel 3) hanya satu fraksi yang

bersifat non-toksik, yaitu fraksi G dengan LC_{50} 570 µg/ml. Tiga fraksi utama yang bersifat toksik, yaitu fraksi B, E, dan F masing-masing dengan LC_{50} 334,49, 175,73, 155,17 µg/ml menghasilkan isolat tunggal . Senyawa fenolik **[I]** diperoleh dari fraksi B, geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II]** dari fraksi E & F, dan senyawa steroid **[III]** dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]** dari fraksi F. Senyawa fenolik **[I]**, geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II],** dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]** memiliki nilai toksisitas secara berurut 195,24 µg/ml (toksik), 544,43 µg/ml (non-toksik), dan 180,53 µg/ml (toksik) sedangkan senyawa steroid **[III]** tidak diuji sebab tidak larut dalam pelarut uji.

Tingkat toksisitas dari senyawa **[I]** dan **[IV]** dapat membuktikan adanya kandungan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai anti kanker dalam ekstrak EtOAc kulit akar tumbuhan *K. hospita* khususnya senyawa-senyawa fenol, dan terbukti pula bahwa senyawa-senyawa anti kanker dapat diisolasi dari jaringan tumbuhan dengan toksisitas rendah terhadap *A. salina*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Ekstrak EtOAc kulit akar tumbuhan *K. hospita* mengandung senyawa fenolik **[I],** senyawa geranil-*1",3"*-diokso-*para*-kresol **[II],** senyawa steroid **[III]**, dan *4*-hidroksi sinamida **[IV]**. Senyawa **[I], [II],** dan **[IV]** termasuk golongan senyawa fenol. Senyawa **[I]** dan **[IV]** bersifat toksik terhadap *A. salina* dengan LC_{50} masing-masing adalah 195,24 dan 180,53 μg/ml dibanding senyawa **[II]** dengan LC_{50} 544,43 μg/ml.

B. Saran

Toksisitas senyawa murni yang ditemukan jauh lebih rendah dari toksisitas ekstrak asalnya, sehingga perlu dilakukan penelusuran lebih lanjut untuk membuktikan apakah senyawa-senyawa yang telah diperoleh bukan senyawa yang paling toksik atau toksisitas pada ekstrak disebabkan sinergisme antara senyawa toksik dan non-toksik yang menyebabkan nilai toksisitasnya lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Achmad, S.A. 2007. *Keanekaragaman Hayati dalam Pembelajaran Ilmu Kimia*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia, Jurusan Kimia Universitas Negeri Makassar, Makassar, 5 September.

Adeniyi, B.A., Groves, M.J. and Gangadharam, P.R. 2004. *In vitro* Anti-mycobacterial Activities of Three Species of *Cola* Plant Extracts (Sterculiaceae). *Phytother Res* **18:** 414 - 418.

Alam, M.S., Chopra, N., Ali, M. and Niwa, M. 1996. Oleanen and Stigmasterol Derivatives from *Ambroma augusta*. *Phytochemistry*, **41(4)**: 1197-1200.

Anderson, J.E., Goetz, C.M. and McLaughlin, J. L. 1990. A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreen. *Phytochemical analysis* **6:** 107 - 111.

Anonim. 2004. *Brine Shrimp Microwell Cytotoxicity Asssay*. Departemen Kimia FMIPA-ITB, Bandung.

Atun, S. 2005. *Pengembangan Potensi Bahan Alam sebagai Sumber Penemuan Obat Baru*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia, Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta, 24 September.

Berenguer, B., Trabadela, C., Sánchez-Fidalgo, S., Quílez, A., Miño, P., De la Puerta, R. and Martín-Calero, M.J. 2007. The Aerial Parts Of *Guazuma Ulmifolia* Lam. Protect Against NSAID-Induced Gastric Lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, **114(2)**: 153-160.

Bhakuni, R.S., Shukla, Y.N. and Thakur, R.S. 1991. Melochicorine, A Pseudooxindole Alkaloid from *Melochia corchorifolia. Phytochemistry*, **30(9)**: 3159-3160.

Chakrabarti, R., Vikramadithyan, R.K., Mullangi, R., Sharma, V.M., Jagadheshan, H., Rao, Y.N., Sairam, P. and Rajagopalan, R. 2002. Antidiabetic and Hypolipidemic Activity of *Helicteres isora* in Animal Models. *Journal of Ethnopharmacology*, **81(3)**: 343-349.

Chen, W., Tang, W., Lou, L. and Zhao, W. 2006. Pregnane, Coumarin and Lupane Derivatives and Cytotoxic Constituents from *Helicteres angustifolia*. *Phytochemistry* **67(10):** 1041 - 1047.

Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Negrete, R., Vidal, P., Silva, X., Lopez-Perez, J.L., Feliciano, A.S. and Munoz, O. 2005. Analgesic–Antiinflammatory Properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**, 119–124.

Dias, G.C.D., Gressler, V., Hoenzel, S.C.S.M., Silva, U.F., Dalcol, I.I. and Morel, A.F. 2007. Constituents of The Roots of *Melochia chamaedrys*. *Phytochemistry* **68(5):** 668 – 672.

Dini, I. 2005. *Penelusuran Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Paliasa* (*Kleinhovia hospita* Linn.) *dan Bioaktivitasnya terhadap Artemia salina* Leach. Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

Ersam, T., Achmad, S.A., Ghisalberti, E.L., Hakim, E.H., Tamin, R. 2000. *Some Phenolic Compounds from Artocarpus Altilis* (Park.) Fosb*.* Proceeding in International Seminar on The Role of Chemistry in Industry and Enviromental, Andalas University, Padang, August 30th – 31st.

Ersam, T. 2004. *Keunggulan Biodiversitas Hutan Tropika Indonesia dalam Merekayasa Model Molekul Alami*. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia VI, Jurusan Kimia FMIPA ITS, (Online), (http://www.its.ac.id/personal/files/pub/764-beckers-chem-Kimia%20ITS%20TE%2004.pdf, diakses 29 oktober 2007).

Gaffar, I., Noor, A., Harlim, T. dan Soekamto, N.H. 2007. Skrining Bioaktivitas Jaringan Tumbuhan Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.) Asal Sulawesi Selatan. *Jurnal Ilmiah Kimia dan Pendidikan Kimia* **8(2)** : 68 – 75.

Gressler, V., Caroline Z. Stüker, C.Z., Dias, G.O.C., Dalcol, I.I., Burrow, R.A., Schmidt, J., Wessjohann, L. and Morel, A.F. 2008. Quinolone Alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry*, **69(4)**: 994-999.

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. and Verweij, P.E. 2006. Antifungal Activity of Some Tanzanian Plants Used Traditionally for The Treatment of Fungal Infections. *Journal of Ethnopharmacology* **108(1)**: 124 - 132.

Harborne. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro. Penerbit ITB, Bandung.

Hasni. 2002. *Pengaruh Infus Daun Kayu Paliasa Kleinhovia hospita* Linn. *terhadap Transport Aktif Glukosa pada Usus Halus Marmut.* Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Hasanuddin.

Herlina. 1993. *Pengaruh Infus Daun Kayu Paliasa Kleinhovia hospita* Linn. *terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Kelinci.* Skripsi tidak diterbitkan. Makassar: Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Hasanuddin.

Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia,* Jilid 3. Departemen Kehutanan, Jakarta.

Hoelzel, S.C.S.M., Vieira, E.R., Giacomelli, S.R., Dalcol, I.I., Zanatta, N. and Morel, A.F. 2005. An Unusual Quinolinone Alkaloid from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry* **66(10**): 1163 - 1167.

Hutchings *et al*., 1996; dalam Reid, K.A., Jäger, A.K., Light, M.E., Mulholland, D.A. and Van Staden, J. 2005. Phytochemical and Pharmacological Screening of Sterculiaceae Species and Isolation of Anti-bacterial Compounds. *Journal of Ethnopharmacology* **97(2):** 285 - 291.

Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Endang, H., Umar, M. and Satake, T. 2001. Flavonoid Glucuronides from *Helicteres isora. Phytochemistry* **57(2):** 297 - 301.

Kumar, G., Banu, G.S., Murugesan, A.G. and Pandian, M.R. 2006. Hypoglycemic Effect of *Helicteres isora* Bark Extract in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **107(2)**: 304-307.

Latiff. 1997; dalam Hanum, I.F. and van der Maesen, L.J.G. 2007. *Plant Resources of South-East Asia No. 11*. *Auxiliary Plants*. LIPI Press, Jakarta (Online), (http://www.worldagroforestrycentre.org/sea/products/afdbases/af/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=18130, diakses 29 oktober 2007).

Lyu *et al.* 2005; dalam Berenguer, B., Trabadela, C., Sánchez-Fidalgo, S., Quílez, A., Miño, P., De la Puerta, R. and Martín-Calero, M.J. 2007. The Aerial Parts Of *Guazuma Ulmifolia* Lam. Protect Against NSAID-Induced Gastric Lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, **114(2)**: 153-160.

Meyer, N., Ferriginii, N.R., Putnam, J.E, Jacobsen,n D.E., Nichols, D.E., McLaughin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convinient General Bioassay for Active Plant Constituens, *Planta Med*, **45,** 31.

Morel, A.F., Flach, A., Zanatta, N., Ethur, E.M., Mostardeiro, M.A. and Gehrke, I.T.S. 1999. A New Cyclopeptide Alkaloid from The Bark of *Waltheria douradinha*. *Tetrahedron Letters* **40(52):** 9205 - 9209.

Mudjirahmini, D. dan Ersam, T. 2006. *4-Fenilkumarin pada Fraksi Polar Ekstrak Etil Asetat dari Batang Garcinia balica* Miq. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Kimia VIII, Jurusan Kimia FMIPA ITS, Surabaya, 8 Agustus.

Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S. dan Kuswanto, K.S. 2007. Kandungan Fenol dan Sifat Antibakteri dari Berbagai Jenis Ekstrak Produk Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *Majalah Farmasi Indonesia*, **18(3)**: 141 – 146.

Porter, L.J., Ma, Z. and Chan, B.G. 1991. Cacao Procyanidins: Major Flavanoids and Identification of Some Minor Metabolites. *Phytochemistry*, **30(5)**: 1657-1663.

Raflizar, Adimunca, C., dan Tuminah, S. 2006. Dekok Daun Paliasa (*Kleinhovia hospita* Linn.) sebagai Obat Radang Hati Akut. *Cermin Dunia Kedokteran* **50:** 10 – 14.

Reid, K.A., Jäger, A.K., Light, M.E., Mulholland, D.A. and Van Staden, J. 2005. Phytochemical and Pharmacological Screening of Sterculiaceae Species and Isolation of Anti-bacterial Compounds. *Journal of Ethnopharmacology* **97(2):** 285 - 291.

Truiti, M.C.T., Ferreira, I.C.P., Zamuner, M.L.M., Nakamura, C.V., Sarragiotto, M.H. and Souza, M.C. 2005. Antiprotozoal and Molluscicidal Activities of Five Brazilian Plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 1873 - 1878.

Ulfa, M. 2006. *Isolasi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Paliasa* (*Kleinhovia hospita* L.). Tesis tidak diterbitkan. Makassar: Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

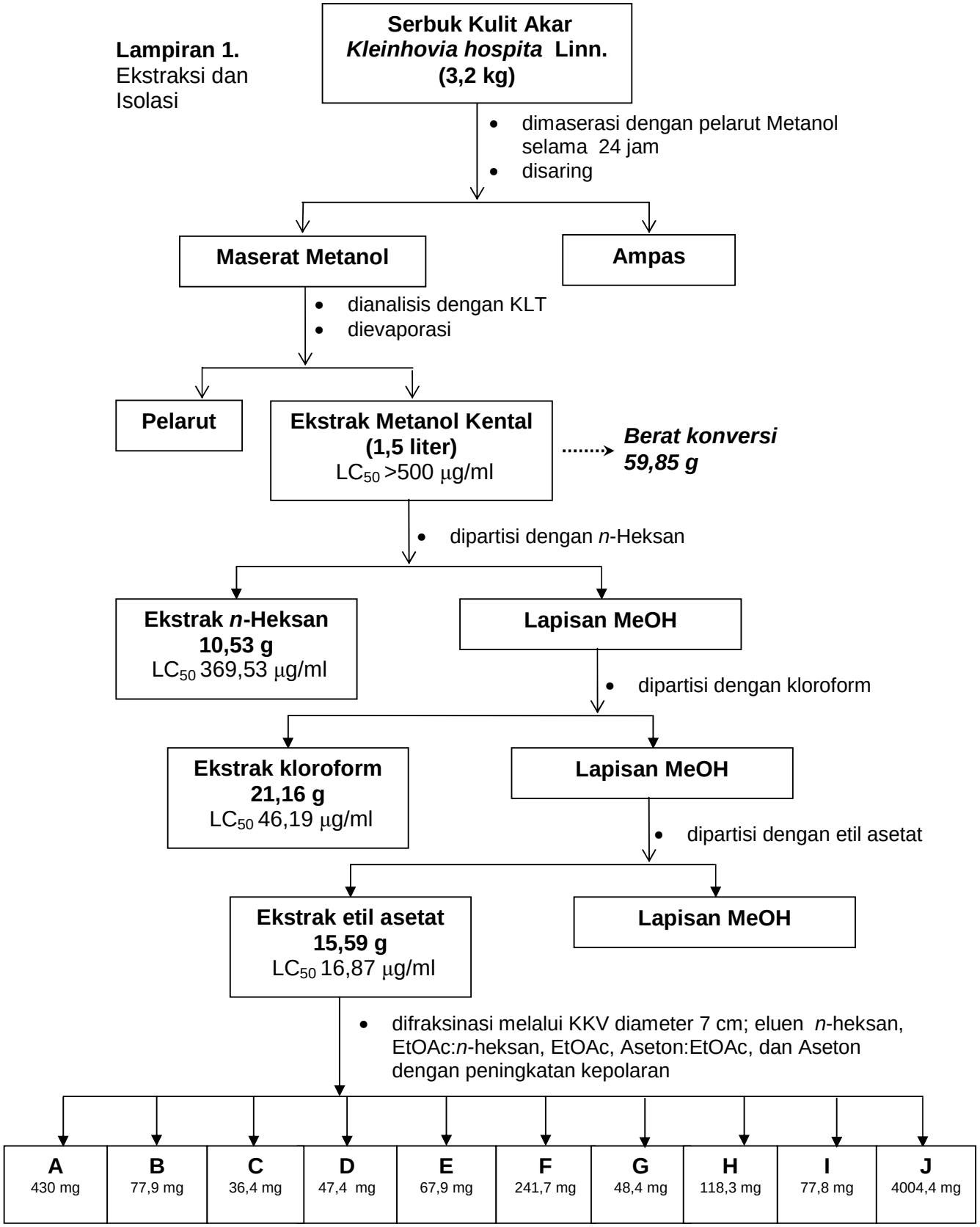
USDA-NRCS. 2000. *Classification for Kleinhovia hospita* Linn. (Online), (http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=KLHO, diakses 21 maret 2007).

Vardamides, J.C., Azebaze, A.G.B., Nkengfack, A.E., Van Heerden, F.R., Fomum, Z.T., Ngando, T.M., Conrad, J., Vogler, B. and Kraus, W. 2003. Scaphopetalone and Scaphopetalumate, A Lignan and A Triterpene Ester from *Scaphopetalum thonneri*. *Phytochemistry* **62(4):** 647 - 650.

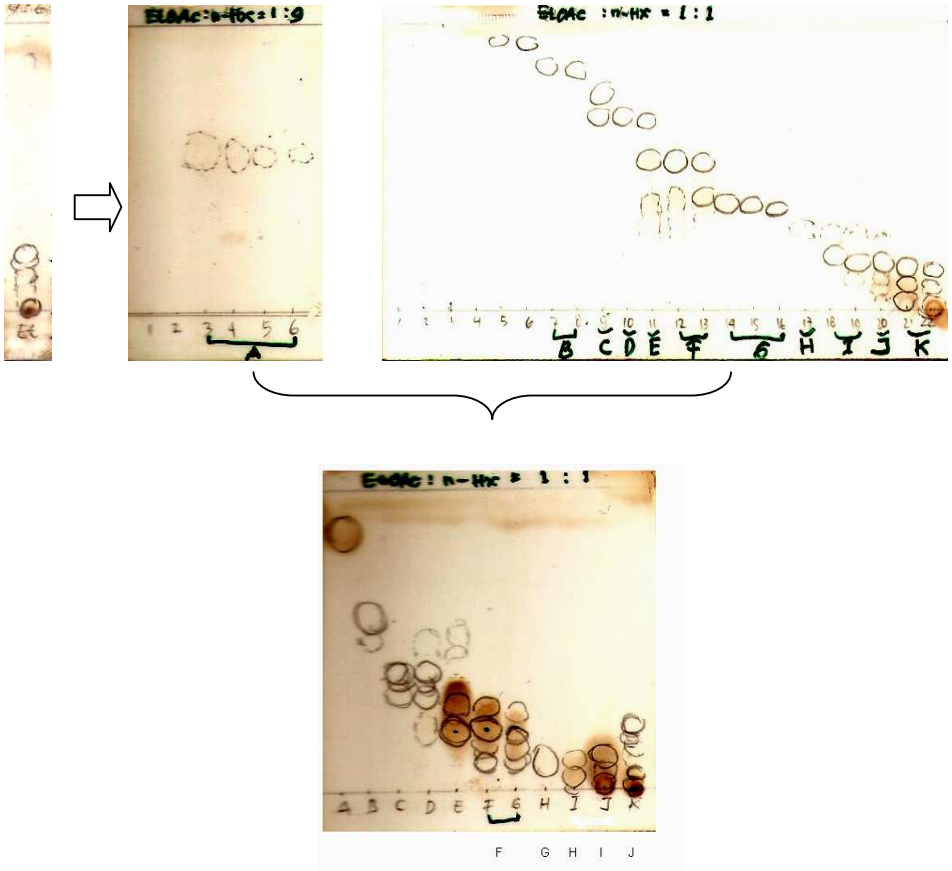
Wang, R.F., Yang, X.W., Ma, C.M., Shang, M.Y., Liang, J.Y., Wang, X., Cai, S.Q. and Shoyama, Y. 2003. Alkaloids from The Seeds of *Sterculia lychnophora* (Pangdahai). *Phytochemistry*, **63(4)**: 475 - 478.

Wiedemann, B., Lerche, H., Lotter, H., Neszmelyi, A., Wagner, H. and Müller, A. A. 1999. Two Novel Triterpenoids from The Stemwood of *Herrania cuatrecasana*. *Phytochemistry* **52(2):** 333 - 337.

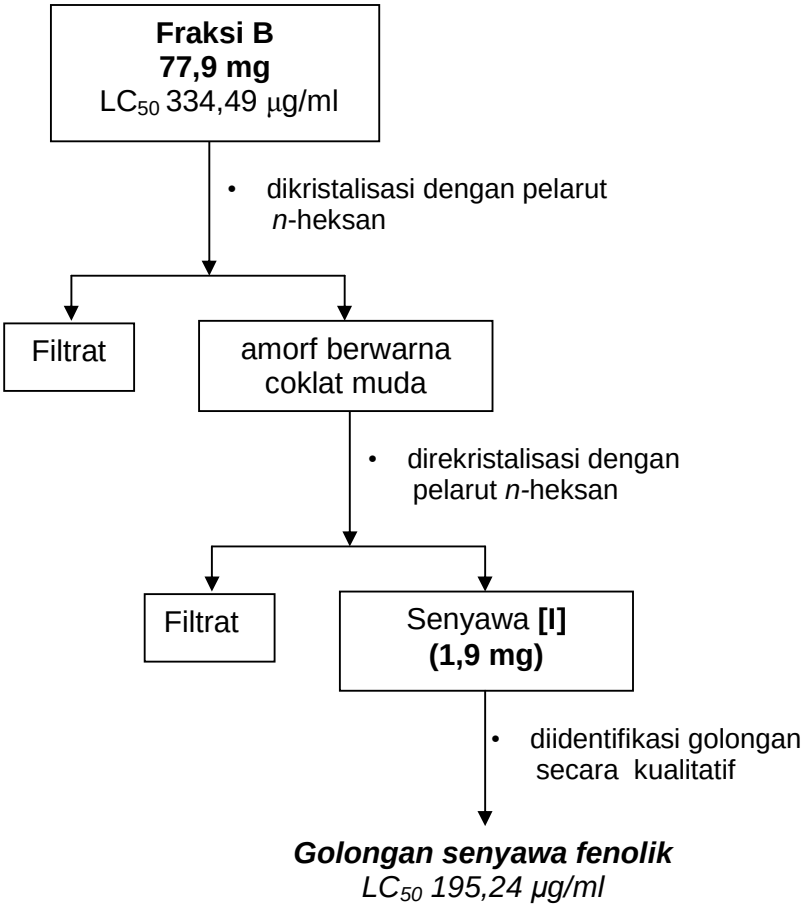
Lampiran 1.
Ekstraksi dan Isolasi



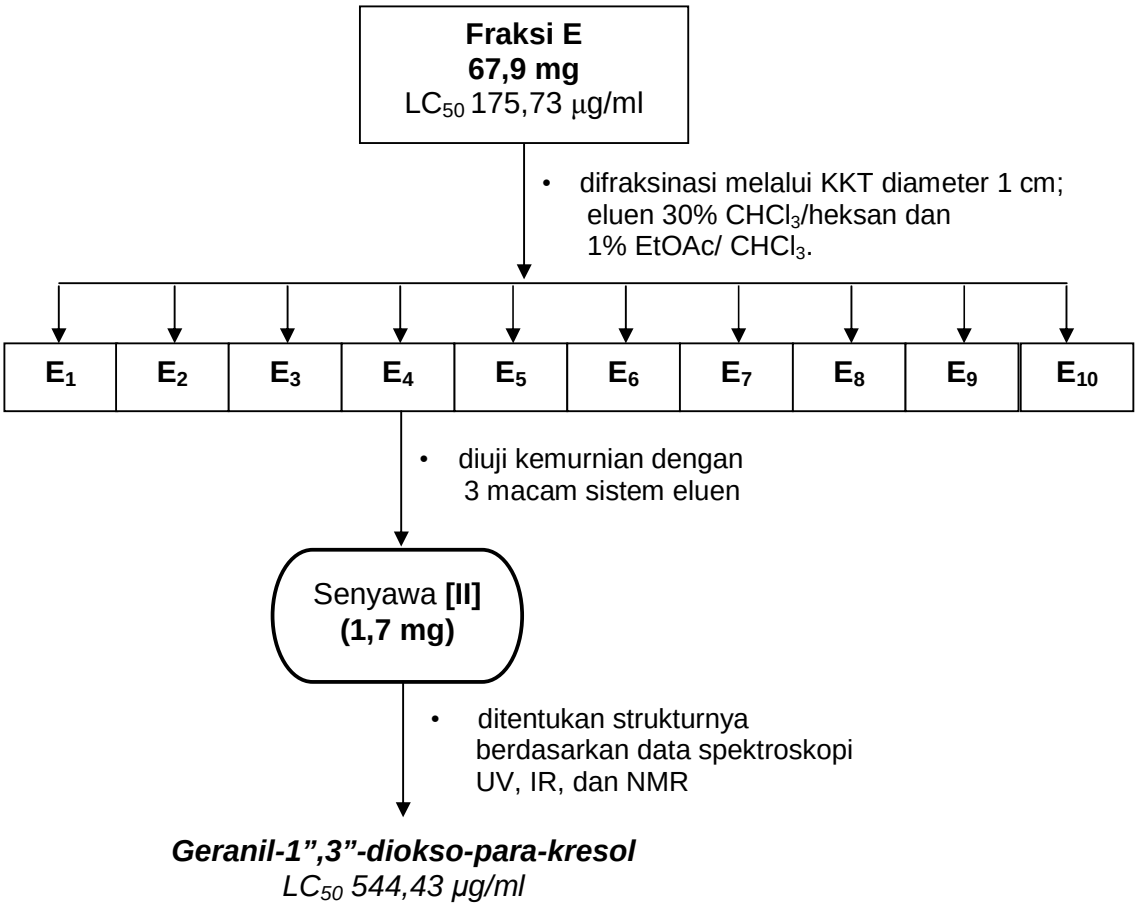
Lampiran 2. Kromatogram KLT hasil fraksinasi ekstrak etil asetat



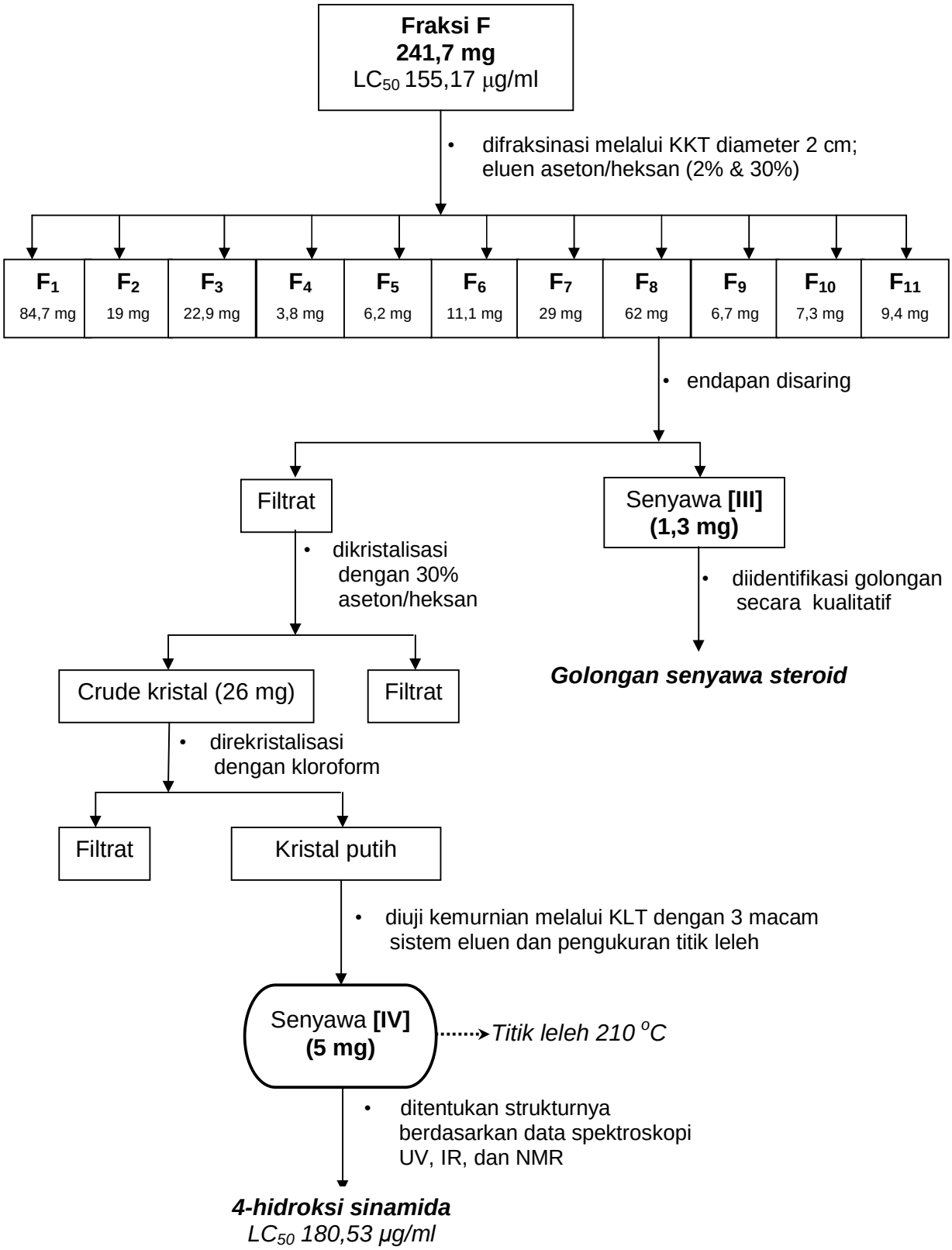
Lampiran 3. Bagan Isolasi senyawa dari Fraksi B



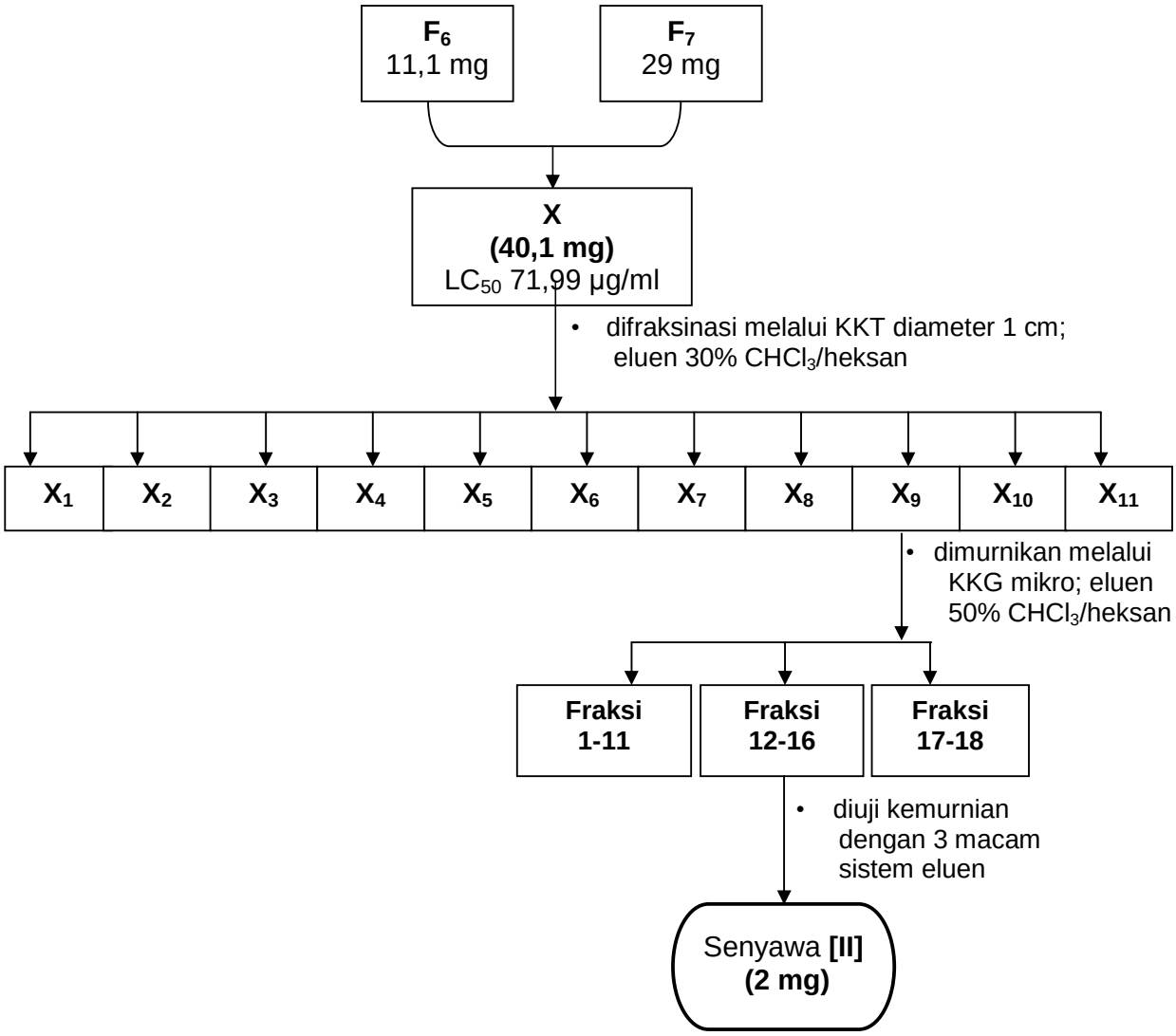
Lampiran 4. Bagan Isolasi senyawa dari Fraksi E



Lampiran 5. Bagan Isolasi senyawa dari Fraksi F

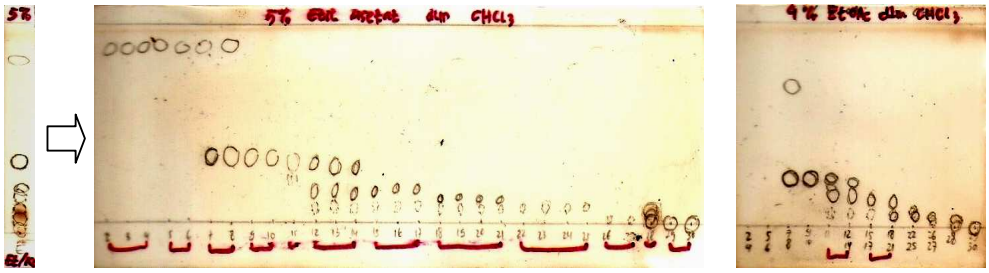


Lampiran 6. Bagan Isolasi senyawa dari Fraksi Gabungan F_6-F_7

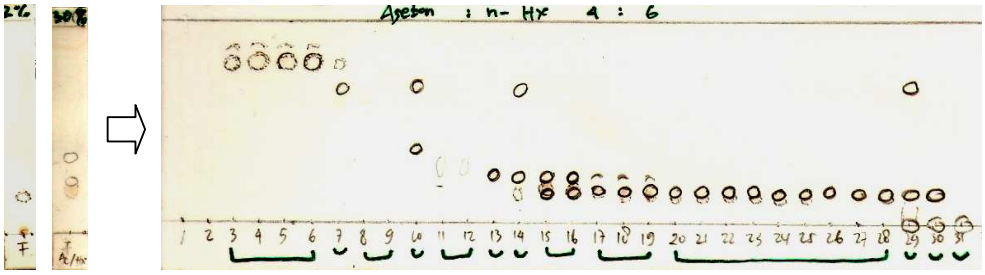


Lampiran 7. Kromatogram KLT hasil fraksinasi fraksi E, F, dan X

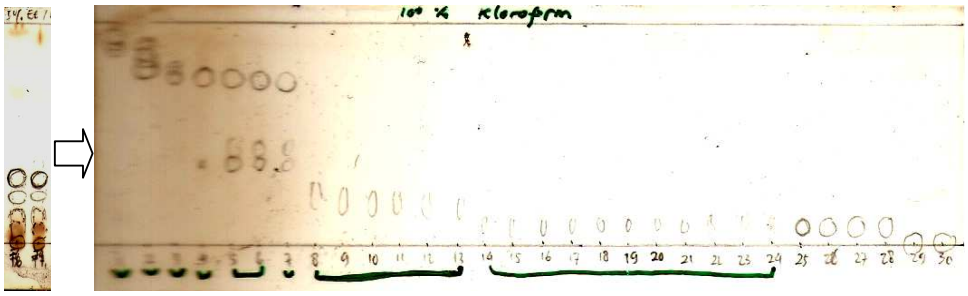
a). Fraksi E



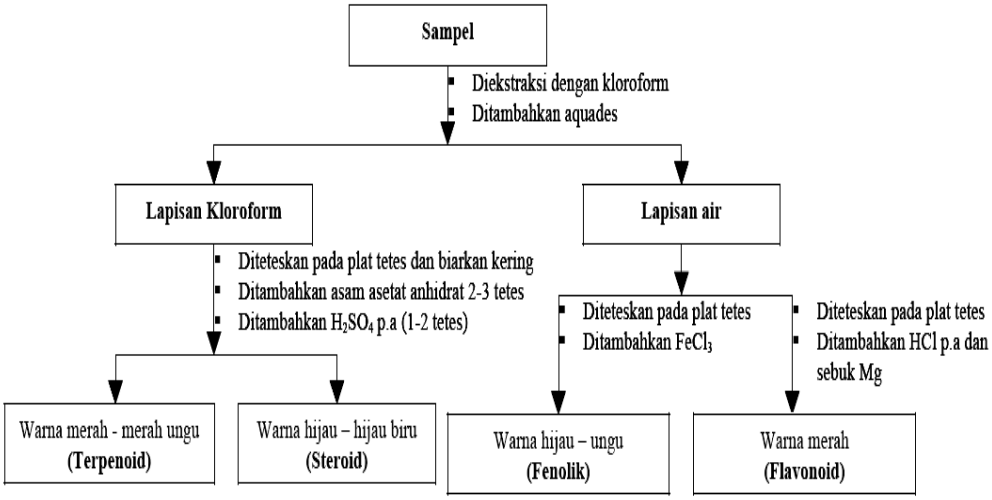
b). Fraksi F



c). Fraksi X



Lampiran 8. Prosedur identifikasi golongan senyawa



Lampiran 9. Prosedur *Brine Shrimp Lethality Test* (Meyer *et al*., 1982)

Menyemai Benur (menetaskan telur udang)

1. NaCl laut ditimbang 3,8 gram, dilarutkan dalam 100 µL akuades.
2. Larutan NaCl dituangkan dalam wadah penetasan, kemudian telur *A. salina* diletakkan pada sisi wadah yang tertutup sebagian. Wadah dijauhkan dari sinar matahari langsung.
3. Dibiarkan selama 2 x 24 jam sampai menetas menjadi benur (*nauplii*) yang siap digunakan.

Penyiapan Sampel

1. Sampel (ekstrak tumbuhan atau senyawa murni) ditimbang 1,0 mg dalam tabung Ependorf, dilarutkan dalam 100 µL DMSO.
2. Larutan sampel diencerkan dengan 150 µL akuades sehingga volum total menjadi 250 µL, diambil 200 µL lalu diencerkan dengan 600 µL akuades sehingga volume total menjadi 800 µL. Konsentrasi sampel menjadi;

$$\frac{200\mu L/250\mu L \times 1mg}{800\mu L} = \frac{0{,}8\mu g}{800\mu L} = 1\ \mu g/\mu L$$

3. Pengenceran dalam *microplate*. Pengukuran dilakukan triplo (tiga kali). Dalam *microplate* baris A dan B diisi sampel masing-masing 100 µL.
4. Baris B sampai G ditambahkan 100 µL akuades.
5. Dari baris B dipipet 100 µL, dimasukkan ke baris C, dan dari C dipipet 100 µL dimasukkan ke D dan seterusnya.

6. Terakhir dari G dipipet 100 µL dan dimasukkan ke H (- akuades)

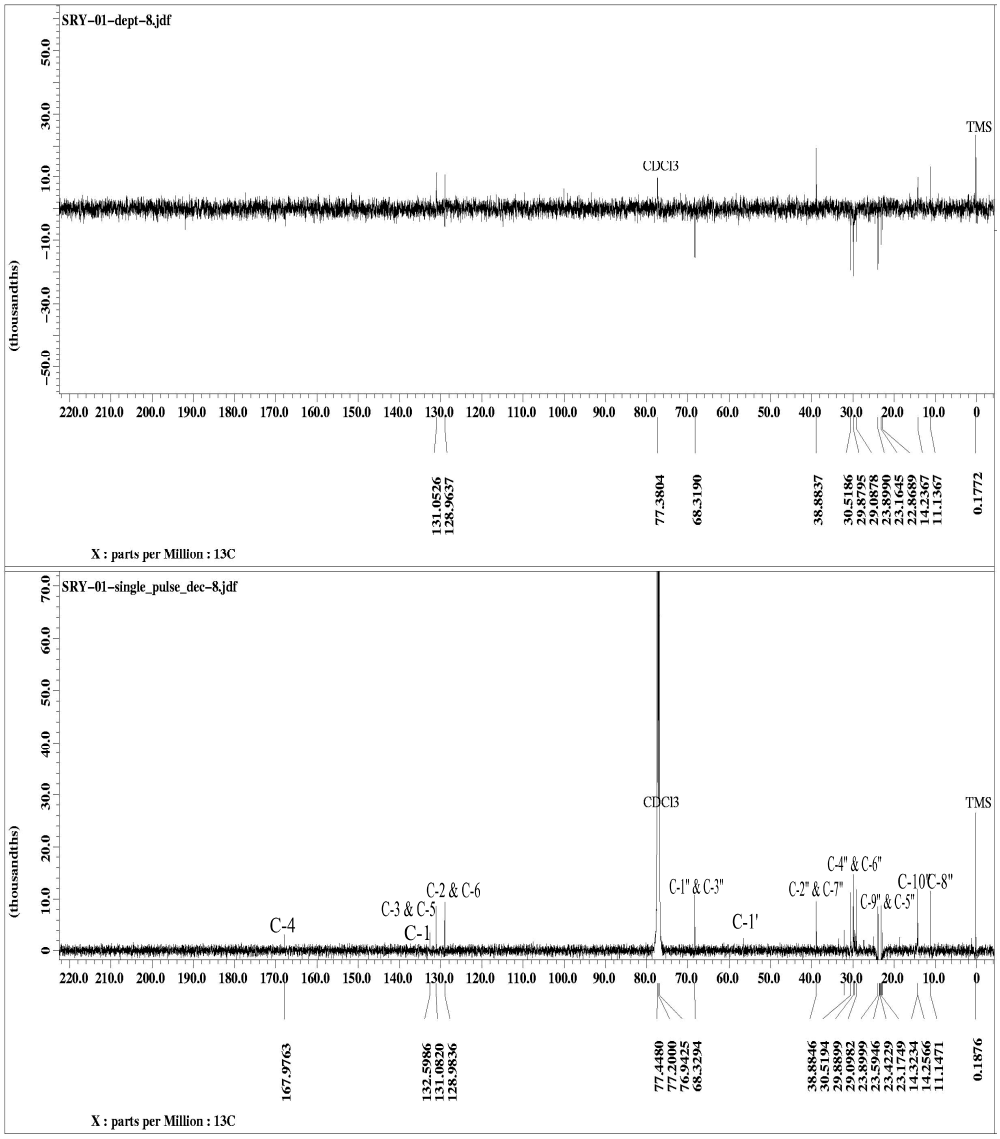
Catatan :

- kolom H tidak digunakan dalam pengukuran
- untuk blanko pekerjaan yang dilakukan sama tanpa menggunakan sampel

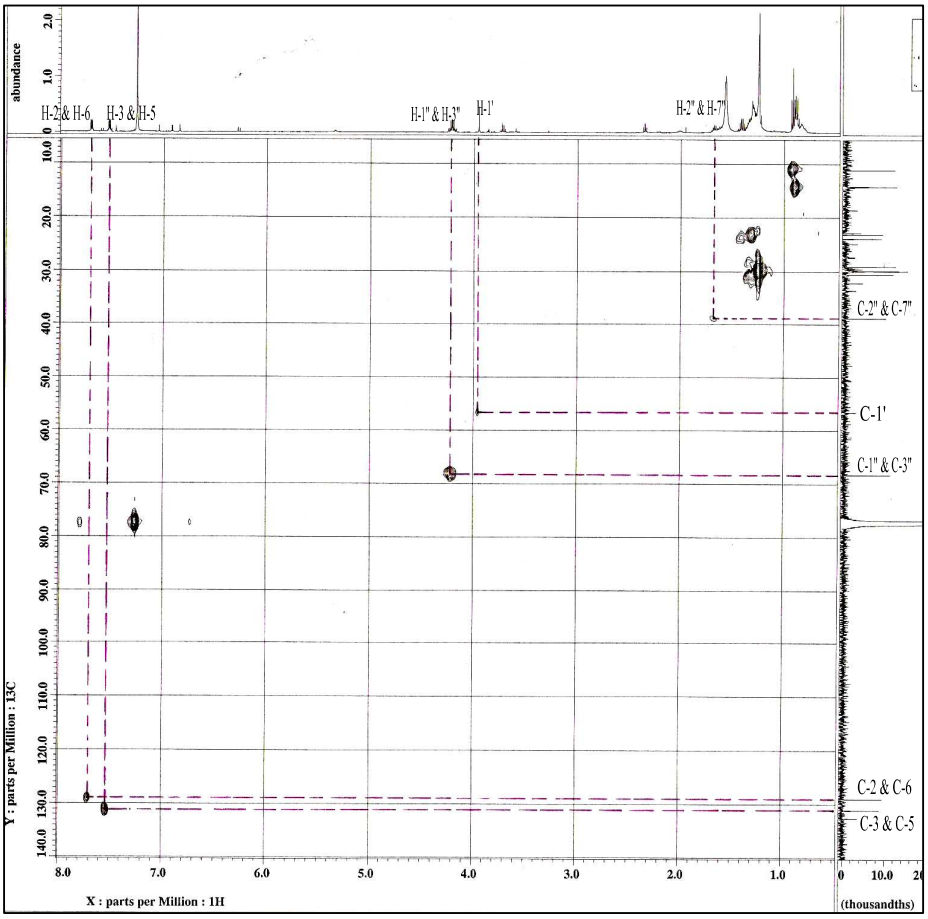
Memasukkan Benur Udang

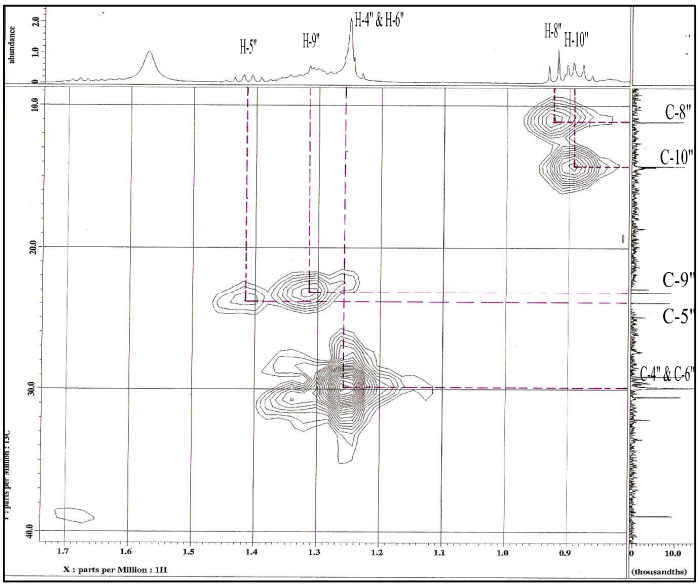
1. Media udang yang sudah menetas (berisi sekitar 7-15 ekor) dipipet 100 µL. dimasukkan masing-masing ke dalam lubang baris A-G pada mikropipet yang telah diisi sampel melalui pengenceran pada B, kemudian diinkubasikan selama 24 jam.
2. Setelah 24 jam, dihitung jumlah udang yang mati dan hidup pada tiap lubang dalam *microplate*. Data yang diperoleh dicatat pada lembar pengamatan.
3. Data yang tercatat dimasukkan ke dalam program *Bliss Method* untuk mencari LC_{50}.
4. Pengenceran tambahan mungkin diperlukan untuk bahan yang sangat aktif.

Lampiran 10. Spektrum DEPT senyawa **[II]**

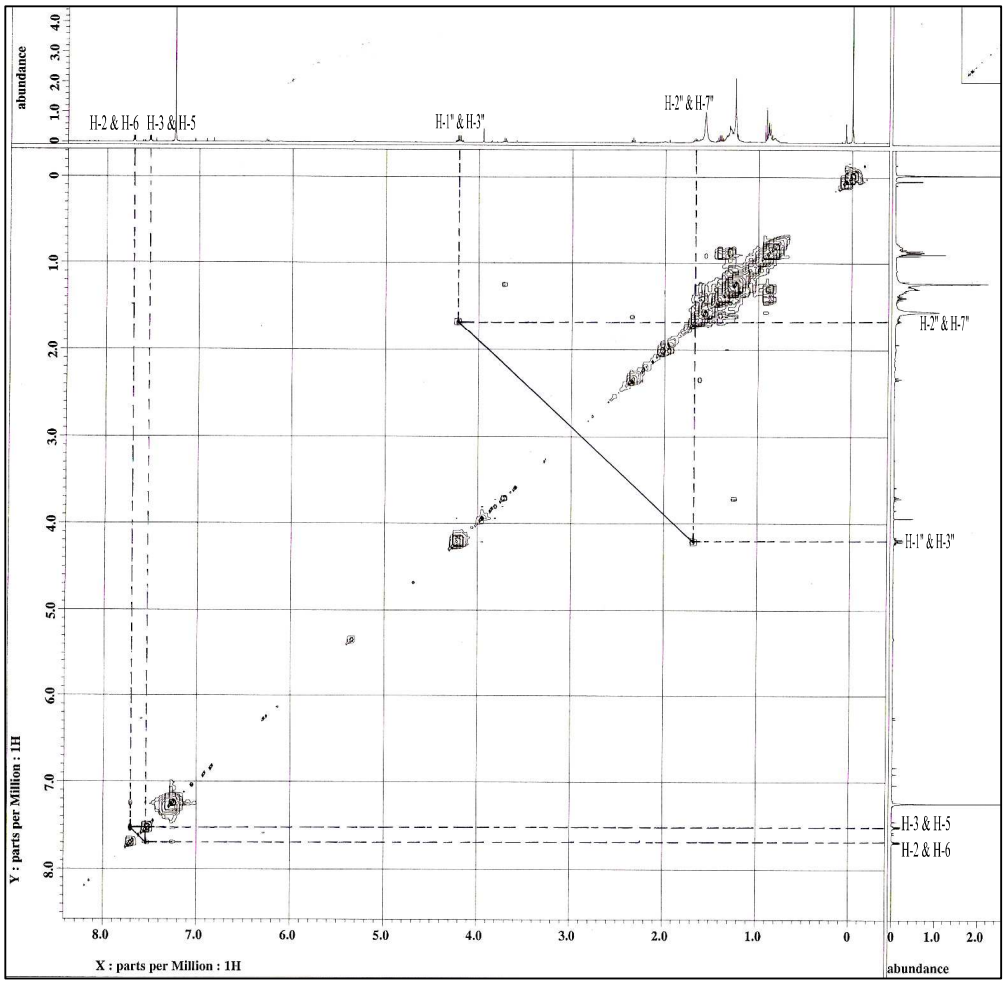


Lampiran 11. Spektrum HMQC senyawa **[II]**

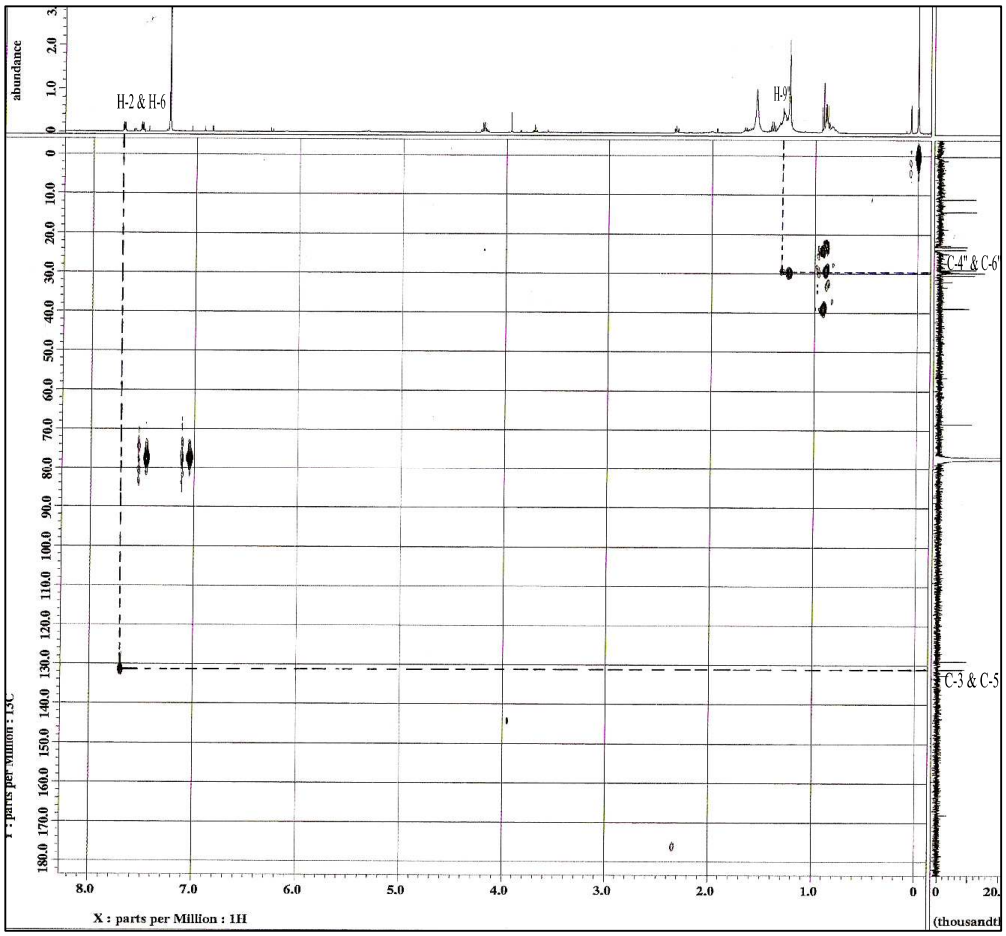


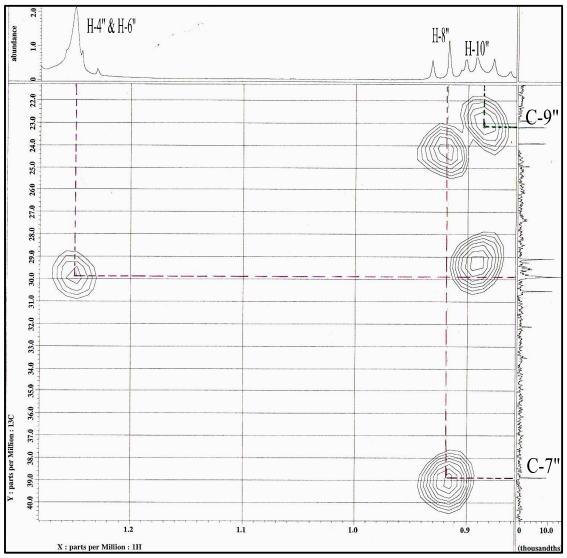


Lampiran 12. Spektrum COSY senyawa **[II]**

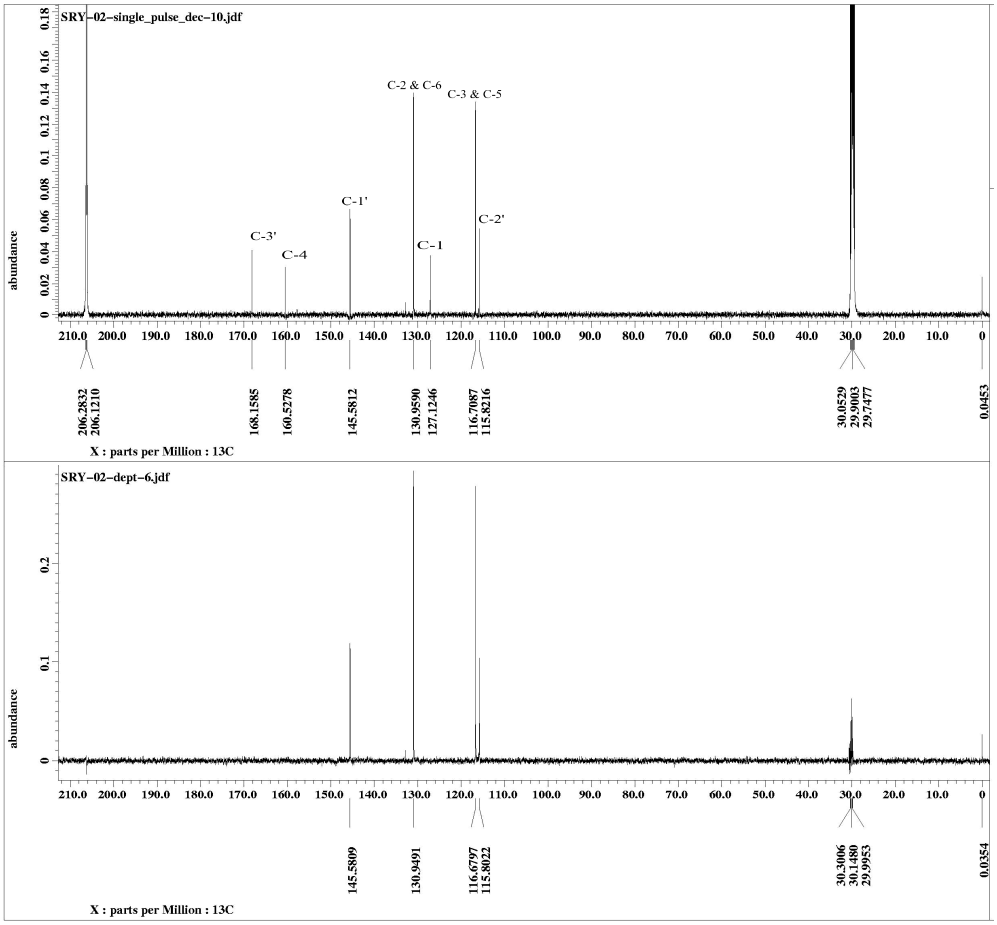


Lampiran 13. Spektrum HMBC senyawa **[II]**

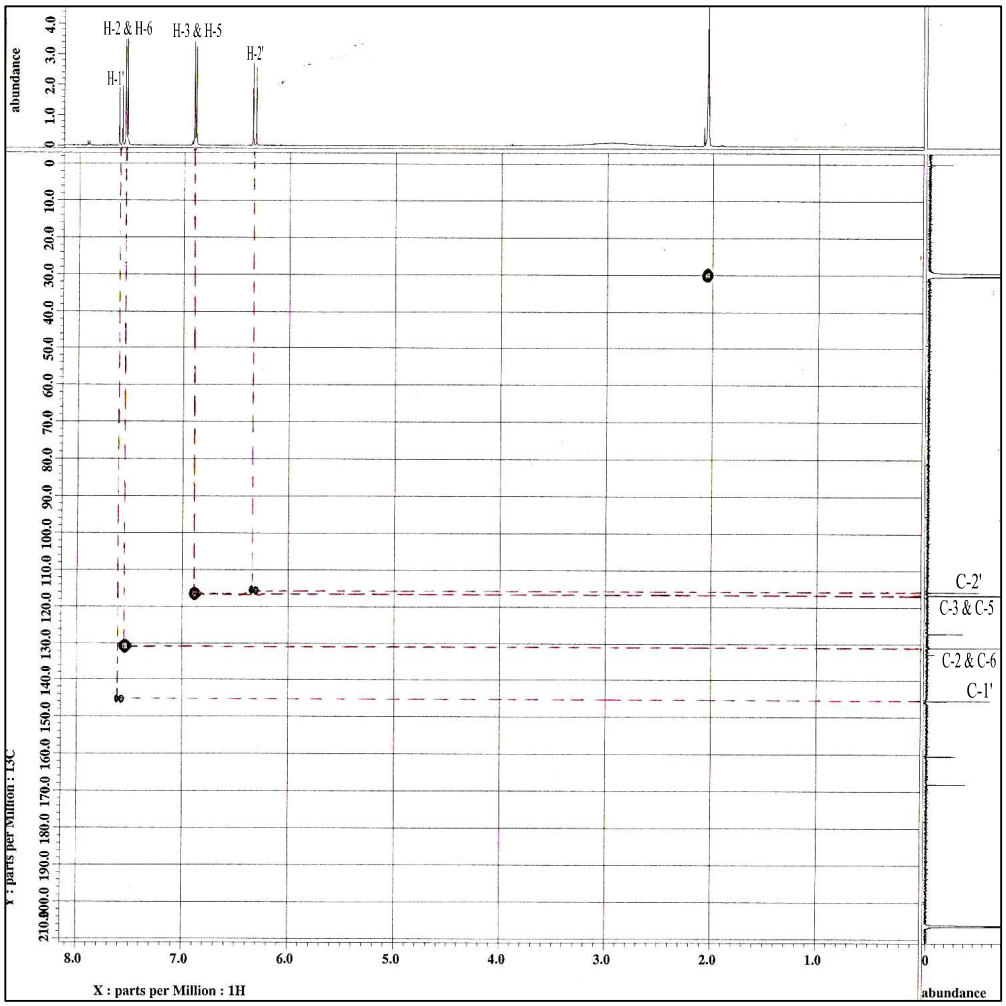




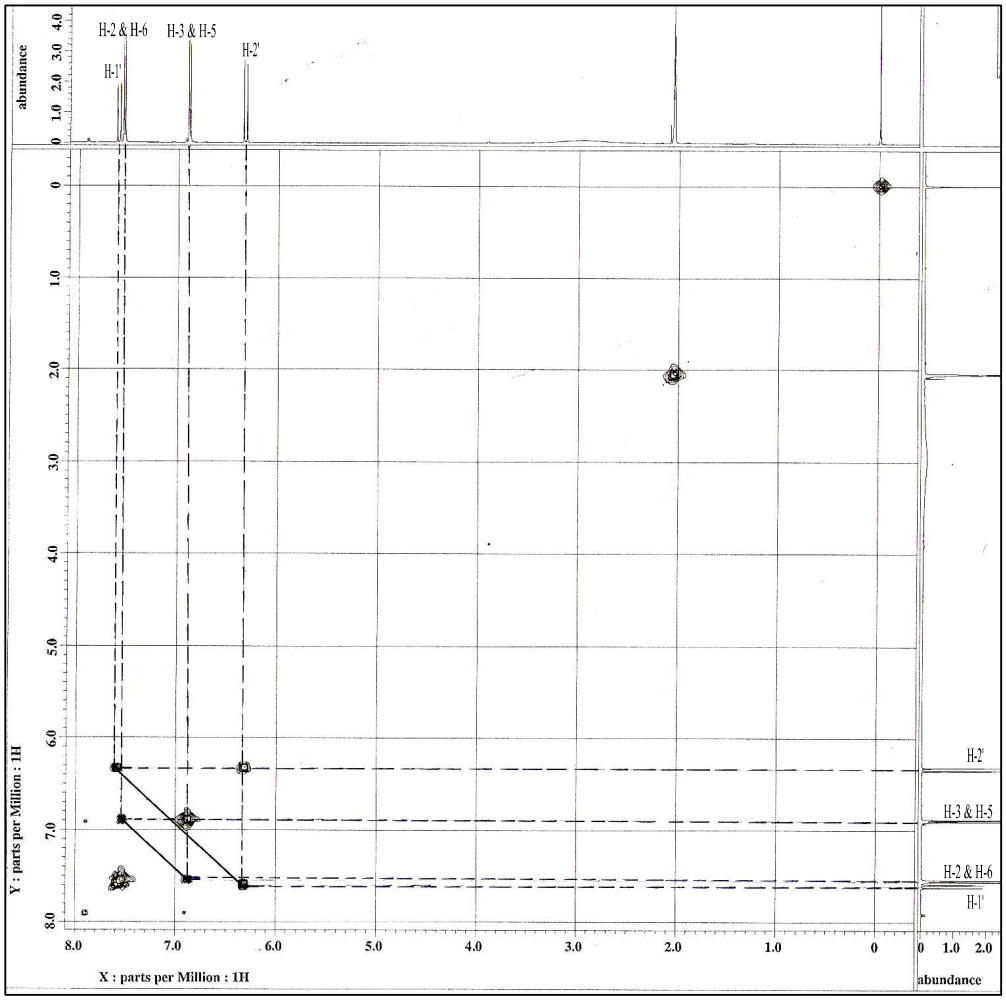
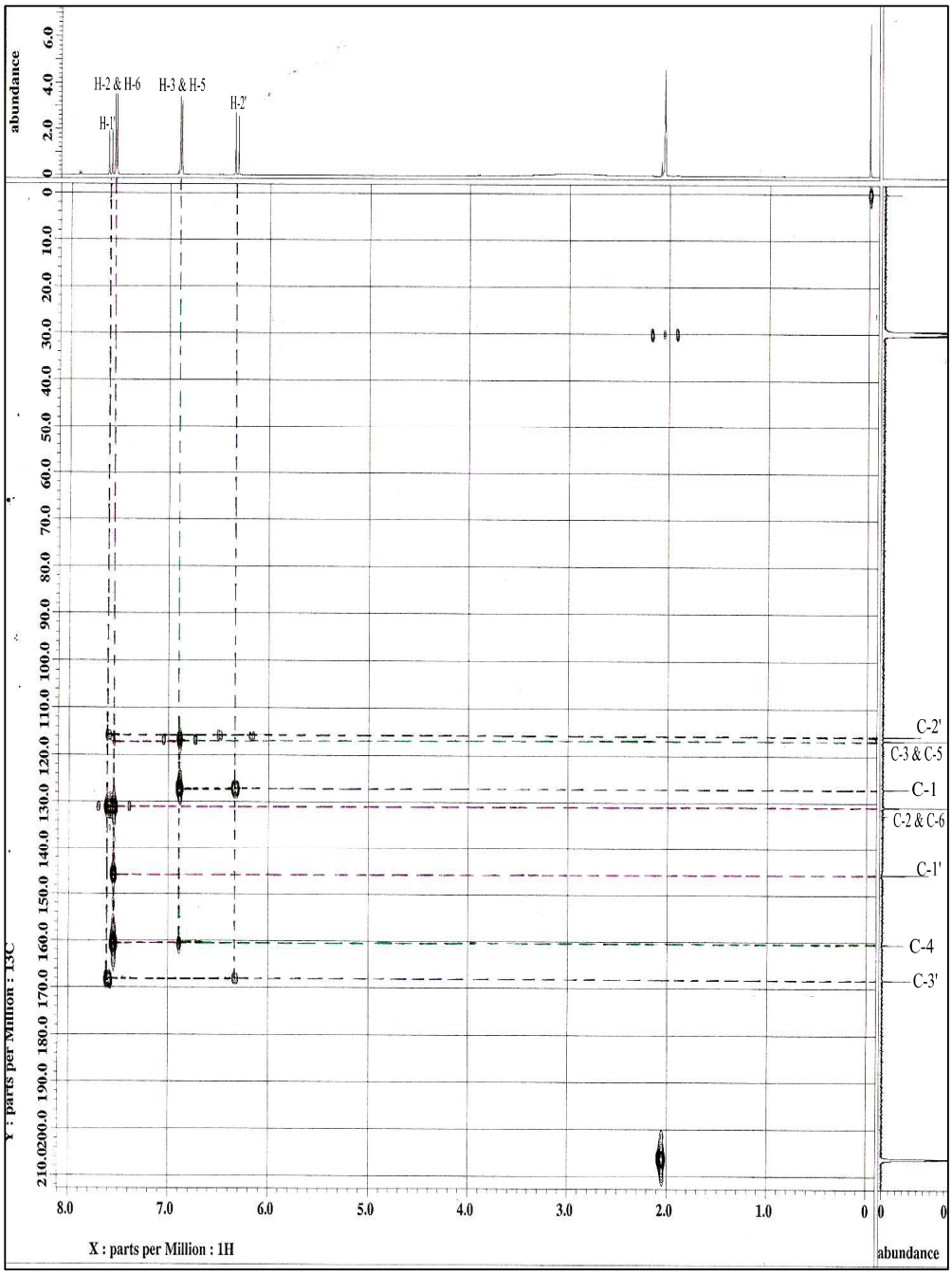
Lampiran 14. Spektrum DEPT senyawa **[IV]**



Lampiran 15. Spektrum HMQC senyawa **[IV]**



Lampiran 16. Spektrum COSY senyawa **[IV]**



Lampiran 17. Spektrum HMBC senyawa **[IV]**