

ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA FLAVONOID FRAKSI KLOOROFORM DARI DAUN TERAP (*ARTOCARPUS ODORATISSIMUS* BLANCO)

Nur Tasmin, Erwin, Irawan W. Kusuma

Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua Samarinda, 75123
nurtasmin_yunita@yahoo.co.id

ABSTRACT

The research about the characterization of flavonoid compound from the leaves of plants applicability chloroform (*artocarpus odoratissimus* Blanco). Extraction plants done by maceration method and separation of compounds was performed using the technique of vakum liquid chromatography and chromatography column flash. Separation result obtained yellowish-white powder. Resul spectrum UV-visible absorption obtained namely the 254.37 to 181.28 area absorbance wavelength (nm), while FT-IR analysis result provide absorption at wavenumber there is an alkyl group, a hydroxyl group, an aromatic group and C-O-C stretching based on the data spectrum UV an IR spektrum can be concluded that the compounds suspected isolated belonged to the Flanva-3-ol. Toxicity was conducted for prawn larvae *Artemia salina* Leach. Effect of toxicity from isolate identified with presentage of prawn larva and counted by probit analysis (LC_{50}). The results of this test showed that the the isolate was very toxic with LC_{50} value of 26,8824 ppm. The test result obtained mortality of shrimp larvae LC_{50} value of each sample is 110.5176 ppm total extract, chloroform fraction 147.7895 ppm, and isolate 80.2568 ppm.

Keywords : *Terap (Artocarpus odoratissimus Blanco), Isolation, Flavonoid, BSLT*

A. PENDAHULUAN

Bangsa Indonesia sudah mengenal dan memakai tumbuhan berkhasiat obat sebagai salah satu upaya penanggulangan masalah kesehatan yang dihadapi yang dikenal dengan pengobatan secara tradisional. Pengobatan secara tradisional sebagian besar ramuan berasal dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit, batang, kayu, daun, bunga atau biji. Pengobatan secara tradisional dapat dipertanggungjawabkan dengan melakukan penelitian ilmiah seperti penelitian di bidang farmakologi, toksikologi, identifikasi dan isolasi zat aktif yang terdapat dalam tumbuhan (Leny, 2006).

Salah satu famili tumbuhan di hutan tropis yang berpotensi sebagai sumber bahan kimia bioaktif dan jumlahnya relatif besar adalah Moraceae. Famili Moraceae adalah *Artocarpus* yang terdiri dari 50 spesies dan tersebar mulai dari Asia Selatan, Asia tenggara hingga kepulauan Solomon, kepulauan Pasifik, Australia Utara dan Amerika Tengah (Hakim, 2011). Di pulau Kalimantan terdapat 25 spesies, dimana 13 spesies di antaranya endemik, namun baru dua spesies yang dimanfaatkan yaitu : *Artocarpus heterophyllus* dan *A. integer* (Verheih dan Coronel 1992 dalam Hakim, 2011).

Berdasarkan studi literatur, diketahui bahwa sejumlah spesies *Artocarpus* banyak menghasilkan senyawa golongan terpenoid, flavonoid, dan stilbenoid. Keunikan struktur metabolit sekunder pada *Artocarpus* menghasilkan efek yang sangat luas, antara lain sebagai anti bakteri (Khan et al, 2003), anti platelet (Weng et al, 2006), anti fungal (Jayasinghe et al, 2004), antimalaria ,sitotoksik (Ko et al, 2005, Hakim et al, 2002, Syah et al, 2006) dan anti diabetes (Nasution, 2013).

Penelitian terdahulu, terhadap famili yang sama yakni bahwa pada kulit akar dan kayu *Artocarpus champeden* (cempedak) dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat telah ditemukan dua senyawa baru flavonoid yakni masing-masing senyawa Artoindonesianin A dan Artoindonesianin B. Penemuan ini mengindikasikan bahwa pada genus yang sama berpotensi sebagai sumber flavonoid atau senyawa metabolit sekunder lainnya.

Berdasarkan uraian diatas bahwa tumbuhan dengan famili yang sama cenderung mempunyai kemiripan senyawa yang dikandungnya atau secara umum mengandung konstituen karakteristik lain yang secara struktur terkait. Penyebaran flavonoid dalam tumbuhan ini ialah adanya kecenderungan yang kuat bahwa tumbuhan yang secara taksonomi berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang jenisnya serupa. Salah satu spesies *Artocarpus* yang belum diteliti kandungan kimianya secara lengkap adalah daun *Terap (Artocarpus odoratissimus Blanco)*.

Berdasarkan latar belakang di atas maka penelitian ini dilakukan karena daun *Terap (Artocarpus odoratissimus Blanco)* merupakan salah satu jenis famili *Artocarpus* yang kemungkinan mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yang dapat memberikan banyak manfaat bagi kesehatan masyarakat. Peneliti tertarik untuk mengisolasi senyawa flavonoid yang terdapat pada daun *Terap (Artocarpus odoratissimus Blanco)* asal Kalimantan pada fraksi kloroform karena belum pernah dilakukan riset sebelumnya.

B. METODOLOGI PENELITIAN

2.1. Ekstraksi sampel

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi, yaitu serbuk kering daun Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol dan disimpan di tempat terlindung dari cahaya matahari sambil sesekali dikocok. Maserasi dilakukan berkali – kali hingga diperoleh filtrat jernih. Hasil maserasi disaring dan dipekatkan dengan rotary evaporator. Ekstrak yang diperoleh disebut sebagai ekstrak kasar metanol .

Selanjutnya dilakukan proses fraksinasi terhadap ekstrak kasar metanol tersebut berdasarkan pada perbedaan kepolaran pelarut-pelarut organik. Fraksinasi untuk masing – masing fraksi dilakukan berulang kali hingga warna pelarut pada fraksi yang diinginkan bening. Fraksinasi dilakukan dengan corong pisah, dilakukan menggunakan pelarut n – Heksana terlebih dahulu, kemudian kloroform (Lopes et al, 2004). Hasil fraksinasi dari fraksi Kloroform yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator, kemudian dilakukan uji fitokimia pada fraksi untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi kloroform .

2.2. Uji fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak kasar metanol Terap (*A. odoratissimus* Blanco) serta fraksi kloroform dan hasil dari uji kromatografi kolom Vakum cair dan kromatografi kolom flash. Masing – masing dilarutkan sesuai dengan pelarutnya.

2.3. Uji alkaloid (Uji Meyer dan Uji Dragendorff)

Ekstrak kasar metanol daun Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dan fraksi kloroform ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendorff (campuran $\text{Bi}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam asam nitrat dan larutan KI). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga sampai merah coklat dengan pereaksi Dragendorff (Robinson, 1995).

2.4. Uji terpenoid dan steroid (Uji Lieberman Buchard)

Ekstrak kasar metanol Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dan fraksi kloroform ditambahkan 3 tetes pereaksi Lieberman-Burchard (asam asetat glasial + H_2SO_4 pekat). Uji positif triterpenoid memberikan warna merah atau ungu dan uji positif steroid memberikan warna hijau atau biru (Harborne, 1987).

2.5. Uji fenolik

Ekstrak kasar metanol daun Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dan fraksi kloroform ditambahkan larutan besi(III) klorida (FeCl_3) 10% beberapa tetes, ekstrak positif mengandung fenolik apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam (Harborne, 1987).

2.6. Uji flavonoid

Ekstrak kasar metanol daun Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dan fraksi kloroform ditambahkan 2 mg serbuk Mg dan 3 tetes HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Harborne, 1987).

2.7. Uji saponin

Ekstrak kasar metanol daun Terap (*A. odoratissimus* Blanco) dan fraksi kloroform, dikocok kuat, jika timbul busa ditambahkan 1 tetes HCl pekat. Ekstrak positif mengandung saponin jika timbul busa dengan ketinggian 1-3 cm yang bertahan selama 15 menit (Harborne, 1987).

2.8. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder

Dari uji fitokimia yang dilakukan diketahui fraksi kloroform mengandung senyawa flavonoid. Kemudian fraksi kloroform dilakukan uji kromatografi Lapis Tipis (KLT) awal dengan eluen n-heksana dan etil asetat untuk mengetahui komposisi eluen yang akan digunakan pada kromatografi kolom vakum (KVC) dengan melihat hasil spot/noda yang ada.

2.8.1. Kromatografi Vakum Cair

Proses pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi vakum cair (KVC) dengan menggunakan silika gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase diam. Senyawa-senyawa yang ada dalam fraksi kloroform dilakukan pemisahan dengan menggunakan Kromatografi vakum cair (KVC) yang bertujuan untuk memisahkan golongan senyawa metabolit sekunder secara kasar dengan menggunakan silika gel sebagai adsorben dan berbagai perbandingan pelarut n-heksana dan etil asetat (elusi gradien) dan menggunakan pompa vakum untuk memudahkan penarikan eluen (Hostettmann et al .1995). Corong yang diletakkan diatas kolom KVC yang berdiameter 13 cm dan tinggi 24 cm diisi dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dengan ketinggian silika mencapai lebih kurang 4 cm.

Sebagai kolom digunakan corong Bucheer kaca masir, ke dalam corong Bucheer kaca masir dimasukkan silika gel 60 GF₂₅₄ yang dikemas dalam keadaan kering. Lalu di bagian atas ditutup dengan kertas saring. Alat vakum dihidupkan untuk memperoleh kerapatan yang maksimum. Sebelum dilakukan proses pemisahan dengan kolom kromatografi vakum, sampel diimprgnasi terlebih dahulu menggunakan silika gel dengan ukuran 50-100 mesh. Sebanyak 8.02 gram ekstrak kloroform diimprgnasi dengan silika gel sebanyak 81.12 gr kemudian digerus hingga homogen dan kering, sampel kemudian dimasukkan pada bagian atas kolom yang disebar secara merata, lalu diatasnya diletakkan kertas saring. Alat vakum dihidupkan kembali. Kemudian

sampel dielusi mulai dari kepolaran rendah lalu kepolaran ditingkatkan perlahan-lahan dan kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Hostettmann et al. 1995).

Tabel 1. Komposisi eluen n-heksana: etil asetat

No	Variasi pelarut Pelarut	Perbandingan Volume pelarut	
1.	n-heksana	100 %	200 mL
2.	n-heksana: Etil asetat	9:1	200 mL
3.	n-heksana: Etil asetat	8:2	200 mL
4.	n-heksana: Etil asetat	7:3	200 mL
5.	n-heksana: Etil asetat	6:4	200 mL
6.	n-heksana: Etil asetat	5:5	200 mL
7.	n-heksana: Etil asetat	4:6	200 mL
8.	n-heksana: Etil asetat	3:7	200 mL
9.	n-heksana: Etil asetat	2:8	200 mL
10.	Etil asetat	100 %	200 mL

Hasil dari kromatografi vakum cair yang diperoleh sebanyak 25 botol, selanjutnya dimonitoring dengan KLT menggunakan eluen n- heksana:etil asetat (3:7), kemudian dilakukan fraksi gabungan terhadap Rf yang sama. Fraksi gabungan diperoleh 3 fraksi yaitu A,B, dan C. Fraksi B dilanjutkan ke kromatografi kolom flash.

2.8.2. Kromatografi kolom flash

Pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi B dilakukan kromatografi kolom flash dengan menggunakan silika gel G 60 (70-230 mesh) sebagai fase diam. Silika gel disuspensikan terlebih dahulu dengan n-heksana dimasukkan ke dalam kolom yang dasarnya telah diberi kapas. Pengisian kolom dilakukan dengan sistem pengisapan dari puncak kolom oleh pompa dengan tekanan yang kecil (< 2 psi), agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Kemudian dibiarkan satu malam. Sebelum dilakukan proses pemisahan dengan kromatografi kolom flash, sampel diimpregnasi terlebih dahulu menggunakan silika gel dengan ukuran 50-100 mesh dengan perbandingan sampel : silika = 1:2. Sebanyak 0.4 gr ekstrak etil asetat diimpregnasi dengan silika gel sebanyak 0.8 gr kemudian digerus hingga homogen dan kering. Sampel dimasukkan ke dalam kolom lalu dielusi menggunakan pelarut dengan kepolaran meningkat menggunakan sistem pengisapan (suction) untuk mempercepat proses elusi. Begitu sampel masuk ke dalam fase diam, fase gerak ditambahkan secara kontinyu sampai terjadi pemisahan. Eluat ditampung pada botol penampung fraksi setiap 5-10 mL, kemudian keseluruhan fraksi yang dihasilkan dilakukan KLT penggabungan (Istiyanti,2013).

Tabel 2. Komposisi eluen n-heksana : etil asetat dalam kolom flash

NO	Variasi Pelarut Pelarut	Perbandingan
1	n-heksana : Etil asetat	3:7
2	n -heksana : Etil asetat	2.5:7.5
3	n -heksana : Etil asetat	2:8
3	n -heksana : Etil asetat	1,5:8,5
4.	n -heksana : Etil asetat	1: 9
5	Etil asetat	100 %
6.	Metanol	100%

Fraksi hasil KLT penggabungan yang mempunyai pola pemisahan sama (harga Rf sama) digabungkan, kemudian diuapkan selama seminggu agar pekat dan masing-masing kelompok fraksi yang diperoleh diuji secara fitokimia (Asih, 2009).

2.9. Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan menggunakan berbagai campuran fase gerak, yaitu n -heksana, kloroform, etil asetat dan metanol. Jika isolat tetap menunjukkan noda tunggal pada plat kromatogram dengan fase gerak yang berbeda, menunjukkan isolat relatif murni secara KLT, bahwa isolat tersebut hanya mengandung satu jenis senyawa (Asih, 2009).

2.10. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Senyawa metabolit sekunder hasil isolasi (isolat murni) dikarakterisasi yang meliputi spektrum UV-Vis dengan spektroskopi UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dan menunjukkan gugus kromofor senyawa isolat murni serta spektrum FTIR dengan spektroskopi FTIR untuk mengetahui bilangan gelombang yang dapat menunjukkan gugus fungsi yang dimiliki senyawa isolat murni.

2.11. Uji Toksisitas Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Dalam persiapan larutan sampel 1 mg isolat dilarutkan dalam 100 µL air laut sambil diaduk sehingga konsentrasi menjadi larutan menjadi 1000 ppm. Larutan kontrol dibuat sama dengan prosedur diatas tanpa penggunaan sampel.

Penyemaian larva udang disemaikan dalam 100 mL air laut. Selanjutnya diberi pencahayaan TL agar menetas sempurna. Setelah 24 jam telur udang menetas dan siap untuk diujicobakan. Pengujian toksisitas, disiapkan 2 plat mikro standar masing-masing untuk plat uji dan plat kontrol. Pada baris 1 dan 2 masing-masing tiga kolom dimasukkan 100 µL larutan sampel pada plat uji dan 100 µL larutan

kontrol pada plat kontrol. Larutan baris 2 diencerkan dengan 100 μL akuades dan diaduk.

Kemudian dipipet kembali 100 μL dimasukkan kedalam baris 3 diencerkan kembali 100 μL akuades sambil diaduk dan seterusnya dengan cara yang sama sampai baris terakhir. Sehingga konsentrasi larutan untuk masing-masing baris sebagai berikut, baris 1 = 1000 ppm, baris 2 = 500 ppm, baris 3 = 250 ppm, baris 4 = 125 ppm, baris 5 = 62,5 ppm, baris 6 = 32,25 ppm, baris 7 = 15,6 ppm, baris 8 = 7,8 ppm. Selanjutnya ke dalam larutan sampel pada plat uji dan larutan kontrol pada plat kontrol ditambahkan 100 μL air laut yang mengandung 10 larva udang, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Sampel yang sukar larut dapat ditambahkan DMSO 1% sebanyak 1-3 tetes. Dihitung jumlah rata-rata larva udang yang mati dan hidup untuk setiap baris dari plat uji.

2.12. Teknik Analisa Data

Nilai LC50 (Lethal Concentration 50%) yaitu nilai yang menunjukkan zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian larva udang sampai 50%, selama 24 jam (LC50 dalam unit waktu) ditentukan dengan menggunakan program Analisis Probit SAS.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Ekstraksi, pemisahan dan Pemurnian

Serbuk daun Terap sebanyak ± 3 kg dimaserasi dengan metanol selama 3x24 jam pada suhu kamar (25°C) diperoleh sebanyak 40.19 gr. Metode maserasi dipilih sebagai cara ekstraksi dikarenakan proses yang mudah dan sederhana. Prinsip metode ini didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur, seperti benzen, karbon tetraklorida atau kloroform.

Setelah disaring, residu yang diperoleh dapat diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut yang sama. Metanol digunakan sebagai pelarut awal karena metanol merupakan salah satu pelarut yang dapat melisiskan membran sel pada tanaman dan memiliki struktur molekul yang kecil sehingga mampu menembus jaringan tumbuhan untuk menarik senyawa aktif keluar. Pada proses maserasi, metanol akan masuk ke rongga sel menembus dinding sel daun Terap melarutkan zat aktif yang ada dalam sel sehingga konsentrasi yang tinggi terbentuk di bagian dalam daun Terap. Karena perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel menyebabkan terjadinya difusi zat aktif yang ada dalam sel akan keluar sel. Demikian seterusnya sampai terjadi kesetimbangan konsentrasi antara larutan disebelah dalam dan disebelah luar sel.

Hasil maserat yang diperoleh dilakukan *rotary evaporator* dengan hasil warna ekstrak hijau pekat dan kental. *Rotary evaporator* mempermudah proses penguapan pelarut dengan memperkecil tekanan dengan vakum sehingga saat temperatur berada di bawah titik didih pelarut maka pelarut dapat menguap.

Rotary evaporator lebih sering digunakan karena mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi (Robinson, 1995). Ekstrak kasar metanol ini dilanjutkan pemisahan berdasarkan kepolarannya dengan cara fraksinasi, mulai dari fraksinasi *n*-heksana sampai fraksinasi kloroform dengan diperoleh 8.12 gram. Evaporasi dilakukan pada suhu 35-40°C untuk menghindari kerusakan senyawa metabolit sekunder yang mudah rusak pada suhu tinggi (Robinson, 1995).

Pada tahap awal sebelum kromatografi Vakum cair (KVC) dilakukan uji fitokimia pada masing-masing fraksi yaitu fraksi metanol dan fraksi kloroform untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel dimana hasilnya pada fraksi metanol menunjukkan positif adanya senyawa steroid (asam asetat glasial + H₂SO₄ pekat) dan flavonoid (serbuk Mg dan HCl) yang menunjukkan warna hijau, hal ini mengindikasikan bahwa sampel mengandung senyawa steroid dan flavonoid.

Tabel 3. Hasil Analisa Skrining Fitokimia dari daun Terap (*Artocarpus odoratissimus* Blanco)

GolonganSenyawa Ekstrak metanol Fraksi kloroform		
Triterpenoid	-	-
Steroid	+	+
Saponin	-	-
Fenolik	-	-
Flavonoid	+	+
Alkaloid	-	-

Keterangan : (+) :terdapat metabolit sekunder

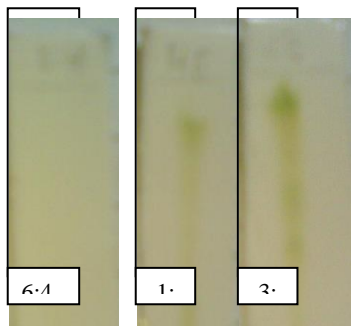
(-) : tidak terdapat metabolit sekunder

Senyawa flavonoid yang berhasil ditemukan dari genus *Artocarpus* adalah flavan-3-ol yang merupakan salah satu turunan flavonoid. Berdasarkan literatur tumbuhan genus *Artocarpus* yang mengandung senyawa flavan-3-ol yakni katecin dari kulit akar *A. reticulates* (Udjiana,1997) dan dari kulit batang *A.integra* yakni afzelecin ramnoside.

Keberadaan senyawa flavonoid dalam daun tumbuhan *A. odoratissimus* B.ini kemungkinan memiliki kesamaan senyawa dengan tumbuhan satu genus seperti *A.Champeden* (cempedak) dalam ekstrak metanol telah ditemukan dua senyawa baru flavonoid *Artoindonesianin A* dan *Artoindonesianin B*. Berdasarkan literatur tumbuhan yang berada

dalam satu family atau satu genus akan ada hubungan senyawa kimia baik dalam bentuk rangka yang sama, ataupun dalam bentuk keseluruhan yang sama, atau senyawa yang satu bersamaan namun mempunyai tingkat oksidasi kimia yang lebih tinggi.

Oleh karena itu, untuk memastikan bahwa dalam sampel daun Terap (*Artocarpus odoratissimus* Blanco) terdapat turunan senyawa flavonoid, maka dilanjutkan tahap pemisahan dan pemurnian dengan melalui tahap kromatografi kolom Vakum Cair (KVC) dan kromatografi Kolom flash. Namun sebelum dilanjutkan ketahap kolom, maka dilakukan uji KLT awal untuk mengetahui perbandingan eluen yang memberikan pemisahan yang baik, dengan menggunakan pelarut etil asetat dan *n*-heksana, dimana pada eluen ini memberikan noda paling banyak pada eluen *n*-heksana-etil asetat 3:7. Perbandingan eluen yang memberikan pemisahan pola noda yang lebih baik digunakan untuk monitoring KLT vial-vial hasil elusi dalam kolom vakum dan kolom flash. Pemisahan ini didasarkan pada sifat polaritas senyawa. Senyawa yang memiliki polaritas hampir sama dengan fasa geraknya akan terelusi lebih dahulu dibandingkan dengan senyawa yang memiliki sifat polaritas yang berbeda dengan fasa geraknya.



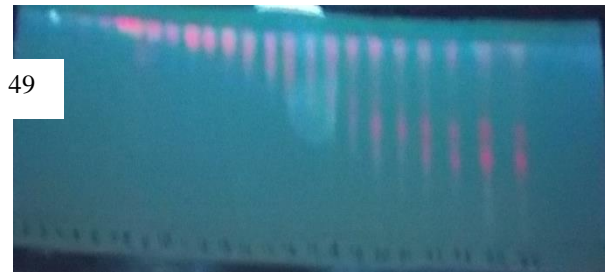
Gambar 2. Hasil uji KLT awal

Fraksi-fraksi tersebut kemudian dikromatografi kolom Vakum Cair dengan eluen senyawa flavonoid yang ada di dalam ekstrak KLT senyawa yang murni. Metode elusi yang digunakan adalah metode Step Gradient Polarity (SGP) dengan cara meningkatkan kepolaran eluen secara bertahap dari nonpolar sampai ke polar. Metode ini dipilih karena tidak ditemukan perbandingan eluen yang mampu memisahkan dengan baik senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi Kloroform.

Pada tahap kolom dilakukan perlakuan impregnasi ditujukan untuk memperluas permukaan silika gel sebagai fasa diam sehingga sampel yang akan dielusi dapat tersebar dengan homogen. Ukuran partikel silika impregnasi harus lebih besar untuk memudahkan proses elusi.

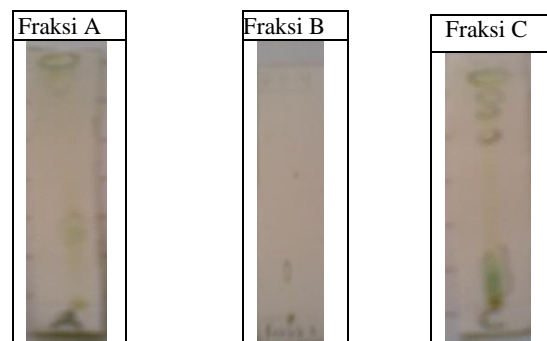
Hasil pemisahan kolom vakum yang di tampung sebanyak 25 botol, kemudian dimonitor dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (3:7).

Penampakan hasil uji KLT 25 botol di bawah lampu UV $\lambda = 366$ nm.



Gambar 2. Hasil kromatogram Fraksi gabungan KVC (Kromatografi Vakum Cair)

Hasil kromatogram diatas fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama dikelompokkan menjadi satu fraksi, sehingga dihasilkan 3 fraksi gabungan yaitu fraksi A (1-18), B (19-21) dan C (22-25). Masing-masing fraksi gabungan dipekatkan dengan rotary evaporator kemudian di monitoring dengan KLT dengan dibawah eluen *n*-Heksana: etil asetat (3:7). seperti yang disajikan:



Gambar 3. Hasil Uji KLT fraksi gabungan

Tabel 4. Fraksi gabungan berdasarkan R_f yang sama

Fraksi Gabungan.	No Vial	Massa sampel	Jumlah Noda
A	(1-18)	0.62 gr	4 Noda
B	(19-21)	0.42 gr	2 Noda
C	(22-25)	0.38 gr	5 Noda

Berdasarkan hasil KLT fraksi gabungan yang diperoleh, fraksi B sebanyak 0.42 gr dilanjutkan tahap kromatografi kolom flash karena pada fraksi ini menunjukkan noda yang paling sedikit, noda yang dihasilkan pada plat KLT preparatif menghasilkan 2

noda pada saat disinari lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dengan warna noda warna merah. Berdasarkan pustaka bahwa warna merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

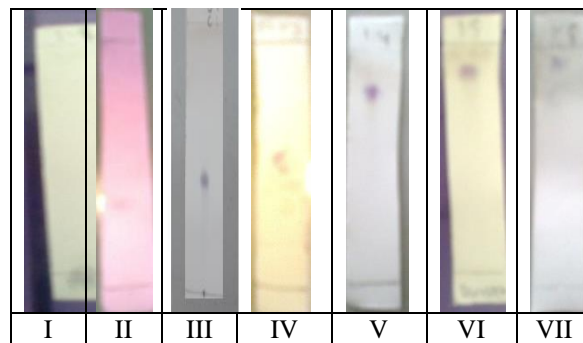
Kemudian dilakukan tahap kromatografi kolom flash dengan metode elusi gradient. Hasil kromatografi kolom flash di peroleh 123 vial. Vial-vial tersebut dimonitoring dengan KLT dengan menggunakan eluen *n*-heksana dan etil asetat (3:7) dan diamati dengan lampu UV $\lambda = 366$ nm. Vial-vial yang mempunyai Rf yang sama digabung dalam satu fraksi. Pemisahan ini menghasilkan 5 fraksi yaitu B₁, B₂, B₃, B₄ dan B₅.

Tabel 5. Fraksi gabungan Kromatografi kolom flash

Fraksi gabungan	No Vial	Massa sampel	Jumlah noda
B ₁	(1-7)	4.12 mg	2 noda (kristal)
B ₂	(8-28)	5.02 mg	2 noda
B ₃	(29-54)	2.01 mg	3 noda
B ₄	(55-96)	9.05 mg	3 noda
B ₅	(97-123)	10.02mg	3 noda

Selanjutnya pada tahap kolom flash diperoleh 5 fraksi gabungan, dimana faksi B₁ menghasilkan kristal warna kehijauan setelah pelarutnya teruapkan, namun kristal ini belum murni karena belum menunjukkan noda tunggal pada saat KLT dengan beberapa perbandingan eluen. Oleh karena itu dilakukan rekristalisasi untuk memurnikan kristal yang terbentuk. Proses rekristalisasi menggunakan pelarut etil-asetat dan metanol, karena pada pelarut ini melarutkan jumlah zat yang agak besar pada suhu tinggi, namun akan melarutkan dengan jumlah sedikit pada suhu rendah kemudian di diamkan dalam freezer untuk membiarkan zat tersebut mengkristal kembali atau terjadi endapan agar mudah dipisahkan, hasil rekristalisasi yang diperoleh berupa serbuk warna putih kekuningan, berdasarkan penelitian *Artocarpus champedon* yang berhasil diisolasi yaitu senyawa flavan-ol memiliki karakteristik yang sama berupa padatan berwarna putih kekuningan.

Oleh karena itu untuk lebih memperkuat dugaan bahwa isolat yang diperoleh relatif murni maka dilakukan KLT dengan berbagai perbandingan pelarut (eluen), komposisi eluen yang digunakan untuk uji kemurnian menggunakan KLT yaitu etil asetat : *n*-heksana (1:8), *n*-heksana:etil asetat (1:4), Kloroform (100 %), *n*-heksana : etil asetat (1:5), *n*-heksana: kloroform (1:3), kloroform: etil asetat (1:3), *n*-Heksana : etil asetat (6:4), dari semua perbandingan komposisi eluen yang digunakan menunjukkan satu noda tunggal.



Gambar 4. Kromatogram Isolat pada Uji KLT dari isolat Daun Terap

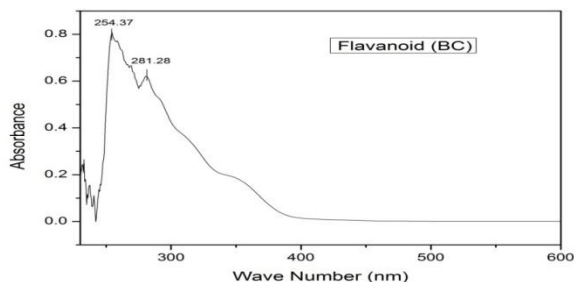
Selanjutnya di uji fitokimia terhadap senyawa hasil isolat dengan serbuk Mg dan HCl memperlihatkan warna kuning kehijauan. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi tersebut adalah senyawa golongan flavonoid.

Gambar 5. Hasil uji fitokimia Isolat



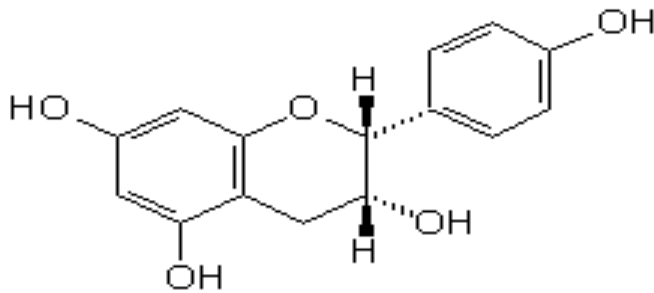
Karakterisasi Senyawa Flavonoid

Isolat dikarakterisasi menggunakan serapan spectrum UV-tampak dan spektroskopi infra merah (IR) dengan tujuan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum serta gugus fungsi yang terdapat dalam isolat. Spektrum UV-tampak dan infra merah yang diperoleh dapat dilihat pada gambar dibawah.



Gambar 6. Spektrum analisa spektrofotometer UV Vis senyawa flavonoid dari isolat daun Terap

Hasil spektrum UV menunjukkan dua serapan maksimum pada panjang gelombang 254,37 nm dan 281,26 nm yang merupakan serapan khas untuk kromofor flavan atau flavan-3-ol. Oleh karena itu untuk memperkuat dugaan bahwa isolat tersebut merupakan golongan flavan atau flavan-3-ol, hasil karakterisasi spektra dari IR dapat mendukung dari hasil serapan spektrofotometer UV-Vis.



Gambar 7. Spektrum analisa spektrofotometer Infra merah senyawa flavonoid dari isolat daun Terap

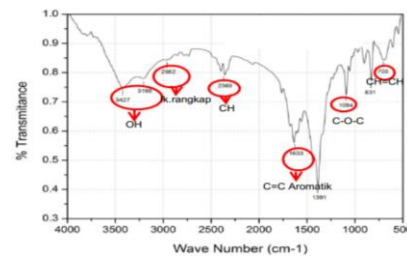
Sedangkan hasil karakterisasi analisa spektrum FT-IR senyawa hasil isolasi memberikan informasi adanya puncak serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3427 cm^{-1} . Gugus hidroksil ini merupakan regang -OH terikat (dapat berikatan hidrogen), OH terikat terlihat pada bilangan gelombang 3570-3200 cm^{-1} yang membentuk pita lebar dengan intensitas yang kuat (John coates,2000). Selain itu spektrum IR juga menunjukkan gugus alkil pada bilangan gelombang 1633 dan aromatik (C=C-H aromatik) pada panjang gelombang 2962, gugus aromatik ini diperkuat dengan munculnya ikatan rangkap pada bilangan gelombang 3198. Sedangkan pada serapan 1391 terdapat tarikan C-H₂ dan diperkuat dengan munculnya serapan 703 CH=CH dan pada serapan 1094 adanya gugus ulur C-O-C (John coates, 2000).

Sedangkan hasil karakterisasi analisa spektrum FT-IR senyawa hasil isolasi memberikan informasi adanya puncak serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3427 cm^{-1} . Gugus hidroksil ini merupakan regang -OH terikat (dapat berikatan hidrogen), OH terikat terlihat pada bilangan gelombang 3570-3200 cm^{-1} yang membentuk pita lebar dengan intensitas yang kuat (John coates,2000). Selain itu spektrum IR juga menunjukkan gugus alkil pada bilangan gelombang 1633 dan aromatik (C=C-H aromatik) pada panjang gelombang 2962, gugus aromatik ini diperkuat dengan munculnya ikatan rangkap pada bilangan gelombang 3198. Sedangkan pada serapan 1391 terdapat tarikan C-H₂ dan diperkuat dengan munculnya serapan 703 CH=CH dan pada serapan 1094 adanya gugus ulur C-O-C (John coates, 2000).

Tabel 5. karakteristik gugus-gugus dari spektrum IR senyawa isolat daun Terap (*A.odoratissimus* Blanco).

Bilangan gelombang (cm^{-1})		Bentuk pita	Intensitas	Gugus Fungsi
Pada spectra	Pada pustaka			
3427	3570-3200	Melebar	Sedang	V OH (ikatan hydrogen antar molekul)
3198	3100-3200	Melebar	Sedang	Ikatan Rangkap alifatik
2962	2850-2950	Melebar	Lemah	Gugus Alkil
1633	1615-1640	Tajam	Sedang	Gugus aromatic (C=C)
1391	1440-1360	Tajam	Sedang	Tarikan C-H ₂
1094	1140-1070	Tajam	Sedang	γ C-O-C
831	860-800	Tajam	Sedang	C=C-H Gugus aromatik
703	1000-650	Melebar	Sedang	CH=CH

Jadi berdasarkan hasil karakteristik di atas, dapat diduga bahwa senyawa flavonoid yang diisolasi merupakan flavonoid golongan flavan-3-ol karena adanya gugus alkil, gugus hidroksil, gugus aromatik yang diperkuat dengan adanya ikatan rangkap dan ulur C-O-C yang terikat pada gugus bensen. Seperti pada gambar dibawah.



Gambar 8. Senyawa flavanoid

Uji toksisitas BSLT (*brine shrimp lethality test*)

Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach atau *Brine Lethality Shrimp Test* (BSLT) dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah pada uji sitotoksik. Korelasi antara uji toksisitas akut ini dengan uji sitotoksik adalah jika mortalitas terhadap *Artemia salina* Leach yang ditimbulkan memiliki harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Parameter yang ditunjukkan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi pada suatu senyawa pada *Artemia salina* Leach adalah kematiannya (Ghisalberti, 2008).

Telah ditemukan bahwa toksisitas metode BSLT merupakan prediksi sitotoksitas dan aktivitas pestisida. Secara khusus, korelasi positif ditemukan antara toksisitas BSLT dan sitotoksitas menuju garis 9 KB cell (karsinoma nasofaring manusia) dan tumor padat lainnya, serta untuk in sel P388 (in vivo murine leukemia) (Ghisalberti, 2008).

Tingkat toksisitas dari isolat yang diperoleh dapat diketahui dengan dilakukan uji toksisitas menggunakan *Artemia salina* (L), dalam pengamatan ini dilakukan berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50 % (LC_{50}) yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50%.

Apabila LC_{50} 30 ppm maka ekstrak sangat toksik dan berpotensi mengandung senyawa bioaktif antikanker. Tapi tidak spesifik anti kanker, dari 24 sampel 14 diantaranya

D. KESIMPULAN

Karakterisasi senyawa Flavonoid yang terdapat dalam fraksi kloroform daun tumbuhan Terap (*A. odoratissimus*) dengan spektrofotometer UV dan spektrofotometer IR yang diisolasi merupakan flavonoid golongan flavan-3-ol. Hasil uji toksisitas pada larva udang

bisa sebagai aktivitas sitotoksik. Meyer (1982) menyebutkan tingkat toksisitas suatu ekstrak :

$LC_{50} \leq 30$ ppm	: Sangat toksik
$31 \text{ ppm} \leq LC_{50} \leq 1000$: Toksik
$LC_{50} > 1000$ ppm	: tidak toksik

Berdasarkan hasil analisis diketahui LC_{50} dari isolat B1 yaitu 80,25 ppm, pada fraksi kloroform 147.78 ppm, dan ekstrak metanol 110.51 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50% dan mengindikasikan bahwa isolat B1, fraksi metanol dan kloroform bersifat toksik dan bisa dikatakan mempunyai potensi senyawa bioaktif.

(*brine shrimp lethality test*) dari Ekstrak Metanol, Fraksi Kloroform, dan Isolat diperoleh nilai LC_{50} masing-masing sampel yaitu 110.5176 ppm, 147.7895 ppm, dan 80.2568 ppm. Maka dapat disimpulkan bahwa pada ekstrak metanol, Fraksi Kloroform dan Isolat bersifat toksik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad, S. A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karunika.
2. Aliefman, H dan A. Wahab Jufri. 2011. *Aktifitas Anti Malaria dan Analisis Metabolit Sekunder Kayu dan Kulit Batang Artocarpus odoratissimus blanco*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Jurusan FMIPA: Universitas Mataram
3. Asih, A. 2009. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (Glycine max)*. Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana.
4. Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB..
5. Jayasinghe L., Balasooriya B.A.S., Padmini W C Hara N, and Fujimoto Y. 2004. Geranyl Chalcone Derivatives with Antifungal and Radical Scavenging. *Phytochem* 65: 1287-1290. [8] Cao, S., Butler, M. S., and Buss, A. D. 2003. *Flavonoids from Artocarpus lanceifolius*. *Natural Product Research* 17(2):79-81.
6. John, Coates. 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, eds. J. Workman, A.W. Sprinsteen. New York : Academic Press
7. Khan M R, Omoloso Ad, Kihara M. 2003. Antibacterial activity of *Artocarpus heterophyllus*. *Fitoterapia* 74: 501-505
8. Ko H H, Lu Y H, Yang S Z, Won S J, and Lin C N. 2005. Cytotoxic Prenyl flavonoids from *Artocarpus elasticus*. *J Nat Prod* 68: 1692-1695.
9. Leny, S. 2006. "Isolasi dan Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah Dengan Metode Uji Brine Shrimp". Karya Ilmiah Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sumatra Utara.
10. Verheij EWM, Coronel RE (eds). *Plant Resources of South Asia No. 2 Edible Fruits and Nuts*. Bogor: Prosea Foundation.

