

ISOLASI DAN UJI TOKSISITAS SENYAWA AKTIF DARI EKSTRAK METILENA KLORIDA (MTC) LENGKUAS PUTIH (*Alpinia galanga* (L) Willd)

Nolika Wiji Jayanti^{1*}, Maria Dewi Astuti, Noer Komari, Kholifatu Rosyidah

¹Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat

ABSTRAK

Jayanti dkk., 2012. Isolasi dan uji toksisitas senyawa aktif dari ekstrak metilena klorida (MTC) lengkuas putih *Alpinia galanga* (L) Willd

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi senyawa hasil isolasi ekstrak metilena klorida lengkuas putih, *Alpinia galanga* (L) Willd berdasarkan data spektra UV-Vis dan spektra IR, serta menentukan nilai Lethal Concentration (LC)₅₀ senyawa aktif hasil isolasi. Pemisahan ekstrak metilena klorida menggunakan kromatografi kolom gravitasi (KKG) menghasilkan 220 vial yang digabung menjadi 12 fraksi gabungan (fraksi A-L). Uji *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) menunjukkan fraksi I berpotensi sebagai antikanker. Fraksi I dimurnikan lebih lanjut menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif hingga didapatkan 3 fraksi (I1, I2, dan I3). Fraksi I1 dan I2 diuji kemurniannya dengan KLT tiga sistem eluen dan KLT dua dimensi, menghasilkan senyawa murni, I1 dan I2. Senyawa I1 didapat sebanyak 3,67 mg padatan berwarna kuning dan senyawa I2 didapat sebanyak 6,97 mg padatan berwarna putih. Spektra UV-Vis senyawa I1 menunjukkan adanya cincin aromatik. Spektra IR senyawa I1 menunjukkan adanya gugus -OH, -C=O, -CH alifatik dan -C-O. Senyawa I1 diduga kuat sebagai senyawa flavonoid golongan flavon. Spektra UV-Vis senyawa I2 menunjukkan adanya kromofor -C=C yang tidak terkonjugasi. Spektra IR senyawa I2 menunjukkan adanya gugus -CH alifatik, -C=O, -C=C dan -C-O. Senyawa I2 diduga kuat golongan triterpenoid. Uji toksisitas dilakukan pada senyawa I2 dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 62,4979 ppm. Senyawa I2 berpotensi sebagai antikanker.

Kata kunci : *Alpinia galanga* (L) Willd, flavonoid, triterpenoid

ABSTRACT

Jayanti *et al.*, 2012. Isolation and Toxicity Test of Active Compounds From Methylene Chloride Extract Of White Galanga (*Alpinia galanga*(L)Willd).

This study aimed to characterize the compounds isolated methylene chloride extracts of white ginger, *Alpinia galanga* (L) Willd based on UV-Vis spectra and IR spectra, as well as determine the Lethal Concentration (LC)₅₀ the isolation of active compounds. Separation of methylene chloride extracts using gravity column chromatography (KKG) produced 220 vials are combined into 12 fractions combined (A-L fraction). Brine Shrimps Lethality Test (BSLT) shows the fraction of the I potential as anticancer. Fraction I was purified further using Thin Layer Chromatography (TLC) preparative to obtain three fractions (I1, I2, and I3). Fraction I1 and I2 purity tested by TLC eluent system and three two-dimensional TLC, yielding pure compounds, I1 and I2 compounds. Compound I1 obtained as much as 3.67 mg of yellow solid and I2 compound obtained as a white solid 6.97 mg. UV-Vis spectra of compounds I1 indicate the presence of aromatic rings. IR spectra of compounds I1 indicate the presence of -OH groups, -C = O, aliphatic-CH and -CO. Compound I1 is strongly suspected as the flavone class of flavonoids. UV-Vis spectra indicate the presence of chromophore compounds I2-C = C which is not conjugated. IR spectra of compounds indicate the presence of I2-CH aliphatic group, -C = O, -C = C and -C-O. I2 compounds allegedly triterpenoid group. Toxicity tests conducted on the compound by the method of Brine Shrimps I2 Lethality Test (BSLT) LC₅₀ values obtained at 62.4979 ppm. I2 potential as anticancer compounds.

Keywords : *Alpinia galanga* (L) Willd, flavonoids, triterpenoid

PENDAHULUAN

Tanaman mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder, seperti alkaloid, flavonoid, fenilpropanoid, steroid, triterpenoid, tanin, dan kumarin (Adfa, 2005). Tanaman *Alpinia galanga* (L) Willd merupakan anggota *Zingiberaceae* yang kaya senyawa metabolit sekunder. Tanaman ini dikenal dengan nama laos atau lengkuas. Beberapa

penelitian sebelumnya melaporkan bahwa lengkuas memiliki aktivitas antifungi, antitumor, analgetikum, antikembang (Matsuda *et al.*, 2003), antiplasmid (Latha *et al.*, 2009), antibakteri (Phongphaichit *et al.*, 2006) dan antioksidan (Mayachiew *et al.*, 2008). Yasuhara *et al.* (2009) melaporkan bahwa senyawa asetoksikavikol aasetat pada lengkuas memiliki

aktivitas antitumor dan anti alergi. Asetoksikavikol asetat (ACA) adalah salah satu senyawa kimia yang diisolasi dari rimpang lengkuas yang memiliki keaktifan terhadap beberapa bakteri dan spesies dermatofit (Azuma *et al.*, 2005). Penelitian lain melaporkan lengkuas memiliki potensi sebagai obat bagi pasien AIDS (Voravuthikunchai *et al.*, 2005).

Penelitian uji toksisitas telah dilakukan sebelumnya terhadap ekstrak rimpang lengkuas putih dengan proses ekstraksi bertahap menggunakan pelarut *n*-heksana, metilena klorida (MTC), etil asetat, dan metanol. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak dari rimpang lengkuas putih bersifat aktif dalam mengontrol perkembangbiakan larva udang *Artemia salina*. Ekstrak paling aktif adalah ekstrak MTC dengan nilai Lethal Concentration (LC)₅₀ sebesar 40,49 ppm. Ekstrak *n*-heksana merupakan ekstrak yang kurang aktif dibandingkan ketiga ekstrak lainnya dengan nilai LC₅₀ sebesar 425,70 ppm. Ekstrak etil asetat dengan nilai LC₅₀ sebesar 194,53 ppm dan ekstrak metanol dengan LC₅₀ sebesar 105,75 ppm (Jayanti *et al.*, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dilakukan penelitian lanjutan terhadap rimpang lengkuas putih dari hasil ekstrak MTC. Ekstrak MTC difraksinasi dan diisolasi dengan menggunakan berbagai metode kromatografi. Senyawa murni dikarakterisasi dengan spektrofotometri ultraviolet (UV), dan spektrofotometri inframerah (IR) serta dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini berkualitas *analytical grade* dan langsung dipergunakan tanpa pemurnian lebih lanjut yang meliputi 2-iodida thiopen, 4-iodida, N,N-dimetil anilin, 5-metil-2-iodothiopen, paladium tersier tributilfosfin, gas argon, tetrahidrofur, 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO), pelat TLC silika, etil asetat, diklorometan, heptan, heksan, metanol, serta akuades.

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas kimia standar seperti beker gelas, pipet tetes dan gelas ukur. Peralatan sintesis meliputi labu Schlenk 50 mL, *syringe* 5 mL, 10 mL dan 25 mL, rotary evaporator, labu vakum dan pompa vakum. Peralatan analisis yang meliputi NMR Bruker 500 MHz untuk ¹H dan 125 MHz untuk ¹³C dengan pelarut CDCl₃, GC-MS Shimadzu serta *melting point* Fischer Jones.

Isolasi Senyawa Aktif dari Ekstrak MTC Lengkuas Putih

Proses pemisahan senyawa dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom grafitasi (KKG) yang berdiameter 2,50 cm. Sebanyak 100,00 gram silika gel G 60 dikeringkan dalam oven selama 1 jam dengan temperatur 100°C. Kolom kaca (diameter 2,50 cm) diisi dengan silika gel yang telah dipanaskan. Kolom silika dikemas dengan cara basah dan dipadatkan. Setelah padat dilihat kolom terdapat keretakan atau tidak. Ekstrak MTC dibuat impreg dengan cara dilarutkan dalam 2,00 ml aseton, kemudian diteteskan ke dalam 2,00 gram silika gel 60 diaduk sampai homogen dan kering. Impreg dimasukkan di atas kolom KKG yang telah siap pakai kemudian diratakan. Elusi diawali dengan eluen non polar yaitu *n*-heksana kemudian elusi dilanjutkan dengan kombinasi eluen dengan polaritas meningkat sesuai hasil KLT. Eluat yang dihasilkan kemudian ditampung dalam vial berbeda sehingga akan dihasilkan beberapa fraksi. Semua fraksi yang diperoleh setelah proses elusi pada KKG diamati dengan KLT. Setiap fraksi ditotolkan pada plat KLT sesuai urutan. Penggabungan fraksi dilakukan berdasarkan pola kromatogram KLT.

Uji Toksisitas Fraksi Menggunakan BSLT

Telur udang ditetaskan ke dalam gelas piala berisi air laut dan dilengkapi dengan aerator. Setelah 24 jam telur udang akan menetas menjadi larva udang. Larva udang yang baik digunakan untuk uji bioaktivitas adalah larva yang baru menetas (Rosyidah & Ariyani, 2009). Sebanyak 10,00 mg sampel dilarutkan dalam 10,00 ml air laut. Bila sampel tidak larut dapat ditambahkan 50,00 µl tween-80. Dari larutan sampel tersebut 1000,00; 500,00; 50,00; 5,00 µl dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 1,00 ml, sehingga konsentrasi larutan menjadi 1000, 100, 10, dan 1 ppm. Kemudian sebanyak 10 ekor larva udang dimasukkan dalam setiap vial kemudian diamati selama 24 jam (Rosyidah & Ariyani, 2009). Setelah 24 jam, jumlah udang yang mati dihitung dan dianalisis menggunakan Program analisis Probit Finney untuk menentukan LC₅₀ dengan selang kepercayaan 95%.

Pemurnian Fraksi Aktif

Pemurnian fraksi aktif dari ekstrak MTC dilakukan dengan menggunakan cara kromatografi lapis tipis preparatif (KLT Preparatif) dengan eluen yang sesuai dengan metode seperti penentuan eluen untuk KKG. Senyawa tunggal dari fraksi yang aktif, dilakukan uji kemurnian. Uji kemurnian dilakukan dengan KLT sampai tampak satu noda pada minimal

tiga sistem eluen. Selain itu, uji kemurnian juga dilakukan dengan KLT dua dimensi yang apabila murni akan menampilkan satu noda

Analisis spektrofotometri UV dan IR

Analisis spektra UV Vis menggunakan spektrofotometer UV Shimadzu UV-pharmaSpec 1700 dan analisis spektra IR menggunakan spektrofotometer IR Buck Scientific Model 500.

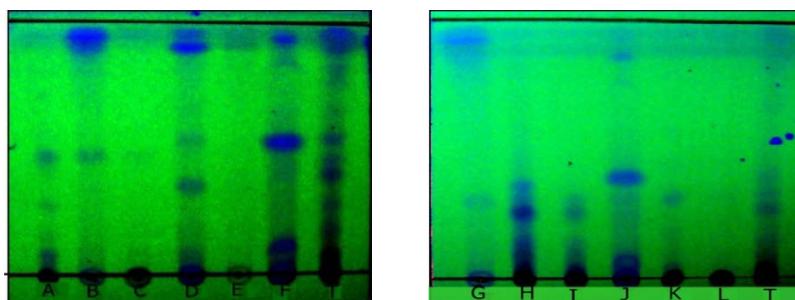
HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi Ekstrak MTC

Fraksinasi ekstrak MTC lengkuas putih dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom gravitasi (KKG). Sebelum melakukan fraksinasi, dicari terlebih dahulu eluen yang sesuai dengan metode KLT. Eluen yang dicoba yaitu *n*-heksana : MTC, *n*-heksana : etil asetat, *n*-heksana : metanol, MTC : etil asetat, MTC : kloroform dalam berbagai perbandingan. Eluen *n*-heksana : etil asetat (8:2) memiliki pola pemisahan yang paling baik daripada eluen lain karena memberikan noda terbanyak dan terpisah baik serta jarak antar noda cukup terpisah. Eluen tersebut kemudian digunakan sebagai fase gerak KKG. Sebelum proses elusi, ekstrak MTC terlebih dahulu diimpreg dengan silika gel G 60. Tujuan dari proses impregnasi adalah agar sampel yang akan difraksinasi dapat tersebar dengan homogen dan diharapkan hasil pemisahannya baik. Selanjutnya dilakukan proses fraksinasi menggunakan KKG. Sebelumnya kolom harus dikemas terlebih

dahulu, ekstrak yang digunakan sebanyak 1,00 gram, oleh karena itu digunakan kolom dengan diameter 2,5 cm.

Proses elusi dilakukan dengan metode bergradien, sehingga elusi diawali dengan eluen tunggal *n*-heksana yang bersifat non polar kemudian divariasikan dengan eluen yang lebih polar. Fase gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya dorong gravitasi, dimana pita senyawa terlarut akan bergerak dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari kolom (Gritter, 1991). Fraksi yang diperoleh ditampung dalam botol vial yang telah diberi nomor secara berurutan dan diperoleh sebanyak 220 vial. Dimana pemantauan noda yang dilakukan menggunakan KLT menghasilkan 12 fraksi. Berdasarkan pola kromatogram KLT tersebut, maka vial 2-23 dapat digabungkan sebagai fraksi A (26,3 mg), vial 24-61 sebagai fraksi B (1,8 mg), vial 62-86 sebagai fraksi C (4,3 mg), vial 88-105 sebagai fraksi D (6,2 mg), vial 106-112 sebagai fraksi E (10 mg), vial 113-146 sebagai fraksi F (200 mg), vial 147-164 sebagai fraksi G (10 mg), vial 165-173 sebagai fraksi H (50 mg), vial 174-182 sebagai fraksi I (340 mg), vial 183-193 sebagai fraksi J (10 mg), vial 194-205 sebagai fraksi K (53 mg), vial 206-220 sebagai fraksi L (20 mg). Kromatogram KLT fraksi gabungan hasil KKG dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram KLT fraksi gabungan A-L hasil KKG dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (6 : 4)

Masing-masing fraksi gabungan tersebut kemudian diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimps Lethality Test*). Fraksi yang nilai toksisitasnya paling tinggi selanjutnya akan dimurnikan

Uji Toksisitas Fraksi Menggunakan BSLT

Kemampuan mematikan larva udang dapat digunakan sebagai uji pendahuluan yang cepat dan sederhana untuk mengetahui bioaktivitas suatu

senyawa secara *in vivo* (Kristanti *et al.*, 2004). Kisaran konsentrasi fraksi yang dapat memberikan efek toksik yaitu konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian sebesar 50% dari jumlah hewan uji setelah 24 jam perlakuan, yang disebut sebagai LC_{50} . Jumlah larva udang yang mati dihitung dan dianalisis menggunakan program analisis Probit Finney untuk menentukan LC_{50} . Setiap sampel diuji dalam tiga kali ulangan. Fraksi-fraksi yang didapatkan dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT. Berdasarkan

massa fraksi yang dihasilkan, maka yang dapat dilakukan uji toksisitas adalah fraksi A, fraksi E,

fraksi F, fraksi G, fraksi H, fraksi I, fraksi J, fraksi K, dan fraksi L.

Tabel 1. Hasil uji pendahuluan fraksi aktif terhadap larva *Artemiasalina*.

No	Fraksi	LC ₅₀ (ppm)	Keterangan
1	A	293,887	Aktif
2	E	369,256	Aktif
3	F	208,630	Aktif
4	G	231,278	Aktif
5	H	20,448	Aktif
6	I	41,614	Aktif
7	J	72,272	Aktif
8	K	57,771	Aktif
9	L	70,686	Aktif

Berdasarkan Tabel 1 diketahui bahwa semua fraksi aktif terhadap uji BSLT dengan nilai LC₅₀ < 1000 ppm. Fraksi H diketahui memiliki keaktifan dengan nilai LC₅₀ 20,448 ppm, sedangkan fraksi E diketahui memiliki keaktifan paling rendah dibandingkan dengan fraksi lainnya dengan nilai LC₅₀ 369,256 ppm. Fraksi yang memiliki harga LC₅₀ antara 0-30 ppm berpotensi sebagai antikanker, LC₅₀ antara 30-200 ppm berpotensi sebagai antibakteri, sedangkan LC₅₀ antara 200-1000 ppm berpotensi sebagai pestisida (Restasari *et al.*, 2009). Fraksi H merupakan fraksi yang paling aktif dan berpotensi sebagai antikanker, namun dilihat dari massa yang ada, fraksi I lebih berpotensi untuk dipisahkan lebih lanjut karena memiliki massa yang lebih besar dan dari kromatogramnya terlihat pola pemisahan fraksi yang lebih sederhana dibandingkan fraksi H. Dilihat dari nilai LC₅₀ fraksi I memiliki potensi sebagai antibakteri.

Pemurnian Fraksi Aktif

Pemurnian fraksi I selanjutnya dilakukan menggunakan metode KLT preparatif. KLT preparatif dibuat dengan menggunakan silika gel GF₂₅₄ sehingga dapat berfluoresensi di bawah lampu UV. Pada KLT preparatif, fraksi I yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi plat lapisan dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis cuplikan, sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita (Gritter *et al.*, 1991). Sebelum dilakukan KLT preparatif pada fraksi I, terlebih dahulu dilakukan KLT untuk mendapatkan eluen yang sesuai. Sistem eluen *n*-heksana : etil asetat (6 : 4) menunjukkan pemisahan yang paling baik, sehingga digunakan sebagai eluen pada KLT preparatif. KLT preparatif fraksi I setelah proses elusi selesai terlihat di bawah lampu UV terdapat tiga noda, yaitu noda atas yang disebut dengan fraksi I.1, noda tengah yang disebut dengan fraksi I.2, dan noda bawah yang disebut

dengan fraksi I.3. Ketiga noda tersebut dikerok kemudian dilarutkan ke dalam etil asetat dan disaring. Filtrat dibiarkan menguap, kemudian fraksi yang dihasilkan dipantau dengan KLT. Dari tiga senyawa yang didapatkan yaitu fraksi I.1 dengan massa 2,79 mg dengan warna kenunginan. Fraksi I.2 dengan massa 6,97 mg dengan warna putih berupa padatan kristal, dan fraksi I.3 dengan massa 3,67 mg dengan ekstrak berwarna kuning. Berdasarkan kromatogram KLT senyawa fraksi I, senyawa I.1 dan I.2 diindikasikan merupakan senyawa murni, dengan tampaknya satu noda pada KLT. Senyawa I.3 diindikasikan belum murni karena masih terdapat noda yang berekor.

Uji Kemurnian

Untuk mengetahui kemurnian fraksi I.1 dan I.2, maka dilakukan uji kemurnian komponen hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis hingga tampak satu noda tunggal pada minimal tiga sistem eluen dan KLT dua dimensi. Pemilihan eluen dilakukan berdasarkan kepolarannya, selain itu jika senyawa tersebut telah murni akan memberikan noda tunggal dalam eluen apapun. Sistem tiga eluen yang berbeda yang dipilih untuk fraksi I.1 yaitu *n*-heksana : Etil asetat (6:4), *aseton* : MTC (3:7), MTC : Etil asetat (8:2). Hasilnya menunjukkan noda tunggal. Hasil kromatogram KLT dua dimensi menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat (6:4) dan *aseton* : MTC (3:7) juga menunjukkan noda tunggal. Fraksi I.1 selanjutnya disebut senyawa I.1.

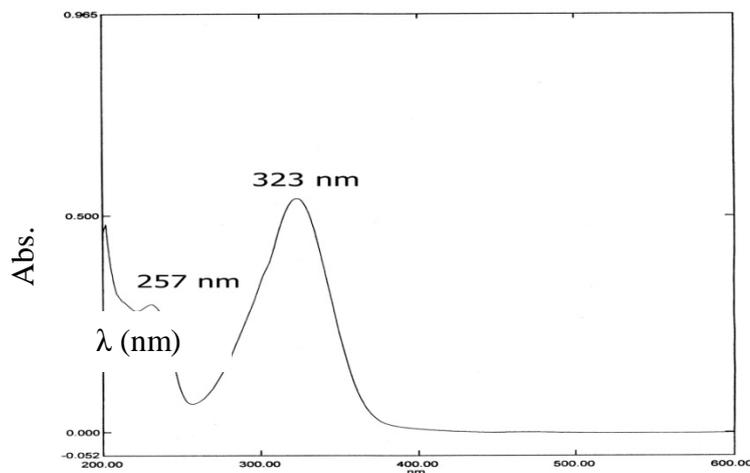
Fraksi I.2 juga dilakukan uji kemurnian pada KLT tiga sistem eluen menggunakan eluen *n*-heksana : Etil asetat (6:4), *n*-heksana : MTC (7:3), dan MTC : Etil asetat (9,5:0,5) menghasilkan satu noda tunggal. Hasil kromatogram KLT dua dimensi menggunakan pelarut *n*-heksana : etil asetat (6:4) dan *n*-heksana : MTC (5:5) juga menunjukkan noda tunggal. Fraksi I.2 selanjutnya disebut senyawa I.2.

Analisis Senyawa Hasil Isolasi

Analisis UV

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah UV tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra UV dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat dengan transisi-transisi diantara tingkat-tingkatan tenaga elektronik (Sastromidjojo, 2001). Senyawa hasil isolasi dianalisis dengan

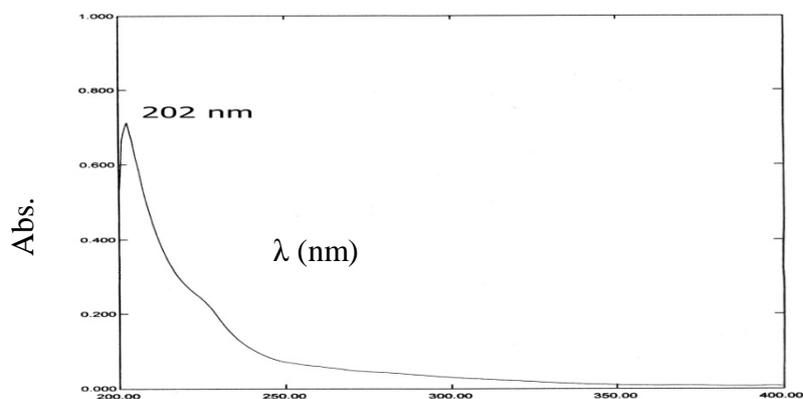
spektrofotometer UV menggunakan pelarut metanol. Panjang gelombang yang diukur yaitu 200-700 nm. Hal ini dikarenakan informasi spektra UV yang ditampilkan berupa transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ maupun $n \rightarrow \pi^*$ terjadi pada panjang gelombang tersebut. Spektra UV senyawa I.1 dan I.2 dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Spektra UV Senyawa I.1

Spektra UV senyawa I.1 pada Gambar 2 memperlihatkan puncak serapan pada λ_{maks} 257 nm dan 323 nm. Pada λ_{maks} 257 nm menunjukkan adanya eksitasi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ ini merupakan kromofor yang khas untuk suatu sistem ikatan rangkap terkonjugasi ($-C=C-C=C-$) dari suatu cincin aromatik (Najiyah, 2008). Serapan pada daerah λ_{maks} 323 nm menunjukkan adanya eksitasi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang memperlihatkan adanya ikatan terkonjugasi dari

heteroatom dengan sistem π aromatik ($-C=C-C=C-C=O$) (Wahjuni, 2008), hal ini menunjukkan bahwa senyawa I.1 memiliki cincin aromatik, dugaan sementara senyawa I.1 merupakan senyawa golongan flavonoid. Menurut Markham (1988) senyawa flavonoid dengan pita II pada λ_{maks} 250-280 nm dan pita I berada pada λ_{maks} 310-350 termasuk golongan flavon.

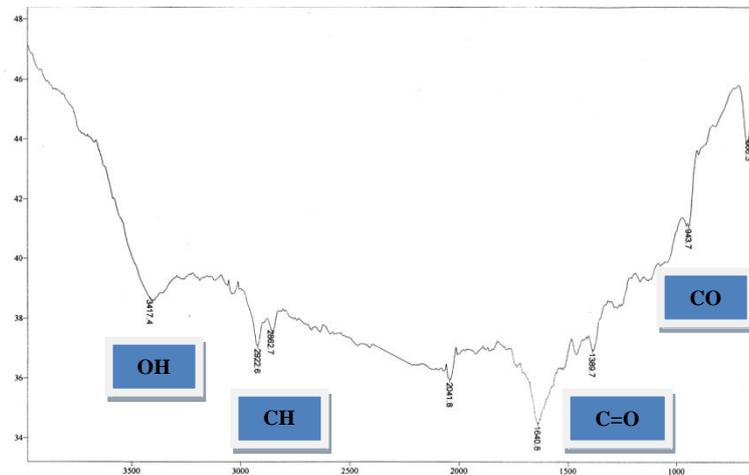


Gambar 3. Spektra UV Senyawa I.2

Spektra UV pada Gambar 2 menunjukkan adanya puncak serapan maksimum pada λ_{maks} 202 nm dalam pelarut metanol. Serapan khas tersebut mengindikasikan bahwa senyawa I.2 cenderung ke arah senyawa steroid atau triterpenoid (Jihadi, 2008). Menurut Prasetya (2007), puncak serapan tersebut merupakan serapan khas untuk senyawa triterpenoid yang memiliki kromofor (C=C) yang tidak terkonjugasi.

Analisis IR

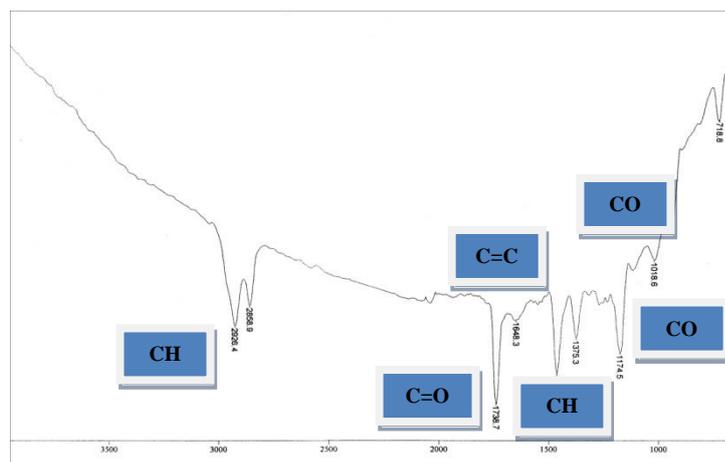
Pancaran inframerah pada umumnya mengacu pada bagian spektra elektromagnet yang terletak di antara daerah tertentu. Spektra inframerah merupakan kekhasan sebuah molekul secara menyeluruh, gugus-gugus atom tertentu memberikan pita-pita pada serapan tertentu. Letak pita-pita di dalam spektra inframerah ditampilkan sebagai bilangan gelombang atau panjang gelombang. Spektra IR senyawa I.1 dan I.2 diperlihatkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Spektra IR Senyawa I.1

Spektra IR senyawa I.1 pada Gambar 21 memperlihatkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada 3417,4 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya serapan melebar sebagai vibrasi ulur OH dan diperkuat dengan vibrasi tekuk CO pada daerah 1389,7 cm⁻¹ mendukung adanya gugus hidroksil. Vibrasi pada 2922,6 cm⁻¹ dan 2862,7 cm⁻¹ memberi petunjuk adanya vibrasi CH

alifatik untuk gugus metil CH₃ dan metilena CH₂ (Sastrohamidjojo, 2001). Serapan khas C=O terkhelet dengan hidroksi ditunjukkan oleh bilangan gelombang 1640,8 cm⁻¹ (Sulistyaningrum, 2008). Berdasarkan data spektra UV dan IR dapat diketahui bahwa senyawa I.1 mempunyai vibrasi gugus -OH, gugus C=O, -CH alifatik dan diindikasikan sebagai senyawa flavonoid golongan flavon.



Gambar 4. Spektra IR Senyawa I.2

Spektra IR pada Gambar 4 menunjukkan terdapat serapan khas pada bilangan gelombang tertentu. Serapan yang muncul pada $2858,9\text{ cm}^{-1}$ dan $2926,4\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi ulur CH (Silverstein, 1984). Data ini diperkuat dengan adanya vibrasi tekuk CH pada bilangan gelombang $1462,9\text{ cm}^{-1}$ dan $1375,3\text{ cm}^{-1}$ yang mengidentifikasi adanya gugus gem dimetil sebagai ciri khas senyawa triterpenoid (Prasetya, 2007). Munculnya bilangan gelombang $1738,7\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O, pada penelitian Han *et al.*, (2008) serapan pada bilangan gelombang 1738 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus karbonil ester. Vibrasi ulur CO muncul dengan ditunjukkan oleh adanya serapan pada bilangan gelombang $1174,5\text{ cm}^{-1}$ dan $1018,6\text{ cm}^{-1}$

(Macmillan, 1993). Adanya pita pada $1648,3\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan serapan khas dari C=C. Berdasarkan data spektra UV dan IR dapat diketahui bahwa senyawa I.2 mempunyai vibrasi gugus C=C, gugus C=O, -CH alifatik dan diindikasikan sebagai senyawa triterpenoid.

Uji Kualitatif Senyawa

Skrining fitokimia adalah uji sederhana untuk mengetahui golongan senyawa kimia secara kualitatif yang terdapat dalam sampel. Senyawa I.1 dan I.2 dilakukan uji kualitatif untuk mendukung analisis data spektra UV dan IR, hasil uji dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji kualitatif senyawa I.1 dan I.2

Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil	
		I.1	I.2
Fenolat	MeOH + FeCl ₃	Hijau Tua (+)	Kuning (-)
Flavonoid	Mg + HCl pekat +metanol	Merah (+)	-
Steroid	<i>Lieberman Butchard</i>	Coklat muda (-)	Coklat (-)
Triterpenoid	<i>Lieberman-Butchard</i>	Coklat muda (-)	Merah (+)

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa pada senyawa I.1 yang direaksikan dengan FeCl₃ dalam metanol memberikan uji positif dengan memberikan warna hijau tua, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa I.1 termasuk senyawa fenolat. Untuk memastikan apakah senyawa I.1 berupa senyawa fenolat flavonoid maka dilakukan uji kualitatif lain yaitu menggunakan Mg dengan penambahan HCl pekat dan metanol, dari uji tersebut terlihat bahwa senyawa menunjukkan uji positif terhadap flavonoid, dengan memberikan warna merah. Uji golongan senyawa steroid menunjukkan hasil negatif dengan terbentuknya warna coklat muda, suatu senyawa dapat diindikasikan sebagai senyawa steroid jika saat direaksikan dengan pereaksi *Lieberman Butchard* menghasilkan warna hijau kebiruan. Uji golongan triterpenoid menunjukkan hasil negatif juga dengan terbentuknya warna coklat muda saat direaksikan dengan *Lieberman Butchard* seharusnya jika suatu senyawa itu termasuk golongan triterpenoid warna yang terbentuk adalah warna merah.

Senyawa I.2 diidentifikasi sebagai senyawa triterpenoid dengan terbentuknya warna merah saat direaksikan dengan *Lieberman Butchard*. Uji *Liebermann-Burchard* dilakukan dengan melarutkan sampel dalam kloroform hingga larut sempurna. Larutan tersebut kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat, dikocok dan didiamkan selama 15 menit. Uji ini positif untuk triterpenoid jika terbentuk warna merah (Kristanti *et al.*, 2004). Sedangkan untuk uji golongan senyawa fenolat pada I.2 menunjukkan hasil yang negatif dengan terbentuknya warna kuning saat senyawa dalam metanol direaksikan dengan FeCl₃.

Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi

Uji toksisitas senyawa hasil isolasi diperlakukan sama dengan uji toksisitas sebelumnya. Uji toksisitas metode BSLT akan diketahui hasil ketoksikannya dengan nilai LC₅₀. Uji toksisitas dilakukan pada senyawa I.2 saja sedangkan senyawa I.1 tidak dilakukan karena massa I.1 tidak cukup untuk dilakukan uji ini. Data hasil uji toksisitas senyawa I.2 dengan metode BSLT dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hasil uji BSLT Seyawa I.2

Konsentrasi	Kematian Larva				Total Larva	LC ₅₀ (ppm)
	I	II	III	Blanko		
1					0	10
10					0	10
100					0	10
1000	10	10	10		0	10

Berdasarkan data tabel di atas diketahui bahwa senyawa I.2 memiliki daya toksisitas dengan nilai LC₅₀ sebesar 62,4979 ppm. Suatu senyawa menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam BSLT jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm. Berdasarkan pernyataan di atas, maka senyawa I.2 bersifat toksik. Menurut Restasari *et al.* (2009), suatu senyawa yang memiliki harga LC₅₀ antara 0-30 ppm berpotensi sebagai antikanker, LC₅₀ antara 30-200 ppm berpotensi sebagai antibakteri, sedangkan LC₅₀ antara 200-1000 ppm berpotensi sebagai pestisida. Berdasarkan keterangan tersebut, maka senyawa yang didapatkan diduga memiliki potensi sebagai antibakteri. Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa senyawa I.2 memiliki nilai LC₅₀ yang lebih kecil dari fraksi I, hal ini mengindikasikan bahwa senyawa paling aktif pada fraksi I bukan pada senyawa I.2.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah Hasil analisis spektra UV pada senyawa I.1 menunjukkan adanya ikatan rangkap sistem aromatik dan spektra IR senyawa I.1 menunjukkan adanya gugus OH, -CH alifatik, -C=O, -CO dan diindikasikan sebagai senyawa flavonoid golongan flavon. Hasil analisis spektra UV senyawa I.2 menunjukkan adanya kromofor C=C tidak terkonjugasi dan pada spektra IR senyawa I.2 menunjukkan adanya gugus -C=O, -C=C, CH alifatik, -CO dan diidentifikasi sebagai senyawa golongan triterpenoid. Nilai LC₅₀ berdasarkan metode BSLT senyawa I.2 sebesar 62,4979 ppm ..

UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam Kesempatan ini penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Maria Dewi Astuti, S.Si., M.Si, Bapak Noer Komari S.Si., M.Kes dan Ibu Kholifatu Rosyidah S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengetahuan, kritik, saran, semangat, dan atas waktu yang telah diluangkan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Azuma, H, K. Miyasaka, T. Yokotani, T. Tachibana, A. Kojima-Yuasa, I. Matsui-Yuasa, & K. Ogino. 2006. Lipase-catalyzed preparation of optically active 1'-acetoxychavicol acetates and their structure-activity relationships in apoptotic activity against human leukemia HL-60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol.14 : 1811-1818.
- Jayanti, N.W, M. Gazali, M. Mahmudah. 2010. Isolasi Senyawa Aktif Sitotoksik dari Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* (L) Willd). Banjarbaru: Program Studi Kimia Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat
- Jihadi, N. 2008. Tiga Steroid dari Kulit Batang *Garcinia celebica* Linn. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya
- Latha, C, D. Varsh, Shriramb, S. Sheetal. J. Prashant. D. Supada, R. Rojatkara. 2009. Antiplasmid activity of 1-acetoxychavicol acetate from *Alpinia galanga* against multi-drug resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 123 : 522-525
- Markham. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung.
- Mayachiew, P, & Sakamon. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*. Vol. 41 : 1153-1159
- Matsuda, H, T. Morikawa, H. Managi, & M. Yashikawa. 2003. Antiallergic Principles from *Alpinia galanga*; Structural Requirements of Phenylpropanoids for Inhibition of Degranulation and Release of TNF and IL-4 in RBL-2H3 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol.15: 949-1953
- Millan, M.1993. *Spectroscopy Organic*. Houndmills.
- Phongpaichit, S, V. Vudhakul, S. Subhadirasakul, & C. Wattanapiromsakul. 2006. Evaluation of the Antymicrobial Activity of Extracts from Plant Used as Self-Medication by AIDS Patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 44, No. 1: 71-75
- Restasari, A., D. Kusriani, & E. Fachriyah. 2009. *Isolasi dan identifikasi Fraksi Teraktif dari Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (Terminalia catappa Linn)*. FMIPA Kimia UNDIP. Semarang.

- Rosyidah, K, & D. Ariyani. 2009. Karakterisasi Senyawa-senyawa fenolat Berkhasiat Sitotoksik dari Batang Kasturi (*Mangifera casturi*). *FMIPA Universitas Lambung Mangkurat*. Banjarbaru.
- Sastrohamidjojo. 2001. *Spektroskopi*. UGM Press, Yogyakarta.
- Silverstein, R. M. Clayton Bassler G. Morrill T. C. 1981. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Suny College of Environmental Science and Forestry. California
- Sulistyaningrum, N. 2008. Biflavonoid dari Kayu Batang *Garcinia Tetranda Pierre* : Isolasi, Penentuan Struktur dan Uji Antibakteri. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya
- Voravuthikunchai, S.P, S. Phongphaicit, & S. Subhadirasakul. 2005. Evaluation of Antibacterial Activities of Medicinal Plants Widely Used Among AIDS Patients in Thailand. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 43, No. 8: 701–706
- Yasuhara, T, Y. Manse, T. Moritomo, W. Qilong, H. Matsuda, M. Yoshikawa, O. Muraoka. 2009. Asetoxybenzhydroids as Highly Active and Stable Analogues of 1's-a'-acetoxychavicol, a patent antiallergic Principal from *Alpinia galangal*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol. 19: 2944–2946
- Zetra, Y, & P. Prasetya. 2007 Isolasi Senyawa α -Amirin Dari Tumbuhan *Beilschmiedia Roxburghiana*. (Medang) dan Uji Bioaktivitasnya. *Akta Kimindo*. Vol. 3, No : 27 – 30.