

**ISOLASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA
BATANG TUMBUHAN BROTOWALI (*Tinosporacrispa* L.)**

**ISOLATION OF SECONDARY METABOLITE FROM *n* -HEXANE EXTRACT
OF THE STEM OF BROTOWALI (*Tinospora crispa*)**

Muharni*, Elfita dan Masyita

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya

*email: muharnimyd@yahoo.co.id

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi satu senyawa metabolit sekunder dari ekstrak *n*-heksana batang *Tinospora crispa*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan teknik kromatografi. Terhadap senyawa hasil isolasi dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1 - difenil-2-pikrilhidrazil) dengan variasi konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 dan 7,8125 µg/mL. Senyawa hasil isolasi diperoleh dalam bentuk minyak berwarna kuning. Berdasarkan data spektroskopi NMR 1D dan dengan membandingkan data senyawa yang telah dilaporkan dari jamur endofitik batang brotowali pada literatur disimpulkan bahwa senyawa hasil isolasi adalah bis-(2-etilheksil)ftalat dengan rumus molekul C₂₄O₄H₃₈. Uji aktivitas antioksidan dari senyawa hasil isolasi memberikan nilai IC₅₀ sebesar 232,9 µg/mL dan dikategorikan tidak aktif antioksidan.

Kata Kunci: Antioksidan, bis-(2-etilheksil)ftalat, *Tinospora crispa*

ABSTRACT

Isolation of secondary metabolite from *n*-hexane extract of the stem of *Tinospora crispa* had been studied. The extraction was performed by maceration. The extract of *n*-hexane was separated and purified by column chromatography. Antioxidant activity of the isolated compound was conducted by DPPH (1.1-diphenylpicryl hydrazyl) method with concentration variation of 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 and 7.8125 µg/mL. The isolated compound was a yellow oils. Based on spectroscopy data 1D-NMR and comparing with literature data which had been reported from endophytic fungi of brotowali stem, it was concluded that the isolated compound was bis-(2-ethylhexyl) phthalate with molecular formula C₂₄O₄H₃₈. The antioxidant activity of the isolated compound showed IC₅₀ 232.9 µg/mL and was inactive as antioxidant.

Keywords: Antioxidant, bis-(2-ethylhexyl) phthalate, *Tinospora crispa*

PENDAHULUAN

Tumbuhan brotowali termasuk salah satu spesies dari genus *Tinospora* yang dikenal dengan nama spesies *Tinospora crispa*. *Tinospora crispa* berasal dari India dan kemudian menyebar

sampai di Indonesia (Santa dan Bambang, 1998). Tumbuhan brotowali merupakan tumbuhan yang sudah dikenal sebagai tumbuhan obat memar, demam, merangsang nafsu makan, sakit kuning, cacingan, batuk, mencuci luka pada kulit

atau gatal-gatal dan untuk mengobati penyakit kencing manis. Tumbuhan brotowali dilaporkan memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antimalaria, antidiabetes, antihipertetik, antihiperglikemik (Noor and Aschroft, 1998). Berdasarkan informasi ilmiah juga telah ditemukan khasiat tumbuhan brotowali yaitu ekstrak batang brotowali yang berpotensi sebagai antioksidan untuk mencegah timbulnya arteriosklerosis atau sejenis penyakit kardiovaskuler (Khamarazaman, *et al.*, 2012)

Berdasarkan studi pustaka telah dilaporkan beberapa kandungan kimia dari batang tumbuhan brotowali diantaranya alkaloid kuinolin, alkaloid isokuinolin dan golongan glukosida fenolik (Guo *et al.*, 1999; Hatthakitpanichakul, 2001; Fukuda *et al.*, 1983). Selain itu, pada batang brotowali juga ditemukan senyawa golongan glukosida furanoid diterpen dan senyawa golongan furanoid diterpen (Fukuda *et al.*, 1985; Zambrut *et al.*, 1999). Disamping dari tumbuhannya, pada mikroba endofitik yang terdapat pada batang tumbuhan brotowali dilaporkan pula adanya enam senyawa hasil isolasi antara lain satu senyawa alkaloid (Elfita *et al.*, 2011), satu senyawa golongan piran (Elfita *et al.*, 2013a, satu senyawa turunan ftalat (Elfita dkk, 2013b) dan satu senyawa turunan lakton (Elfita *et al.*, 2014)

Eksplorasi penelitian brotowali sebagai antioksidan alami telah dilaporkan oleh Irianti, dkk. (2011) di Thailand bahwa ekstrak etanol batang brotowali aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 33 µg/mL. Kemudian Cavin (1998) melaporkan n-cis-feruloiltiramin, n-trans-feruloiltiramin dan sesoisolarikiresinol yang diisolasi dari ekstrak diklorometana batang brotowali menunjukkan aktif sebagai antioksidan. Pada makalah ini akan dilaporkan isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak n-heksana batang tumbuhan brotowali (*Tinospora crispa* L.) dan diuji aktivitas

antioksidannya dengan metode DPPH.

METODELOGI

Alat

Seperangkat alat destilasi, chamber, kromatografi kolom gravitasi, neraca analitis, berbagai peralatan gelas kimia, rotary evaporator R-114 Buchi dengan sistem vakum Buchi B-169, lampu UV CAMAG 254 nm, spektrofotometer NMR JEOL, mortar, botol kaca bervolume 1L.

Bahan

Batang tumbuhan brotowali, pelarut teknis (n-heksan, etilasetat, metanol), plat KLT silika gel G60 F₂₅₄O,25 mm 20 x 20 cm, silika gel G60 PF₂₅₄ (70-230 mesh), metanol p.a, 1,1-Difenill-2-pikrilhidrazil (DPPH), Dimetil Sulfoksida (DMSO), L-Ascorbic Acid Ajax Finechem 99% (asam askorbat standar).

Persiapan Sampel

Sampel batang brotowali diperoleh di area Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sriwijaya. Sampel batang brotowali segar sebanyak 1 Kg dicuci bersih dengan air dan diangin-anginkan hingga kering bagian luarnya. Selanjutnya sampel batang brotowali tersebut ditumbuk sampai hancur secara manual dengan menggunakan alat penggerus mortar.

Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Batang brotowali (*Tinospora crispa* L) sebanyak 1 Kg yang sudah digerus dimaserasi menggunakan pelarut n-heksana selama 3 hari. Maserasi dilakukan tiga kali pengulangan. Setiap kali pengulangan menggunakan pelarut n-heksana dengan volume 1,5 L untuk sampel batang brotowali sebanyak 1 Kg. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator. Ekstrak pekat n-heksana batang brotowali kemudian dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Pemisahan dan Pemurnian

Ekstrak pekat *n*-heksana batang brotowali (5g), kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fasa diam silika gel dengan perbandingan 1:10. Sampel dan fasa diam silika gel dilakukan impregnasi terlebih dahulu agar sampel bisa terikat kuat dengan fasa diamnya. Sampel yang sudah diimpregnasi tersebut dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara merata dan dielusi menggunakan eluen sebanyak 50 mL dengan kepolaran meningkat pada perbandingan *n*-heksana : etil asetat 10:0 (50 mL), 9:1 (250 mL), 8:2 (250 mL), 7:3 (300 mL), 6:4 (200 mL), 5:5 (150 mL), 4:6 (150 mL), 3:7 (100 mL), 0:10 (50 mL); etilasetat : metanol 5:5 (50 mL) dan metanol 100% (50 mL). Eluat ditampung dalam botol vial 10 mL dan masing-masing dianalisis dengan kromatografi lapis tipis. Eluat dengan pola noda yang sama dikelompokkan menjadi satu fraksi dan diuapkan. Fraksi terpilih kemudian kembali dipisahkan dan dimurnikan dengan teknik kolom gravitasi hingga diperoleh senyawa murni.

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa murni yang diperoleh ditentukan struktur molekulnya dengan metode spektroskopi NMR 1D (¹H-NMR, ¹³C-NMR) dan dibandingkan dengan data senyawa pembanding yang dilaporkan dalam literatur

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara 0,2 mL berbagai konsentrasi larutan sampel (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 dan 7,8125 µg/mL) ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,5 mM. Campuran larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 517 nm. Larutan antioksidan standar digunakan asam askorbat standar yang

diukur dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Aktivitas antoksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH.

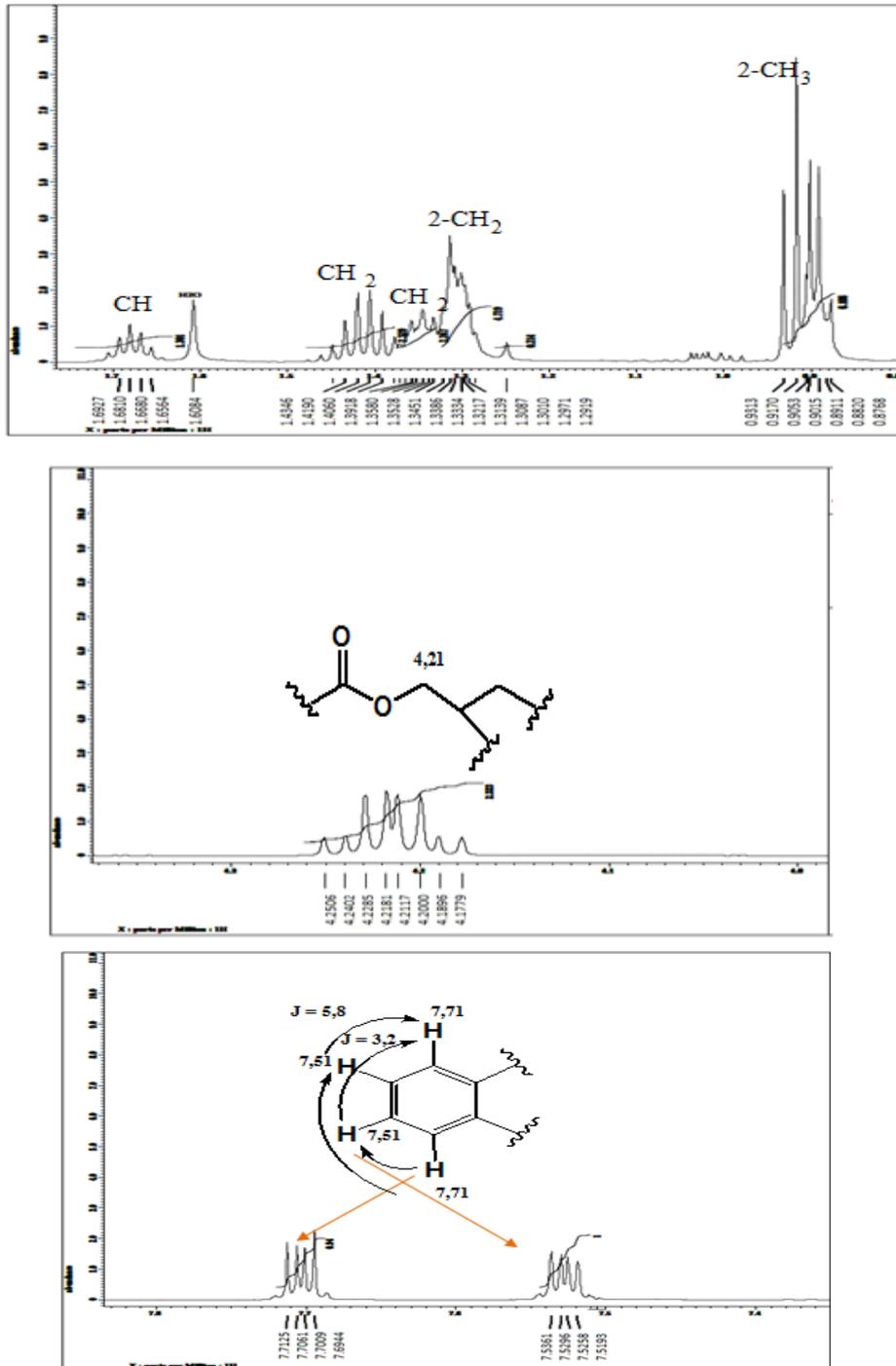
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dari batang brotowali sebanyak 1 Kg didapatkan ekstrak pekat *n*-heksana sebanyak 26 g. Analisis ekstrak dengan teknik KLT dengan penampak noda lampu UV pada λ 254 nm, menunjukkan ekstrak *n*-heksana berpotensi mengandung senyawa metabolit sekunder. Noda yang menunjukkan warna ungu atau berfluorisensi pada sinar UV mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder adalah senyawa yang memiliki beberapa ikatan rangkap yang berkonjugasi atau senyawa aromatik. Ekstrak pekat *n*-heksana batang brotowali (5 g) setelah dipisahkan dengan kromatografi kolom gravitasi didapatkan lima fraksi F₁- F₅. Berdasarkan noda pada KLT fraksi F₂ sebanyak 1,1 g menunjukkan adanya pola noda yang dominan dan sederhana sehingga perlu dilakukan pemisahan kembali dengan kolom gravitasi dan berdasarkan pola noda pada KLT diperoleh 3 subfraksi kolom yaitu F_{2.1}, F_{2.2}, dan F_{2.3}. Subfraksi F_{2.1} memperlihatkan adanya minyak berwarna kuning sebanyak 0,12 g dan analisis dengan KLT menggunakan eluen *n*-heksana : etilasetat 9,5 : 1,5 dengan penampak noda lampu UV pada 254 nm menunjukkan pola noda tunggal sehingga diduga senyawa murni.

Penentuan struktur senyawa hasil isolasi dilakukan berdasarkan data spektroskopi; NMR 1 dimensi (1D) yang terdiri dari ¹H NMR, dan dibandingkan dengan data senyawa pembanding yang telah dilaporkan pada literatur. Data spektrum ¹H-NMR (**Gambar 1**) senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya sinyal pada daerah δ_H 0,90 ppm (6H, *t*) yang merupakan sinyal untuk dua buah gugus metil (CH₃) yang terkopling oleh proton

tetangga. Selanjutnya sinyal yang terlihat pada daerah sekitar δ_H 1,29 – 1,43 ppm (8H, *m*) diduga sebagai sinyal untuk gugus-gugus metilen (CH_2) dalam bentuk alifatik. Pada spektrum 1H -NMR juga terlihat sinyal pada δ_H 1,68 ppm (1H, *m*)

yang merupakan suatu proton metin (CH) yang dibelah lebih dari tiga proton tetangga sehingga muncul sebagai sinyal multiplet. Pelebaran spektrum 1H -NMR pada daerah δ_H 0,90 – 1,69 ppm terlihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Penggalan spektrum 1H -NMR senyawa hasil isolasi pada δ_H 0,90 – 1,69 ppm (A), δ_H 4,2 ppm (B) dan δ_H 7,51-7,71 ppm (C)

Pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ juga terlihat sinyal pada δ_{H} 4,21 ppm (2H,*m*) yang menunjukkan adanya gugus CH_2 . Pada δ_{H} 4,21 ppm ini merupakan sinyal yang khas untuk gugus CH_2 yang terikat dengan heteroatom yaitu atom O dalam bentuk ester dan mempunyai proton tetangga dalam bentuk rantai alifatik. Selanjutnya juga terlihat adanya sinyal pada daerah δ_{H} 7,51 ppm dan δ_{H} 7,71 ppm (2 H, *dd*, $J = 3,20$; 5,82 Hz). Kedua sinyal proton tersebut karakteristik untuk proton aromatik yang terkopling orto.

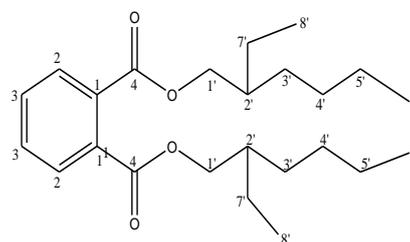
Masing-masing proton muncul sebagai sinyal doublet - doublet, sehingga diduga kedua proton tersebut dibelah oleh dua buah proton tetangga yang berbeda lingkungan kimianya.

Data spektrum $^1\text{H-NMR}$ ini selanjutnya dibandingkan dengan data pembandingan bis(2-etilheksil)ftalat yang telah dilaporkan sebelumnya dari jamur endofitik *Aspergillus* sp₁ batang tumbuhan brotowali (*Tinospora crispa*) (Elfita dkk., 2013b)

Tabel 1. Perbandingan data $^1\text{H-NMR}$ untuk senyawa hasil isolasi dengan pembandingan bis(2-etilheksil) (Elfita *et. al.*, 2013b)

No C	δ_{C} (ppm)* pembandingan	δ_{H} (ppm)* pembandingan	δ_{H} (ppm) senyawa hasil isolasi
1	132,2		
2	130,7	7,70 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,5$ dan 5,5 Hz)	7,71 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,20$ dan 5,82 Hz)
3	128,7	7,51 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,5$ dan 5,5 Hz)	7,51 (1H, <i>dd</i> , $J = 3,20$ dan 5,82 Hz)
4	167,6	-	-
1'	67,9	4,23 (2H, <i>m</i>)	4,21 (2H, <i>m</i>)
2'	38,6	1,69 (1H, <i>m</i>)	1,69 (1H, <i>m</i>)
3'	28,8	1,33 (2H, <i>m</i>)	1,34 (2H, <i>m</i>)
4'	23,6	1,33 (2H, <i>m</i>)	1,33 (2H, <i>m</i>)
5'	22,9	1,32 (2H, <i>m</i>)	1,32 (2H, <i>m</i>)
6'	10,8	0,91 (3H, <i>t</i>)	0,90 (3H, <i>t</i>)
7'	30,3	1,38 (2H, <i>m</i>)	1,39 (2H, <i>m</i>)
8'	13,9	0,91 (3H, <i>t</i>)	0,90 (3H, <i>t</i>)

Berdasarkan data pada **Tabel 1** terlihat senyawa hasil isolasi memberikan nilai pergeseran kimia hidrogen dan karbon yang mirip dengan data pembandingan bis(2-etilheksil)ftalat yang dilaporkan dari jamur endofitik tumbuhan brotowali (Elfita dkk., 2013b). Berdasarkan analisis data spektroskopi NMR 1D serta data pembandingan yang digunakan maka diusulkan senyawa hasil isolasi adalah bis(2-etilheksil)ftalat dengan struktur molekul senyawa tersebut seperti ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Struktur senyawa hasil isolasi

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dari senyawa uji dilakukan menggunakan me-

tode DPPH. Metode ini didasarkan pada kemampuan dari zat antioksidan dalam menetralkan radikal DPPH, dengan menyumbangkan protonnya sehingga membentuk radikal yang lebih stabil.

Nilai aktivitas dinyatakan dalam persen inhibisi (%I). Hubungan aktivitas peredaman radikal DPPH dari senyawa hasil isolasi dan senyawa standar (vitamin C pada berbagai konsentrasi (1000, 500, 250, 125, 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 µg/mL) yang dinyatakan dalam % inhibisi dapat dilihat pada **Tabel 2**. Data pada **Tabel 2** menunjukkan senyawa uji dan senyawa antioksidan standar mempunyai aktivitas peredaman (%I) terhadap radikal DPPH dengan kekuatan serapan yang berbeda. Peningkatan konsentrasi senyawa uji meningkatkan nilai % inhibisi terhadap

radikal DPPH. Pada konsentrasi yang sama senyawa hasil isolasi menunjukkan aktivitas lebih rendah dibandingkan senyawa antioksidan standar asam askorbat. Efektifitas peredaman radikal DPPH ditentukan dengan menghitung nilai IC_{50} melalui perhitungan regresi linier, yaitu konsentrasi dari senyawa uji yang dapat meredam 50% radikal DPPH. Nilai IC_{50} dari senyawa uji dan senyawa antioksidan standar terhadap peredaman radikal DPPH dihitung dengan persamaan regresi melalui hubungan antara konsentrasi dengan persen inhibisi. Berdasarkan persamaan regresi diperoleh nilai IC_{50} senyawa hasil isolasi adalah 232,9 µg/mL, sedangkan standar antioksidan vitamin C menghasilkan IC_{50} sebesar 12,77 µg/mL.

Tabel 2. Nilai absorbansi dan % Inhibisi dari senyawa hasil isolasi dan senyawa standar.

Konsentrasi	Absorbansi rerata		% Inhibisi	
	Senyawa uji	Vitamin C	Senyawa uji	Vitamin C
1000	0,313	0,017	57,10	97,66
500	0,361	0,031	50,48	95,75
250	0,362	0,085	50,35	88,34
125	0,371	0,159	49,11	78,19
62,5	0,380	0,181	47,87	75,17
31,25	0,430	0,218	41,10	70,10
15,625	0,445	0,349	38,96	52,13
7,8125	0,446	0,408	38,82	44,03

Berdasarkan standar tingkat aktivitas antioksidan yang dikemukakan oleh Minami *et al* (1998) senyawa yang termasuk kategori sangat aktif memiliki nilai $IC_{50} < 10$ µg/mL, kategori aktif bila memiliki nilai IC_{50} 10 – 100 µg/mL, dan nilai $IC_{50} > 100$ µg/mL dikategorikan tidak aktif. Berdasarkan kategori ini maka senyawa uji dikategorikan tidak aktif sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

1. Senyawa metabolit sekunder berupa minyak berwarna kuning (0,12 g) telah berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksana batang brotowali dan berdasarkan analisis spektrometri NMR 1D dan

dengan membandingkan data pada literatur disimpulkan senyawa hasil isolasi memiliki kemiripan dengan Bis (-2-etilheksil)ftalat.

2. Uji aktivitas antioksidan dari senyawa murni hasil isolasi dengan metode DPPH menunjukkan IC_{50} 232,9 µg/mL dan dikategorikan tidak aktif sebagai antioksidan

DAFTAR PUSTAKA

Elfita, Muharni, Munawar, Legasari, L., and Darwati. 2011. Antimalaria Compounds from Endophytic Fungi of Brotowali (*Tinospora*

- crispa* L). *Indonesian Journal of Chemistry*. 11(1): 53-58.
- Elfita, Munawar, Muharni, and Suprayetno. 2013a. New Pyran of An Fungus *Fusarium sp* Isolated from The Leaves of Brotowali (*Tinospora crispa*). *Indonesian Journal of Chemistry*. 13(3):209-215.
- Elfita, Munawar, Muharni, and Wahyuni, S. 2013b. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Turunan Ftalat dari Jamur Endofitik Tumbuhan Brotowali (*Tinospora crispa* L). *Seminar Nasional Biodiversitas*, 09 November 2013, Solo.
- Elfita, Munawar, Muharni, and Sudrajat, M.A. 2014. Identification of New Lactone Derivatives Isolated from *Trichoderma sp.*, An Endophytic Fungus of Brotowali (*Tinospora crispa*). *Hayati Journal of Bioscience*. 21 (1), 15-20).
- Fukuda, N., Yonemitsu, M., and Kimura, T. 1983. Studies on the Constituents of the Stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. I. N-Trans-and N-Cis Feruloyl Tiramine, and a New Phenolic Glucosida Tinotuberide. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. Volume 3, 156-161.
- Fukuda, N., Yonemitsu, M., Kimura, T. 1985. Studies on the constituents of the stems of *Tinospora tuberculata* Beumee. II. New diterpenoids, borapetoside A, B, C and borapetol A. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 33(10): 4438-4444.
- Guo, Y., Kojima, K., Lin, L., Fu, X., Zhao, C., Hatano, K., Chen, Y.J., and Ogihara, Y. 1999. A New N-Methyltetrahydroprotoberberine Alkaloid from *Tinospora hainanensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 47(2) : 287-289.
- Hatthakitpanichakul, S. 2001. *Isolation and Synthesis of Active Substances with Cardiac Contractility from Tinospora crispa* Miers. A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science (Chemistry) Graduate School, Kasetsart University.
- Irianti, T., Puspita, S., dan Suryani, E. 2011. Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil Oleh Ekstrak Etanolik Batang Brotowali (*Tinospora Crispa*(L.) Miers) dan Fraksi-Fraksinya. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 138 – 144
- Kamarazaman, I.S., Amom, Zulkhairi, HJ., Ali, R.M., Akim, A.MD., Azman, K.F., Arapoc, D.J., Hassan, M.K.N., Arshad, M.S.M, Shah, Zamree.Md., and Kadir, K.K.A. 2012. Inhibitory Properties of *Tinospora crispa* Extracts on TNF - α Induced Inflammation on Human Umbilical Vein Endothelial. *International Journal of Tropical Medicine*. 7 (1): 24 – 29.
- Minami, H., Hamaguchi, K., Kubo, M., and Fukuyama, Y. 1998. *Phytochemistry*, 49(6): 1783-1785.
- Noor, H and Ascroft, S.J. 1998. Pharmacological Characterization of The Antihyperglycaemic Properties of *Tinospora crispa* Extract. *Journal of Ethnopharmacology*; 62(1): 7-13
- Santa, I.G.P., dan Bambang, P.E.W. 1998. Studi Taksonomi Brotowali (*Tinospora crispa* L Miers) Ex Hook F and Thoms. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*, 4(2) : 27 – 30.
- Zambrut, A. A., Desy, M. G., and Husni, M. M. 1999. *Aktivitas Antimalaria Senyawa Tinokrisposid secara in vivo*. Cermin Dunia Kedokteran. ISSN : 0125-913X.