

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Utama Fraksi Aktif Sitotoksik dari Batang Jambu Kaliang (*Eugenia Cumini* Druce)

Elfita, Lenny Anwar, Achmad Ilham
Jurusan Kimia Fmipa UNSRI

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi komponen utama dari fraksi aktif sitotoksik kulit batang jambu kaliang (*Eugenia cumini* Druce) dengan metoda maserasi menggunakan pelarut methanol. Ekstrak methanol difraksinasi dengan pelarut n-heksan, diklorometan dan diuji aktifitas sitotoksiknya dengan metoda uji kematian larva udang dalam air garam. Fraksi n-heksan menunjukkan aktifitas sitotoksik tertinggi dengan LC_{50} 35 ppm. Dari fraksi n-heksan berhasil diisolasi kristal jarum berwarna putih dengan titik leleh 112-114 °C sebanyak 206,5 mg dan positif steroid. Spektrum ultraviolet senyawa hasil isolasi memberikan serapan maksimum pada λ_{maks} 205,2 nm yang menunjukkan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ untuk ikatan rangkap terisolasi. Spektrum Infra Merah senyawa hasil isolasi memberikan puncak serapan pada bilangan gelombang 3412,8 cm^{-1} , 1049,4 cm^{-1} , 2919,2-2848,7 cm^{-1} , 1648,7 cm^{-1} , 1466,4 cm^{-1} and 1378,4 cm^{-1} , yang masing-masing menunjukkan adanya gugus O-H, C-O alkohol, C-H alifatik, C=C terisolasi, C-H siklopentana and C-H isopropyl. Spektrum massa senyawa hasil isolasi memberikan puncak dasar m/z 213 dan puncak ion molekul pada m/z 414. Berdasarkan data yang ada diduga bahwa senyawa hasil isolasi adalah stigmast-7-en-3-ol dengan rumus molekul $C_{29}H_{50}O$

Kata kunci : Isolasi, aktivitas sitotoksik, Kristal jarum

ABSTRACT

The major compound had been isolated and identified from cytotoxic active of the steam jambu kaliang's (*Eugenia cumini* Druce) by maseration method using methanol. Continuing with fractionation with n-hexane and dichloromethane. n-Hexane fraction showed the highest cytotoxic activity with $LC_{50} = 35ppm$ by Brine Shrimp Lethality Test method. Isolation of n-hexane fraction gave needle's crystal (Mp : 112-114 °C) that positif test to the steroid. The ultraviolet spectra gave maximum absorption at λ_{maks} 205,2 nm $\pi \rightarrow \pi^*$ transition to isolated double bond. The infrared spectra gave absorption peak at 3412,8 cm^{-1} , 1049,4 cm^{-1} , 2919,2-2848,7 cm^{-1} , 1648,7 cm^{-1} , 1466,4 cm^{-1} and 1378,4 cm^{-1} , that indicated fungsional group of O-H, C-O alcohol, C-H aliphatic, C=C isolated, C-H siklopentane and C-H isopropyl. The Mass spectra showed a base peak at m/z 271 and a molecular ion peak at $m/z = 414$. Base on spectroscopy data and compare data base library of massa spectra that is stigmast-7-en-3-ol and exhibited a molecular formula $C_{29}H_{50}O$.

Keywords: Isolated, cytotoxic activity, needle's crystal

PENDAHULUAN

Jambu kaliaang (*Eugenia cumini* Druce) merupakan salah satu tumbuhan yang ada di hutan Sumatera Barat yang banyak digunakan masyarakat sebagai obat tradisional seperti untuk obat sariawan, kencing manis (diabetes), amandel, epilepsi dan diare. Buahnya juga banyak dipergunakan sebagai manisan disamping untuk bahan obat dan merupakan salah satu sumber vitamin C yang murah (Heyne, 1997) Tumbuhan jambu kaliaang juga berkhasiat sebagai peluruh kencing (diuretik), menghentikan batuk, memperbaiki gangguan pencernaan, merangsang keluarnya air liur dan menurunkan kadar glukosa darah (hipoglikemik). Kulit kayu jambu kaliaang berkhasiat untuk peluruh haid (Dalimartha, 2003).

Buah jambu kaliaang mengandung senyawa-senyawa organik antara lain asam betulinat, asam asetil oleanolat aselagat, dan jambolin. Biji mengandung eugianin, sianidin rhamno-glukosida, petunidinfriedelin dan asam-asam organik. Kulit batang mengandung senyawa epifriedelanol, β -sitosterol, petunidin, maluidin, jambolin, minyak atsiri, metilsantoksilin, alkaloid

jambosine, asam organik, triterpenoid, resin yang berwarna merah tua mengandung asam elagat dan tanin (Ngatijan, 2002 dan Dalimartha, 2003).

Melihat penggunaan tumbuhan jambu kaliaang ini sebagai obat tradisional yang diantaranya berhubungan dengan aktivitas sitotoksik dan berdasarkan penelusuran pustaka belum ditemukan laporan tentang uji aktivitas sitotoksik, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui komponen utama fraksi aktif sitotoksik dari kulit batang tumbuhan jambu kaliaang (*Eugenia cumini* Druce). Penelitian ini diawali dengan ekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol, kemudian difraksinasi dengan berbagai pelarut dan diuji aktivitas sitotoksiknya. Fraksi yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi dipisahkan dengan teknik-teknik kromatografi sehingga diperoleh senyawa murni yang merupakan komponen utama. Senyawa murni tersebut diidentifikasi dengan uji fitokimia, spektroskopi UV, IR dan MS.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari 2003 sampai dengan bulan September 2003 di laboratorium Penelitian, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan

Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya. Pengukuran spektrum UV dan GC-MS dilakukan di BATAN Jakarta, sedangkan FTIR di Jurusan Kimia, Institut Teknologi Bandung.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang jambu kaliah yang diambil dari kenagarian Kinari, kecamatan Bukit Sundi, kabupaten Solok, Sumatera Barat. Sampel dibersihkan dikering anginkan pada temperatur kamar sampai berat konstan kemudian digiling halus. Identifikasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Universitas Andalas (AND) Padang.

Bubuk kering kulit batang jambu kaliah (500 gram) diekstraksi dengan cara perendaman (maserasi) dalam metanol selama 5 hari dan diulangi sampai pelarut terlihat bening (tidak meninggalkan noda pada KLT). Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan menguapkan pelarutnya menggunakan rotari evaporator. Ekstrak metanol ini selanjutnya dipartisi cair-cair menggunakan pelarut dengan kepolaran yang meningkat masing-masing dengan n-heksana dan diklorometana. Masing-masing filtrat diuapkan pelarutnya hingga kental dan ditimbang. Setiap fraksi diuji aktifitas

sitotoksiknya untuk mengetahui fraksi yang mempunyai aktivitas tertinggi.

Uji aktifitas sitotoksik dilakukan terhadap ekstrak hasil fraksinasi dengan metoda "Brine Shrimp Lethality Test" yang dimodifikasi (McLaughlin, J.L., 1991).

Isolasi dan Pemurnian Komponen Utama Fraksi Aktif Sitotoksik n heksana dilakukan dimana fraksi n-heksana (1,5 gram) di kromatografi kolom menggunakan silika gel G 60 70-230 mesh (25 gram). Sebelum di kromatografi kolom terlebih dahulu dilakukan pemilihan eluen yang tepat melalui kromatografi lapis tipis (KLT). Sampel disiapkan secara preabsorpsi menggunakan silika gel dengan perbandingan 1:1. Sampel yang telah disiapkan dimasukkan kedalam kolom dengan diameter 2,5 cm, panjang 70 cm, kecepatan alir 15 tetes per menit, dielusi dengan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya yaitu n-heksana : etilasetat dengan perbandingan 10:0 (230 ml), 9:1 (150 ml), 8:2 (330 ml), 7:3 (170 ml), 6:4 (50 ml), 5:5 (50 ml), 4:6 (50 ml), 1:9 (50 ml), 0:10 (35 ml). Eluat ditampung dalam vial-vial (113 vial) masing-masing 10 mL. Setiap vial dilakukan KLT dengan penampak noda serum sulfat, vial-vial dengan pola noda yang sama digabung dan diperoleh 8 fraksi

kolom. Fraksi kolom (F_{I,6}) memperlihatkan pola noda sederhana dan memperlihatkan adanya kristal berwarna kekuningan. Fraksi kolom (F_{I,6}) direkromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel (5 gram), kolom dengan diameter 0,7 cm, panjang 30 cm, kecepatan alir 15 tetes per menit, dielusi dengan pelarut n-heksana : diklorometana : etilasetat (8:1:2). Eluat ditampung dalam 17 vial masing-masing 5 ml. Setelah di KLT diperoleh 2 fraksi kolom. Fraksi kolom F_{II,1} memperlihatkan adanya kristal tetapi belum murni sehingga dilakukan rekromatografi kolom menggunakan eluen n-heksana : diklorometana : etilasetat (7:1:3) dengan kondisi kolom yang sama seperti pada rekromatografi kolom kedua. Eluat ditampung dalam 44 vial masing-masing 5 ml, kemudian di KLT dan diperoleh 3 fraksi kolom. Fraksi kolom F_{III,2} diperoleh kristal putih (206,5 mg) yang merupakan komponen utama yang memiliki satu noda sehingga diduga sudah murni. Bagan kerja secara lengkap tertera pada lampiran 4.

Uji kemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan KLT menggunakan eluen n-heksana : etilasetat (5:5), etilasetat : diklorometana (3:7), n-heksana : aseton (7:3) dan KLT 2-dimensi menggunakan eluen n-

heksana : aseton (7:3) dan (5:5) serta pengukuran titik leleh dengan Fisher John Melting Point dan kromatografi gas. Identifikasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan uji fitokimia, spektroskopi UV, IR dan MS

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi kulit batang jambu kaliaang (500 gram) dengan cara maserasi menggunakan methanol diperoleh ekstrak kental 20,35 gram. Fraksinasi ekstrak metanol secara partisi menghasilkan 2,5 gram fraksi kental n-heksana, 1,5 gram fraksi kental diklorometana dan 15,52 gram fraksi kental metanol. Hasil uji aktivitas sitotoksik terhadap ekstrak dan hasil fraksinasi tertera pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak fraksi-fraksi kulit batang jambu kaliaang

Fraksi	LC ₅₀ (ppm)
n-heksana	35
diklorometana	42
methanol	46

Fraksi n-heksana menunjukkan sifat aktif sitotoksik tertinggi (LC₅₀ = 35 ppm) dibandingkan dengan fraksi

diklorometana ($LC_{50} = 42$ ppm) dan fraksi methanol ($LC_{50} = 46$ ppm). Fraksi n-heksana dilanjutkan untuk dilakukan pemisahan. Menurut Meyer (1982) fraksi dikatakan aktif pada konsentrasi dibawah 1000 ppm.

Hasil isolasi terhadap ekstrak pekat n-heksana dengan kromatografi kolom diperoleh 8 fraksi, seperti yang tertera pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil kromatografi kolom I

Fraksi kolom I	Nomor vial	Berat (mg)
F _{I-1}	1-20	125,6
F _{I-2}	21-27	187,0
F _{I-3}	28-31	281,0
F _{I-4}	32-36	180,3
F _{I-5}	37-43	64,3
F _{I-6}	44-49	342,1
F _{I-7}	50-70	68,3
F _{I-8}	71-113	92,1

Fraksi kolom keenam (F_{I-6}) memperlihatkan pola noda yang sederhana dengan jumlah yang paling banyak dan memperlihatkan adanya kristal yang berwarna putih, sehingga dilanjutkan pada tahap pemisahan atau pemurnian dengan kromatografi kolom kedua Hasil dari kromatografi kolom kedua tertera pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil kromatografi kolom II

Fraksi kolom II	Nomor vial	Berat (mg)
F _{II-1}	1-13	321,2
F _{II-2}	14-17	19,1

Fraksi kolom F_{II-1} mempunyai jumlah yang paling banyak dan memperlihatkan adanya kristal tetapi belum murni, sehingga dilakukan kromatografi kolom ketiga. Hasil dari kromatografi kolom ketiga tertera pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil kromatografi kolom III

Fraksi kolom II	Nomor vial	Berat (mg)
F _{III-1}	1-5	28
F _{III-2}	6-10	206,5
F _{III-3}	11-44	85,6

Fraksi kolom F_{III-2} memberikan kristal putih berbentuk jarum sebanyak 206,5 mg yang merupakan komponen utama dan di KLT menunjukkan satu noda sehingga diduga kristal hasil isolasi ini sudah murni.

Uji kemurnian kristal hasil isolasi pada berbagai eluen yaitu n-heksana : etilasetat (5:5), etilasetat : diklorometana (3:7) dan n-heksana : aseton (7:3) dengan penampak noda serium sulfat menunjukkan

noda tunggal serta uji KLT 2-dimensi dengan penampak noda yang sama pada perbandingan eluen n-heksana : aseton (7:3) dan (5:5) juga memberikan noda tunggal. Pengukuran titik leleh memberikan nilai 112-114 °C mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi sudah murni karena senyawa diduga murni bila jarak titik lelehnya berkisar antara 1-2 °C (Ikan, 1989)

Analisa dengan spektrum ultraviolet (lampiran) memberikan serapan pada panjang gelombang 205,2 nm yang memperlihatkan terjadinya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$

terisolasi. Hal ini didukung oleh uji fitokimia yang positif steroid. Pada kebanyakan senyawa steroid golongan sterol, ikatan rangkap ditemukan dalam keadaan terisolasi baik dalam kerangka dasar maupun pada rantai samping. Ikatan rangkap terisolasi akan memberikan serapan maksimum pada daerah disekitar 200 nm (Silverstein, 1985; Creswell, 1982; Sujadi, 1986).

Spektrum infra merah (lampiran) memperlihatkan adanya serapan-serapan karakteristik pada daerah bilangan gelombang seperti tertera pada tabel 5.

Tabel 5. Gugus-gugus karakteristik Spektrum Infra Merah senyawa hasil isolasi

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Bentuk Pita	Intensitas	Gugus Terikat
3412,8	Lebar	Kuat	Ulur OH
2919,2-2848,7	Tajam	Kuat	Ulur C-H alifatik
1648,7	Tajam	Sedang	Ulur C=C tak terkonjugasi
1466,6	Tajam	Sedang	Tekuk C-H siklopentana
1378,4	Tajam	Sedang	Tekuk C-H isopropil
1049,4	Tajam	Sedang	Ulur C-O alkohol

Spektrum Infra Merah mengindikasikan adanya gugus OH muncul pada bilangan gelombang 3412,8 cm⁻¹ yang diperkuat dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang 1049,4 cm⁻¹ yang khas untuk ulur C-O alkohol Pita serapan pada

bilangan gelombang 2919,2-2848,7 cm⁻¹ menunjukkan vibrasi C-H alifatik yang selalu muncul dengan dua pita terbelah. Munculnya puncak pada bilangan gelombang 1648,7 cm⁻¹ menunjukkan adanya ulur C=C tak terkonjugasi yang khas dimiliki oleh steroid

yang juga didukung oleh data ultraviolet yaitu adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ pada panjang gelombang 205,2 nm untuk C=C terisolasi. Ciri khas steroid yang lain muncul pada bilangan gelombang 1466,6 cm^{-1} yang merupakan tekuk C-H siklopentana dan bilangan gelombang 1378,4 cm^{-1} untuk gugus C-H isopropil.

Analisis dengan kromatografi gas (lampiran) memperlihatkan adanya satu puncak yang tinggi pada waktu retensi (Rt) 7 menit yang juga terdapat puncak rendah kemungkinan disebabkan oleh pengotor atau senyawa lain yang konsentrasinya sangat kecil sehingga tidak terdeteksi. Tetapi hal tersebut tidak mempengaruhi terhadap pengukuran spektroskopi karena pengotor tersebut berada dalam jumlah yang sedikit sekali. Pada spektrum massa (lampiran 10) terlihat bahwa senyawa hasil isolasi memiliki puncak ion molekul pada m/z 414 yang berarti berat molekul senyawa hasil isolasi adalah 414. Puncak dasar muncul pada m/z 213 yang sekaligus merupakan ciri khas pembelahan senyawa steroid. Ciri khas steroid yang lain muncul pada m/z 396, m/z 381, m/z 273, m/z 255, m/z 231 dan m/z 119.

Fragmentasi pada m/z 273 terbentuk dengan hilangnya molekul radikal

$\text{C}_{10}\text{H}_{21}$ (massa 141) dari puncak m/z 414. Munculnya puncak m/z 273 ini menunjukkan adanya cincin siklopentanaperhidrofenantren yang didalamnya terdapat ikatan rangkap. Ciri khas kerangka dasar steroid muncul pada puncak m/z 255 dengan hilangnya molekul netral H_2O (massa 18) dari puncak m/z 273, puncak m/z 213 dari m/z 231 dan puncak m/z 396 dari puncak m/z 414, data ini memperkuat adanya gugus OH pada spektrum inframerah. Puncak dasar m/z 213 pada senyawa hasil isolasi muncul dengan hilangnya molekul radikal C_3H_6 (massa 42) dari puncak m/z 255 dan dari puncak m/z 231.

Berdasarkan data base library senyawa yang memiliki berat molekul 414 rumus molekulnya $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, DBE 5 yang terdiri dari 4 siklik dengan 1 ikatan rangkap sesuai untuk kerangka stigmasta. Berdasarkan uji fitokimia yang positif steroid didukung oleh data spektrum ultraviolet yang menunjukkan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ terisolasi pada panjang gelombang 205,2 nm, data spektrum IR yaitu adanya gugus OH, C=C terisolasi, siklopentana dan isopropil, data spektrum massa yaitu adanya pola fragmentasi m/z 414, m/z 396, m/z 381, m/z 273, m/z 255, m/z 231 dan m/z 119, maka

diusulkan komponen utama hasil isolasi adalah senyawa Stigmast-7-en-3-ol, rumus molekul $C_{29}H_{50}O$ yang sesuai dengan data base library dengan kemiripan 92,4%. Struktur senyawa hasil isolasi adalah sebagai berikut :



KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini antara lain :

1. Nilai LC_{50} (ppm) masing-masing fraksi kulit batang jambu kaliang adalah n-heksana 35 ppm, diklorometana 42 ppm dan metanol 46 ppm, yang merupakan aktif sitotoksik karena $LC_{50} < 1000$ ppm.
2. Fraksi aktif n-heksana berhasil diisolasi senyawa golongan steroid yang berupa kristal putih sebanyak 206,5 mg berbentuk jarum dengan titik leleh 112-114 °C. Berdasarkan analisa spektrum UV, IR dan GC-MS diduga bahwa

senyawa tersebut adalah stigmast-7-en-3-ol ($5\alpha, 3\beta, 24S$).

Saran

1. Agar penelitian ini dapat dilanjutkan dengan mencari senyawa aktif pada fraksi aktif sitotoksik yaitu pada fraksi diklorometana dan mengusulkan struktur molekulnya.
2. Melanjutkan analisa spektroskopi lebih lanjut dengan spektroskopi ^{13}C -NMR dan 1H -NMR untuk menentukan secara tepat struktur steroid hasil isolasi tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Creswell, J. Clifford, Rungquist, A. Olaf, Campbell, M. Malcom., 1982, *Analisa Spektrum Senyawa Organik*, Penerbit ITB, Bandung.
- Dalimartha, S., 2003, Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Farnsworth, N.R., 1996, Biological And Phytochemical Screening Plant, Pharm, Sci, 55: 245-246.
- Meyer, B.N, Ferrigni, n.r Putnam, J.E, Jacobsen, L.B, Nicholas, D.E & McLaughlin, J.L., 1982, "Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant

- Constituents”, *Journal of Medicinal, Planta Medica* 45 : 31-34.
- Ngatijan., 2002., *Seri Pengalaman Obat Tradisional Sembuhkan Mereka*, Redaksi Trubus, Jakarta.
- Sudjadi. M.J., 1983., *Penentuan Struktur Senyawa Kimia*, Penerbit Galia Indonesia, Bandung.
- Silverstein, Bassler and Morrill., 1989., *Penyelidikan Spektrometrik Senyawa Organic*, Penerjemah Drs. A.J. Hartono, Dra. Anny Victor Purba, M.Sc, Edisi Keempat, Penerbit Erlangga, Jakarta.