

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF ANTIRADIKAL BEBAS DARI KULIT BATANG KEPUH (*Sterculia foetida* L.)

Ni Wayan Rika Kumara Dewi^{1*)}, Made Dwiki Swari Santi¹

¹ STIKES Bali Wisnu Dharma Denpasar, Indonesia

*) Correspondent author email: rikakumara1987@gmail.com

ABSTRACT

The present study was conducted to determine anti free radical activity compound from the bark of kepuh (*Sterculia foetida* L.). In vitro antioxidant activity was carried out withing DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The separation was conducted by column chromatography and than identification by using FTIR and UV-Vis spectrophotometer. The result of maceration that has activity is ethanol extract. Then partitioned with ethyl acetate and chloroform, obtained chloroform extract which showed the highest free radical activity test results and continued with the separation technique. The extracts were separated by column chromatography with silica gel as the stationary phase. Separation and purification resulted in 9 combined fractions (A, B, C, D, E, F, G, H, I). Based on the free anti -radical test, all fractions showed a positive free anti -radical result, which is relatively pure in KLT is the B fraction in the form of a light yellow powder weighing 0.0325 grams. Identification with the Liebermann Burchard reaction showed FB isolates to be a group of triterpenoid compounds. The UV-Vis spectra of FB isolates with two main peaks appearing at 212 nm wavelength as λ max is thought to be the type of transition occurring at 212 nm wavelength likely due to the occurrence of an electronic transition from $n-\sigma^*$ of chromophore $C = O$ and the peak another in the form of a shoulder at a wavelength of 284 nm is caused by the occurrence of an $n-\pi^*$ electronic transition from a $C = O$ double bond. This hypothesis is reinforced by data from the infrared spectrum showing the presence of functional clusters $-OH$, CH aliphatic, $C = O$, $C = C$ aliphatic, and $C-O$.

Keywords: *Sterculia foetida* L., anti free radicals, triterpenoid

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan senyawa aktif antiradikal bebas dari kulit batang kepuh (*Sterculia foetida* L.). Uji aktivitas dilakukan secara invitro dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl). Teknik pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom dan diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis. Hasil maserasi yang memiliki aktivitas adalah ekstrak etanol. Selanjutnya dipartisi dengan etil asetat dan kloroform, diperoleh ekstrak kloroform yang menunjukkan hasil uji aktivitas antiradikal bebas yang paling tinggi dan dilanjutkan teknik pemisahan. Ekstrak dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel. Pemisahan dan pemurnian menghasilkan 9 fraksi gabungan (A, B, C, D, E, F, G, H, I). Berdasarkan uji antiradikal bebas, semua fraksi menunjukkan hasil positif antiradikal bebas, yang relatif murni secara KLT adalah fraksi B yang berbentuk serbuk berwarna kuning muda seberat 0,0325 gram. Identifikasi dengan pereaksi Liebermann Burchard menunjukkan isolat F_B adalah golongan senyawa triterpenoid. Spektrum UV-Vis dari isolat F_B dengan dua puncak utama yang muncul pada panjang gelombang 212 nm sebagai λ maks diduga jenis transisi yang terjadi pada panjang gelombang 212 nm kemungkinan

diakibatkan oleh terjadinya transisi elektronik dari $n-\sigma^*$ dari kromofor C=O dan puncak yang lain berupa bahu pada panjang gelombang 284 nm diakibatkan oleh terjadinya transisi elektronik $n-n^*$ dari ikatan rangkap C=O. Dugaan ini diperkuat oleh data dari spektrum inframerah yang menunjukkan adanya gugus fungsi -OH, CH alifatik, C=O, C=C alifatik, dan C-O.

Kata kunci : *Sterculia foetida L.*, antiradikal bebas, triterpenoid

PENDAHULUAN

Kepuh adalah salah satu jenis pohon kerabat jauh kapuk randu yang sering disebut randu alas karena banyak tumbuh di hutan atau disebut pranajiwa. Kepuh (*Sterculia foetida L.*) merupakan tumbuhan multi fungsi yang saat ini terancam punah. Berbagai tindakan illegal logging, konversi kawasan, serta adanya dormansi kulit menjadi tantangan dalam pelestarian kepuh di alam (Arya dkk, 2015).

Sterculia foetida L. daunnya digunakan sebagai obat pencahar, diuretik, dan serangga penolak dalam pengobatan herbal (Doan *et al*, 2019). Kepuh banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional dalam menyembuhkan beberapa macam penyakit seperti rematik, TBC, dan pusing. Secara ilmiah kepuh telah terbukti mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi dan analgesik (Maryanti dkk, 2014). Akar, daun, biji, dan kulit batang spesies ini telah dilaporkan mengandung sejumlah flavonoid, fenolik,

steroid, kumarin, fenilpropanoid, dan serebrosida (Doan *et al*, 2019).

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang kepuh sebesar 50,29% pada menit ke-5 dan 97,11% pada menit ke-60. Kereaktifan ekstrak etanol kulit batang kepuh kemungkinan disebabkan senyawa yang lebih aktif dalam menangkal radikal bebas dan juga disebabkan terjadinya mekanisme reaksi penghambatan radikal bebas secara sinergis dari beberapa senyawa golongan asam karboksilat (Gunawan dkk, 2015).

Uji fitokimia terhadap ekstrak etanol 20% kulit batang Kepuh menunjukkan hasil positif adanya senyawa golongan steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, tanin, dan polifenol (Cahyani dkk, 2019).

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, perlu dilakukan identifikasi senyawa aktif anti radikal bebas atau antioksidan pada kulit batang Kepuh karena belum ada yang menyatakan

senyawa aktif apa yang memberikan aktivitas anti radikal bebas tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif anti radikal bebas pada kulit batang Kepuh.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan Kepuh (*Sterculia foetida* L.) di Desa Dauh Puri Kauh, Pura majapahit, Banjar Monang-Maning, Denpasar Barat, Bali. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis adalah akuades, *n*-heksana (C₆H₁₄) teknis dan p.a, etanol (C₂H₅OH) teknis, metanol (CH₃OH) p.a, kristal DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil*), dietil-eter ((C₂H₅)₂O) p.a, etil asetat (CH₃COOC₂H₅) teknis dan p.a, kloroform (CHCl₃) teknis dan p.a, pereaksi pendeteksi (saponin, flavonoid, polifenol, dan triterpenoid), silika gel GF₂₅₄, dan silika gel 60 (70 – 230 mesh).

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat gelas, penguap putar vakum, corong pisah, statif, klep, labu alas bundar, pipet tetes, pipet volume, seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), seperangkat alat kromatografi kolom, lampu UV 254

nm dan 366 nm, botol semprot, timbangan elektronik, spektrofotometer UV-Vis (UV-Shimadzu), dan spektrofotometer inframerah (IR-TUCK Scientific M-500).

Prosedur Kerja

Ekstraksi

Sebanyak 1 kg kulit batang Kepuh dicuci dan dipotong kecil-kecil, selanjutnya dikeringkan selama ± 5 hari dengan cara di angin-anginkan. Sampel yang sudah kering dihaluskan hingga diperoleh dalam bentuk serbuk. Sampel dimaserasi dengan pelarut *n*-heksana selama 24 jam dan dimaserasi lagi sampai tidak ada noda lagi pada plat KLT saat dilakukan pengujian. Maserasi dihentikan apabila tidak terlihat noda gelap pada plat KLT dan membandingkannya dengan noda dari pelarut *n*-heksana, sehingga diperkirakan lemak dan senyawa yang larut dalam *n*-heksana terekstrak sempurna. Ekstrak kemudian disaring dan filtratnya kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 45°C sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana. Ampas dari kulit batang kepuh yang sudah kering kemudian dimaserasi lagi dengan etanol selama 24 jam. Maserasi dilakukan

berulang kali sampai tidak ada noda lagi pada plat KLT saat dilakukan pengujian. Maserasi diberhentikan jika tidak terlihat noda gelap pada plat KLT sehingga diperkirakan senyawa yang dapat terekstraksi dalam etanol terekstrak sempurna. Ekstrak kemudian disaring dan filtratnya kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur $\pm 60^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh ekstrak kental etanol. Ekstrak kental n-heksana dan etanol kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antiradikal bebas. Ekstrak kental etanol selanjutnya dilarutkan dalam campuran etanol-air dengan perbandingan 7 : 3. Ekstrak etanol-air diuapkan sampai etanolnya habis sehingga diperoleh ekstrak air saja. Ekstrak air dipartisi dengan kloroform sebanyak sehingga didapat dua lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan kloroform kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sehingga menghasilkan ekstrak kental kloroform. Lapisan air selanjutnya dipartisi kembali dengan etil asetat. Lapisan etil asetat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur $\pm 40^{\circ}\text{C}$ sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat.

Terhadap kedua ekstrak yang diperoleh yaitu ekstrak kental kloroform dan etil asetat dilakukan uji aktivitas antiradikal bebas. Ekstrak yang aktif selanjutnya dilakukan pemisahan dan pemurnian.

Pengukuran Aktivitas Antiradikal Bebas dengan DPPH

Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Sampel dibuat dalam konsentrasi 8000 ppm. Larutan DPPH dibuat dalam konsentrasi 0,004 % (b/v). Pengukuran absorbansi DPPH dilakukan pada λ 497 nm, 517 nm, dan 537 nm. Pengukuran absorbansi sampel dilakukan dengan memasukkan 1,0 mL sampel kedalam kuvet dan ditambahkan 2,0 mL DPPH. Campuran diaduk menggunakan pipet. Pada menit ke-5 dan ke-60 setelah reaksi berlangsung dilakukan pengukuran pada λ 497 nm, 517 nm, dan 537 nm. Catat absorbansi yang diperoleh dari pengukuran absorbansi DPPH dan sampel (gunawan).

Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan dan pemurnian dapat dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi kolom sampai diperoleh isolat yang

memiliki aktivitas antiradikal bebas dan relatif murni. Eluen yang digunakan pada kromatografi kolom adalah n-heksana : etil asetat : kloroform (3 : 4 :1).

Skrining Fitokimia

Pereaksi pendeteksi golongan senyawa flavonoid

- Test dengan NaOH 10% : sedikit isolat dalam pelarut alkohol ditambahkan beberapa tetes NaOH 10% reaksi positif apabila terjadi perubahan warna yang spesifik.
- Test Wilstatter : sedikit isolat dalam pelarut alkohol ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan sedikit serbuk Mg, reaksi positif apabila memberikan warna yang spesifik.
- Test Bate Smith Met-Calfe : sedikit isolat dalam pelarut alkohol ditambahkan beberapa tetes HCl pekat kemudian dipanaskan, reaksi positif apabila memberikan warna merah yang konsisten.

Pereaksi pendeteksi golongan senyawa triterpenoid

- Pereaksi Liebermann-Burchard : sedikit isolat ditambahkan dengan satu tetes asam sulfat pekat dan dua tetes asam asetat anhidrat. Senyawa triterpenoid akan memberikan

warna merah-ungu-coklat, sedangkan untuk senyawa steroid akan memberikan warna biru-hijau.

- Pereaksi H₂SO₄ 50% : sedikit isolat ditambahkan satu tetes asam sulfat 50%. Senyawa triterpenoid akan memberikan warna merah-ungu-coklat, sedangkan untuk senyawa steroid akan memberikan warna biru-hijau.

Pereaksi pendeteksi golongan senyawa saponin

Sedikit isolat dalam tabung reaksi ditambahkan dengan akuades kemudian dipanaskan kira-kira lima menit dan dikocok kuat-kuat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil kira-kira sepuluh detik setelah dikocok.

Pereaksi pendeteksi golongan senyawa polifenol

Sedikit isolat dalam tabung reaksi ditambahkan dengan pereaksi besi (III) klorida 1% dalam akuades. Reaksi positif jika memberikan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

Identifikasi Senyawa Aktif

Antiradikal Bebas

Hasil isolat yang didapatkan dari kromatografi kolom dianalisis dan diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer

ultra violet-visible dan spektrofotometer inframerah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Dari 1 Kg serbuk kulit batang Kepuh dimaserasi sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana berwarna kuning muda sebanyak 12,01 g. Ampas dari hasil maserasi tersebut kembali dimaserasi dengan etanol sehingga diperoleh juga ekstrak kental etanol sebanyak 23,10 g. Ekstrak kental etanol diambil sebanyak 20 g dan dilarutkan dengan etanol : air (7:3). Larutan ekstrak tersebut diuapkan etanolnya sampai habis, sehingga diperoleh ekstrak air. Ekstrak air dipartisi dengan kloroform dan diperoleh ekstrak kental kloroform sebanyak 3,04 g berwarna coklat kemerahan. Ekstrak air dipartisi kembali dengan etil asetat dan diperoleh ekstrak kental etil asetat sebanyak 0,54 g berwarna merah kecoklatan. Ekstrak air kemudian dievaporasi dan diperoleh ekstrak kental air sebanyak 1,25 g berwarna merah tua dengan butiran kristal bening.

Pengukuran Aktivitas Antiradikal Bebas dengan DPPH

Hasil analisis aktivitas antiradikal bebas terhadap DPPH

menunjukkan ekstrak kental kloroform lebih aktif sebagai antiradikal bebas daripada ekstrak kental etil asetat karena menghasilkan persentase peredaman yang lebih besar. Ekstrak kental kloroform pada menit ke 5 memiliki % peredaman sebesar 63,05% dan menit ke 60 memiliki % peredaman sebesar 97,84%. Sedangkan ekstrak kental etil asetat pada menit ke 5 memiliki % peredaman sebesar 50,29% dan menit ke 60 memiliki % peredaman sebesar 97,11%. Sehingga ekstrak kental kloroform dilanjutkan untuk pemisahan dan pemurnian selanjutnya.

Pemisahan dan Pemurnian

Pemisahan ekstrak kental kloroform kulit batang Kepuh dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen *n*-heksana : etil asetat : kloroform (3:4:1) menghasilkan 117 fraksi yang selanjutnya diuji dengan kromatografi lapis tipis. Fraksi-fraksi yang menunjukkan noda dengan pola pemisahan yang sama digabungkan sehingga diperoleh 9 kelompok fraksi ($F_A, F_B, F_C, F_D, F_E, F_F, F_G, F_H, F_I$). Fraksi yang menunjukkan noda tunggal yaitu F_B, F_C, F_G, F_I kemudian diuji kemurnian secara KLT dengan berbagai fase gerak. Hasil yang

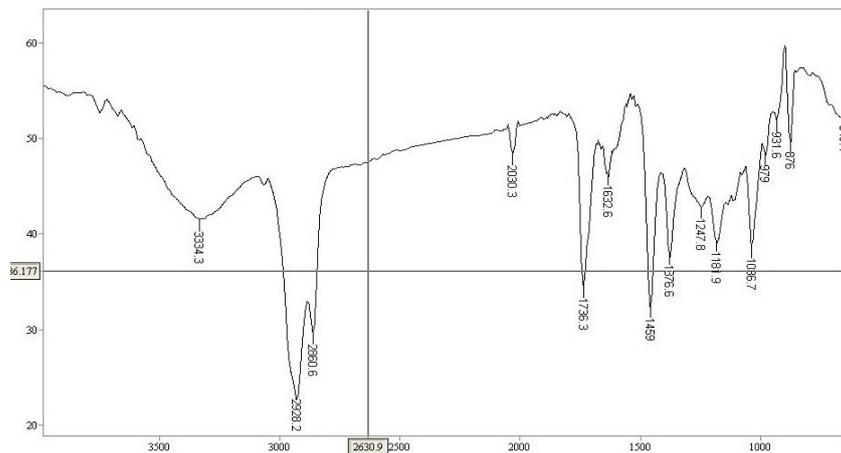
diperoleh menunjukkan F_B memberikan noda tunggal dan relatif murni secara KLT. Setelah itu isolat F_B diuji aktivitas antiradikal bebasnya. Hasil yang diperoleh yaitu pada menit ke 5 memiliki % peredaman sebesar 62,36% dan menit ke 60 memiliki % peredaman sebesar 72,90%.

Hasil uji fitokimia isolat F_B menunjukkan hasil positif adanya senyawa golongan triterpenoid. Fraksi B selanjutnya diidentifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dan IR.

Analisis Spektra Inframerah Isolat F_B

Spektra yang dihasilkan oleh isolat F_B menunjukkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, diantaranya adalah pada bilangan gelombang $3334,3 \text{ cm}^{-1}$ adalah serapan OH *stretching* terikat dan didukung adanya serapan pada daerah bilangan gelombang $1247,8$

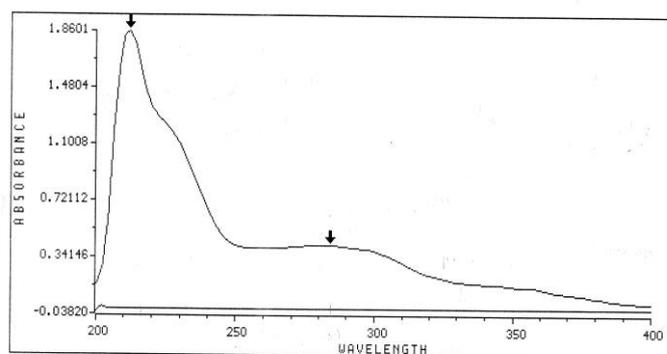
cm^{-1} yang diduga serapan C-O. Pita serapan pada daerah bilangan gelombang $2928,2 \text{ cm}^{-1}$ dan $2860,6 \text{ cm}^{-1}$ adalah serapan untuk CH alifatik (CH_3 dan CH_2 *stretching*) yang didukung adanya serapan pada daerah bilangan gelombang 1459 cm^{-1} dan $1376,6 \text{ cm}^{-1}$ yang diduga serapan CH_2 *bending* dan CH_3 *bending*. Pita serapan pada daerah bilangan gelombang $1736,3 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=O yang didukung dengan adanya serapan pada daerah bilangan gelombang $1247,8 \text{ cm}^{-1}$ yang diduga serapan C-O. Adanya serapan melebar OH dan didukung serapan tajam C=O yang merupakan ciri khas dari asam karboksilat. Pita serapan pada daerah bilangan gelombang $1632,6 \text{ cm}^{-1}$ terdapat C=C alifatik *stretching* yang didukung oleh serapan pada bilangan gelombang 979 cm^{-1} yang diduga serapan CH alkena.

Gambar 1. Spektrum Inframerah isolat F_B

Berdasarkan data-data tersebut maka diduga isolat F_B mempunyai gugus fungsi -OH, CH alifatik, C=O, C=C alifatik, dan C-O. Dugaan ini diperkuat oleh data dari spektrum Ultraviolet Visibel dari isolat F_B.

Analisis Spektrum UV-Vis Isolat F_B

Karakteristik isolat F_B dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh spektrum dengan dua puncak utama yang muncul pada panjang gelombang 212 nm sebagai λ maks dan puncak yang lain berupa bahu pada panjang gelombang 284 nm seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.

Gambar 2. Spektrum UV-Vis isolat F_B

Hal ini diduga jenis transisi yang terjadi pada panjang gelombang 212 nm kemungkinan

diakibatkan oleh terjadinya transisi elektronik dari $n \rightarrow \sigma^*$ dari kromofor C=O. Serapan yang landai pada

panjang gelombang 284 nm kemungkinan diakibatkan oleh terjadinya transisi elektronik $n-n^*$ dari ikatan rangkap C=O. Dari data dengan spektrum inframerah, UV-Vis, dan uji fitokimia menunjukkan bahwa isolat diduga adalah senyawa triterpenoid.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa isolat F_B diduga merupakan jenis golongan triterpenoid dan memiliki aktivitas antiradikal bebas. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menganalisis isolat F_B dengan GC-MS dan spektrometri NMR.

DAFTAR PUSTAKA

Arya A.M., Ervival A.M., Zuhud, Agus Hikmat, 2015, 'Populasi, Sebaran dan Asosiasi Kepuh (*Sterculia foetida L.*) di Kabupaten Sumbawa Nusa Tenggara Barat', Media Konservasi, Vol. 20, No. 3, hh. 277-287.

Doan Tran Duy Cuong, Ha Tuan Dat, Nguyen Trung Duan, Pham Dinh Thuong, Nguyen Tan Phat, Mai Dinh Tri, Dang Van Son, Nguyen Thi Hoa, Phan Nguyen Kim Tuyen, Nguyen Kim Phi Phung, 2019, 'Isolation and Characterization of Six Flavonoids from The Leaves of *Sterculia foetida Linn*', Vietnam J. Chem, 57 (4), 438-442.

Gunawan I W.G. dan Karda I M., 2015, 'Identifikasi Senyawa Minyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kepuh (*Sterculia foetida L.*)', Chem. Prog., Vol.8, No.1, hh. 12-16.

Cahyani N.P.S.E., Susiarni J., Dewi K.C.S., Melyandari N.L.P., Putra K.W.A., Swastini D.A., 2019, 'Karakteristik dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Batang Kepuh (*Sterculia foetida L.*)', Jurnal Kimia (Journal of Chemistry), 13 (1), hh. 22-28.

Maryanti A. dan Hendarti R.L., 2014, Budidaya Kepuh (*Sterculia foetida L.*) untuk Antisipasi Kondisi Kering, IPP Press, Bogor.