

ISOLASI DAN KARAKTERISASI RUNUTAN SENYAWA METABOLIT SEKUNDER FRAKSI ETIL ASETAT DARI UMBI BINAHONG (*Anredera cordifolia* [Tenore] steenis)

Wahyu Diah Proborini^{1*}, Chaidir²

¹PS. Teknik Kimia, Fak. Teknik, Universitas Tribhuhana Tunggaladewi Malang

² BPPT (Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi) BRIN

*email Corresponding Author : wahyu.diah@unitri.ac.id

Abstract

Plant secondary metabolites, as products of secondary metabolism, are a tremendous available resource for pharmacy whether traditional or modern medicine system. Binahong (*Anredera cordifolia* [Tenore] *steenis*), also known as Madeira vine, is a medicinal plant that has been empirically recognized for several pharmacological compounds. This plant has also been utilized widely in the society for years as anti-oxidant, antiinflammation, anti-fungal, anti-bacteria, anti-diabetic and anti-cancer. Specifically, the research is aiming to identify molecular structure of secondary metabolite compound in ethyl acetate fraction of binahong roots using analytical HPLC while structure elucidation was done by LC-ESI MS, H-NMR and C-NMR. Analytical HPLC of ethyl acetate fraction has showed major peak on its separated derivative fraction, that is coded Ef 1.2 and Ef 1.3, on time retention 37,7 and 37,4 respectively. Considering the significant amount of Ef 1.2 fraction, then it is used in continued analysis rather than Ef 1.3 fraction. In addition, determination of molecular weight using LC-ESI MS resulted the number of molecular weight of Ef 1.2 fraction which is 296,22 Da (m/z). The molecular weight has closest possibility with empirical formula that is loaded from <http://www.chemspider.com>, is C₂₀H₃₄O. Characterization through H-NMR and C-NMR for its carbon-hydrogen framework was confirmed that the compound of Ef 1.2 is terpenoid named phenanthrena.

Keyword: binahong roots, ethyl acetate fraction, H-NMR, C-NMR

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis dan memiliki keanekaragaman spesies tanaman. Tanaman merupakan sumber terbaik senyawaan metabolit sekunder dimana perkiraan total jumlah metabolit sekunder secara keseluruhan adalah lebih dari 500.000 dan kurang lebih 100.000 senyawa metabolit sekunder dengan berat molekul (BM) rendah telah screening menghasilkan penemuan senyawaan obat yang terbukti klinis

memiliki peran penting dalam pengobatan penyakit pada manusia. Obat-obatan dari industri farmasi besar mengandung 25% senyawa aktif hasil ekstraksi dan isolasi tanaman obat (Supriadi, 2011) dan 60% obat anti tumor dan anti infeksi yang secara komersial telah beredar atau masih dalam taraf uji coba klinis merupakan senyawa hasil isolasi dari tanaman (Clardy and Walsh, 2014). Selain itu tanaman masih menjadi sumber utama

bahan baku obat yang sangat inovatif terutama untuk **kanker, lipid-disorders**, immunomodulatin dan penyakit-penyakit infeksi yang disebabkan oleh jamur atau bakteri (Muller, et.al., 2001) sehingga hal ini menunjukkan bahwa tanaman obat memberikan kontribusi besar dalam perkembangan obat-obatan. Kebutuhan obat-obatan inovatif dalam industri farmasi masih sangat besar. Penemuan struktur molekul baru dari senyawaan metabolit sekunder tanaman yang bersifat bioaktif akan mendukung perkembangan kimia medisinal. Oleh diidentifikasi dari tanaman (Zhang, et.al., 2004).

Analisis sifat farmakologis metabolit sekunder dari tanaman dengan cara karena itu, identifikasi senyawa bioaktif tanaman serta analisis aktivitas dan farmakologisnya masih merupakan tantangan besar yang harus dilakukan untuk mengembangkan keberagaman molekul yang bersifat farmakologis yang akan menjadi standar sediaan farmasi. Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* [Tenore] *steenii*) — Madeira vine, sebagai salah satu tanaman obat yang dikenal luas oleh masyarakat Indonesia mengandung banyak senyawaan kimia yang bersifat bioaktif. Penelitian Uchida 2003, menjelaskan bahwa terdapat kandungan asam askorbat dan total fenol yang cukup tinggi dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Binahong diketahui mampu melawan bakteri gram positif seperti *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*, selain itu juga mampu melawan bakteri gram negatif seperti *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* dan *Enterobacter aerogenes* (Jadulco, 2002).

Hal ini disebabkan karena binahong memiliki kandungan asam oleanolik (Harborne, 2007). Asam oleanolik tersebut juga memiliki kemampuan sebagai anti inflamasi dan mengurangi rasa nyeri pada luka bakar (Tshiklange, 2007). Asam oleanolik merupakan golongan triterpenoid yang merupakan antioksidan pada tanaman. Triterpenoid adalah golongan senyawa terpenoid hasil metabolisme sekunder pada tanaman dimana golongan terpenoid ini merupakan minyak atsiri yang dapat berfungsi sebagai pelindung bagi tanaman dari gangguan hama (Lenny, 2006). Chuang, et.al., 2007 menemukan adanya protein ancordin dengan berat molekul (BM) besar sekitar 23 kDa pada tanaman binahong. Protein tersebut mampu menstimulasi produksi nitrit oksida. Binahong mengandung triterpenoid saponin seperti boussingoside A1 yang mempunyai aktivitas hipoglikemik dimana beberapa boussingoside yang mengandung triterpenoid lainnya adalah larreagenin A merupakan derivat asam oleanolat dan asam ursolat (Harborne, 2007). Hasil penelitian Nurhadiyanta 2008, disebutkan bahwa fraksi etil asetat dari umbi binahong memiliki bioaktivitas paling tinggi.

METODE PENELITIAN

Ekstraksi dan Fraksinasi

Fraksi etil asetat diperoleh dari fraksinasi ekstrak metanol pekat dari umbi binahong. Fraksi etil asetat difraksinasi menggunakan metode Kromatografi Cair vakum (KCV) dengan fase diam silica gel dan fase gerak diklorometana : isopropanol berdasarkan perbandingan

eluen pada tabel 1.

Tabel 1

No	Kode Fraksi	Fase gerak		
		Eluen	Perbandingan (%)	Volume (L)
1	Ef 1	D	100	2
2	Ef 2	D : I	98 : 2	2
3	Ef 3	D : I	95 : 5	2
4	Ef 4	D : I	90 : 10	2
5	Ef 5	D : I	80 : 20	2
6	Ef 6	D : I	70 : 30	2
7	Ef 7	D : I	50 : 50	2
8	Ef 8	I	100	2

Keterangan : Ef = ethyl acetate fraction

D = diklorometana I = isopropanol

Isolasi Senyawa Utama Eluat hasil fraksinasi (Ef 1 — Ef 8) dianalisis dengan menggunakan HPLC analitik detektor PDA dimana fraksi yang mengandung peak senyawa utama pada ekstrak metanol akan digunakan dalam fraksinasi lanjutan.

Fraksinasi lanjutan menggunakan kromatografi kolom sephadex LH-20 dan dikonfirmasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen hasil optimasi yaitu diklorometana : isopropanol : asam asetat 1% = 20 : 75 : 5 kemudian dikelompokkan berdasarkan profil KLT. Fraksi gabungan dipekatkan menggunakan rotavapor dan dianalisis menggunakan HPLC analitik detektor PDA. Karakterisasi Hasil Isolasi *Spektrofotometri UV-Vis* Isolat dianalisis menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan panjang gelombang serapan maksimum, ikatan rangkap, gugus kromofor dan keberadaan electron n terkonjugasi *LC-MS*. Isolat dianalisis menggunakan

metode LC-MS untuk mengetahui komponen senyawa dan berat molekulnya.

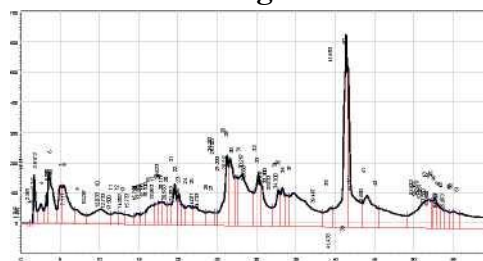
HNMR dan CNMR

Isolat dianalisis menggunakan HNMR dan CNMR untuk mengetahui kerangka karbon keseluruhan dari struktur molekul senyawa metabolit sekunder.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan fraksinasi lanjutan, fraksi etil asetat dianalisis menggunakan HPLC analitik detektor PDA dimana pada kromatogramnya muncul puncak dominan pada waktu retensi 41,55 menit dimana waktu retensi tersebut digunakan sebagai rujukan untuk runutan senyawa utama, seperti ditunjukkan gambar 1.

Etil asetat binahong



Gambar 1. Profil HPLC fraksi etil asetat

Fraksi etil asetat dipisahkan menggunakan Kromatografi Cair Vakum (KCV) sehingga diperoleh 8 fraksi turunan dimana masing-masing fraksi memiliki kepolaran yang berbeda berdasarkan eluen yang digunakan pada tabel 1. Hasil pemisahan dapat dilihat pada tabel 2.

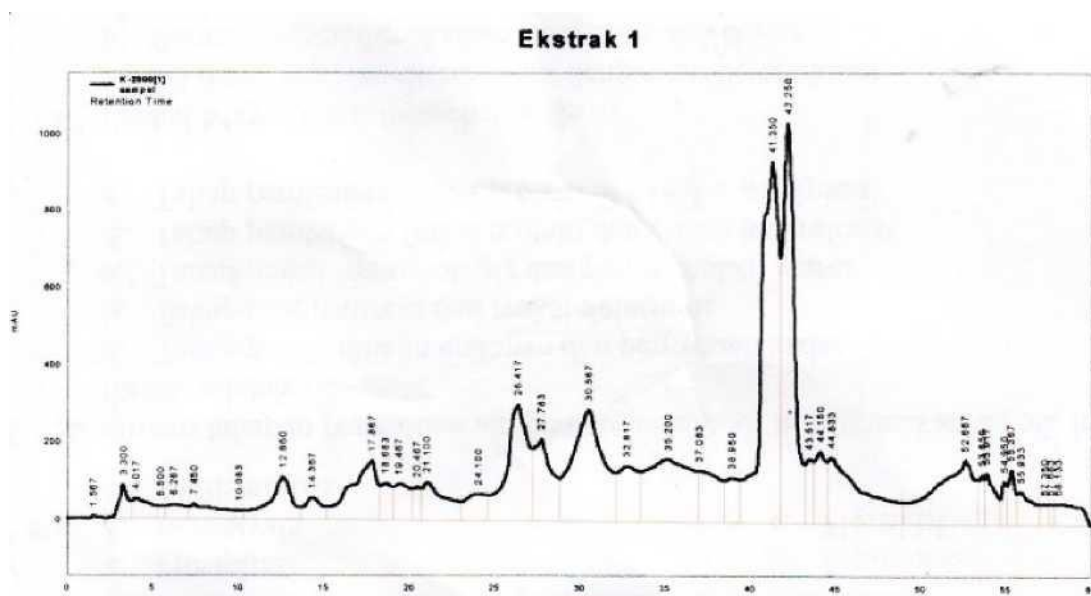
Analisis kualitatif HPLC analitik pada delapan fraksi menunjukkan bahwa puncak dominan fraksi etil asetat pada waktu retensi 41,55 menit muncul

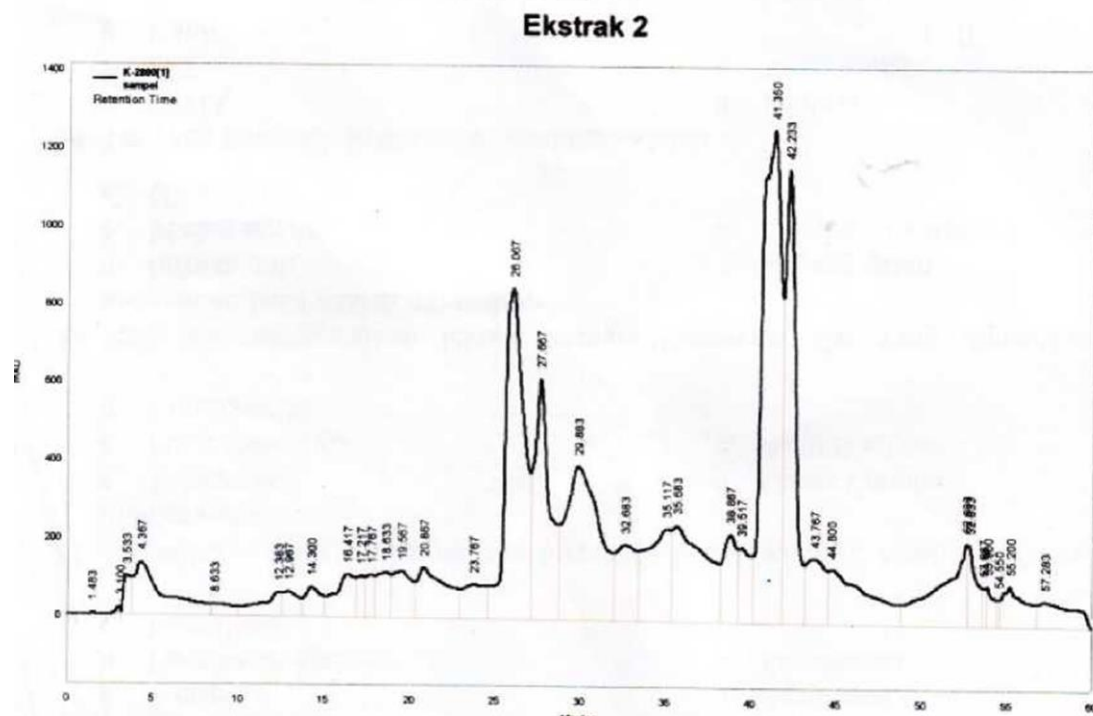
kembali pada fraksi Ef 1 dan Ef 2.

No	Kode Fraksi	Fase gerak			Hasil (gram)
		Eluen	Perbandingan (%)	Vol (L)	
1	Ef 1	D	100	2	0,5030
2	Ef 2	D : I	98 : 2	2	0,1015
3	Ef 3	D : I	95 : 5	2	0,2002
4	Ef 4	D : I	90 : 10	2	0,5468
5	Ef 5	D : I	80 : 20	2	1,1072
6	Ef 6	D : I	70 : 30	2	0,8499
7	Ef 7	D : I	50 : 50	2	1,9545
8	Ef 8	D : I	100	2	7,6075

D = diklorometana I = isopropanol

Berdasarkan hasil tersebut maka analisis runutan senyawa utama dilakukan pada fraksi Ef 1 dan Ef 2. Total berat fraksi Ef 2 terlalu sedikit untuk dilakukan pemisahan lanjutan maka analisis hanya dilakukan pada fraksi Ef 1. Profil HPLC untuk fraksi Ef 1 dan Ef 2 dapat dilihat pada gambar 2





Gambar 2. Profil HPLC fraksi Ef 1 dan Ef 2

Fraksi Ef 1 dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam sephadex dan fase gerak metanol dimana senyawa-senyawa pada fraksi Ef 1 akan terpisah berdasarkan berat molekulnya. Dimensi kolom yang digunakan yaitu panjang kolom 30 cm dengan diameter 2 cm. Hasil dari kromatografi kolom diperoleh 123 fraksi. Fraksi yang diperoleh digabungkan berdasarkan hasil KLT plat silica gel 60 F254 menggunakan eluen hasil optimasi diklormetana : isopropanol : asam asetat 1% = 20 : 75 : 5 menghasilkan 4 fraksi seperti pada Tabel 3.

Tabel 3 Hasil kolom sephadex fraksi Ef 1

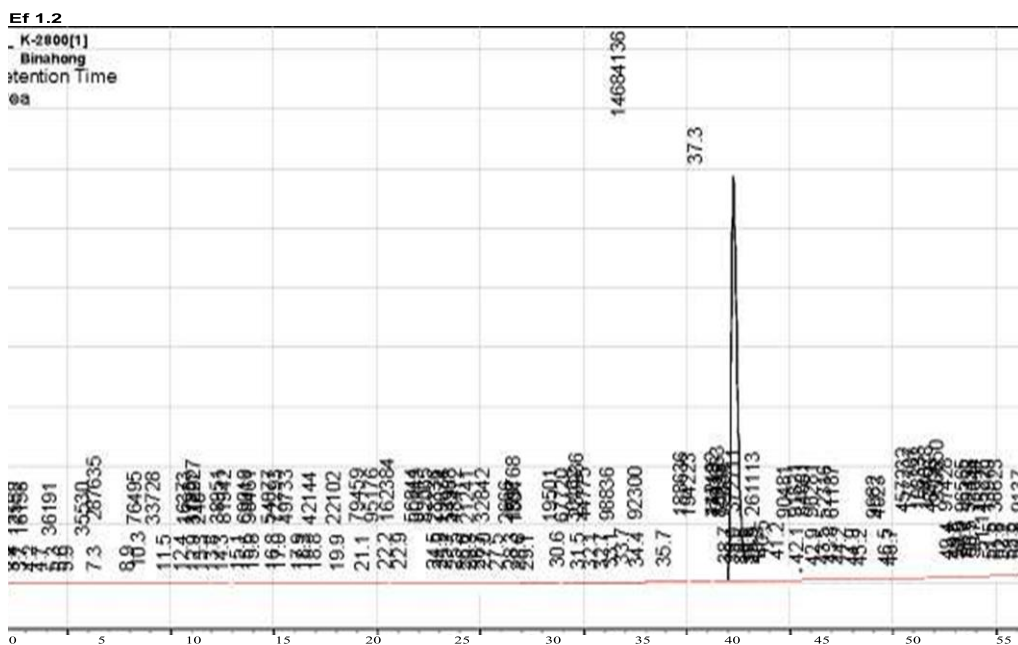
Kode Fraksi	Berat (g)	Bentuk, Warna
Ef 1.1	0,0009	Cairan kental, Putih
Ef 1.2	0,0019	Cairan kental, Merah kecoklatan
Ef 1.3	0,0003	Cairan kental, Hijau kekuningan
Ef 1.4	0,0271	Cairan kental, Putih kehijauan

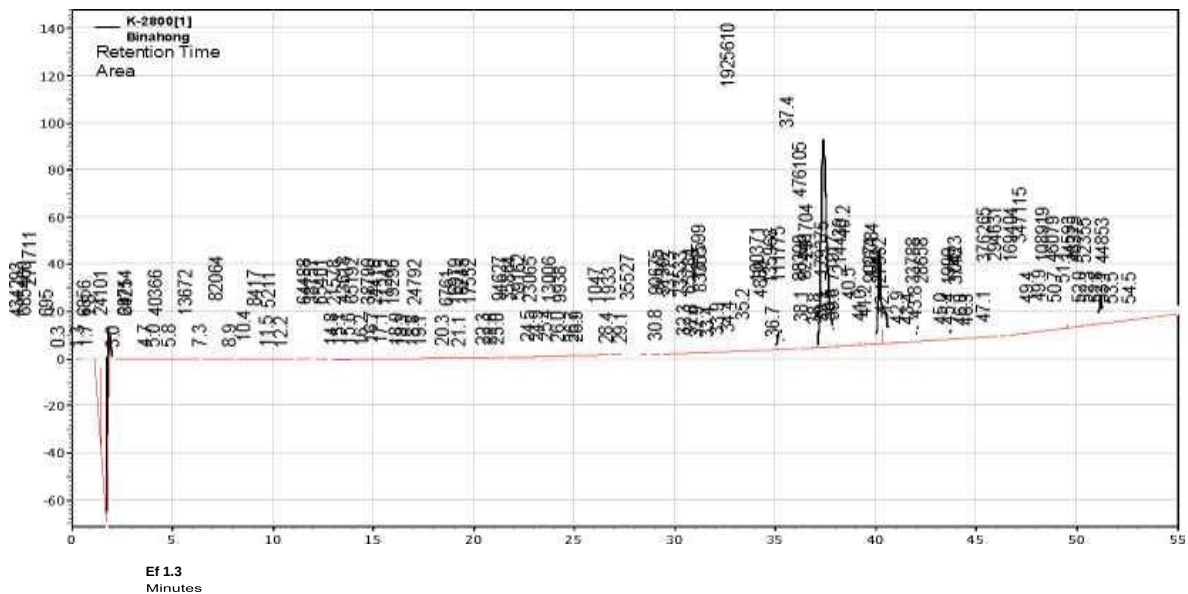
Analisis secara kualitatif terhadap keempat fraksi yang diperoleh dilakukan dengan HPLC analitik untuk melihat kemurnian isolat. Komposisi eluen yang digunakan dalam analisis HPLC fraksi Ef 1.2 dengan menggunakan detektor PDA adalah seperti pada Tabel 4.

Waktu (Menit)	Laju Alir ml/menit	Air (%)	Metanol (%)
0	0,5	80	20
5	0,5	80	20
7	0,5	70	30
10	0,5	70	30
12	0,5	55	45
20	0,5	55	45
22	0,5	40	60
27	0,5	40	60
30	0,5	30	70
35	0,5	30	70

37	0,5	15	85
45	0,5	15	85
47	0,5	0	100
55	0,5	0	100
57	0,5	80	20
65	0,5	80	20

sedangkan pada Ef 1.1 dan Ef 1.4 puncak tunggal tersebut tidak terlalu tampak. Berdasarkan hal tersebut maka runutan senyawa dilakukan pada fraksi Ef 1.2.

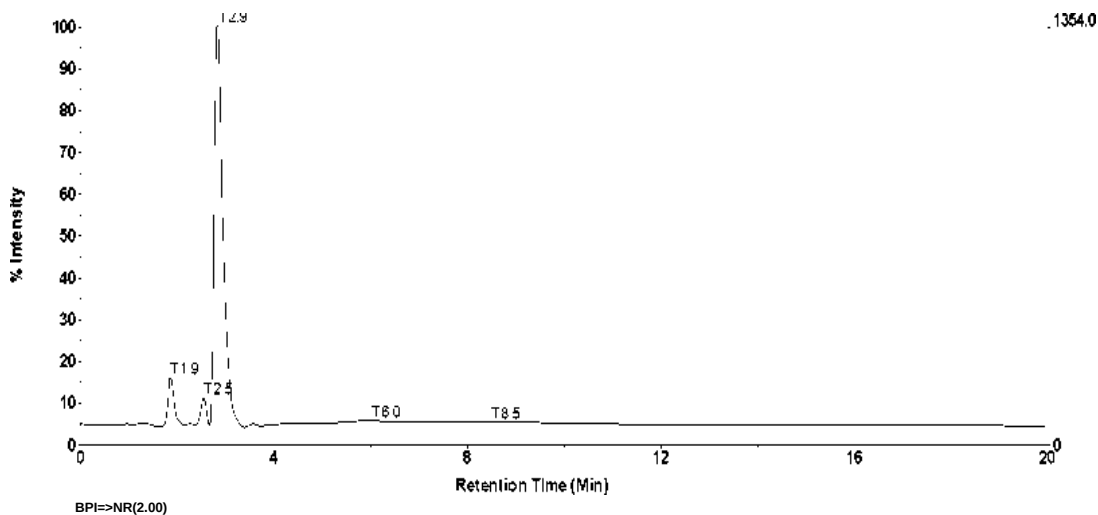




Gambar 3. Profil HPLC fraksi Ef 1.2 dan Ef 1.3

Fraksi Ef 1.2 merupakan hasil pemisahan Ef 1 pada gradient pelarut diklorometana : isopropanol = 100 : 1. Hal ini menunjukkan bahwa puncak dominan pada fraksi Ef 1.2 adalah senyawa nonpolar sesuai dengan sifat gradient pelarutnya.

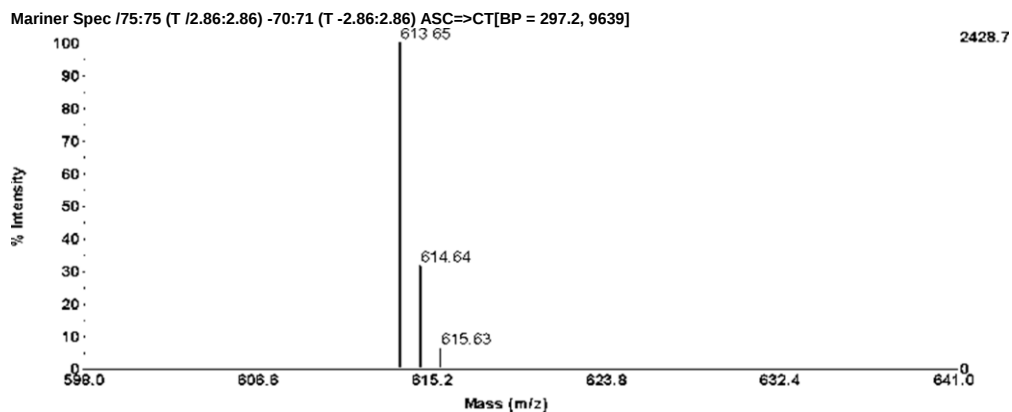
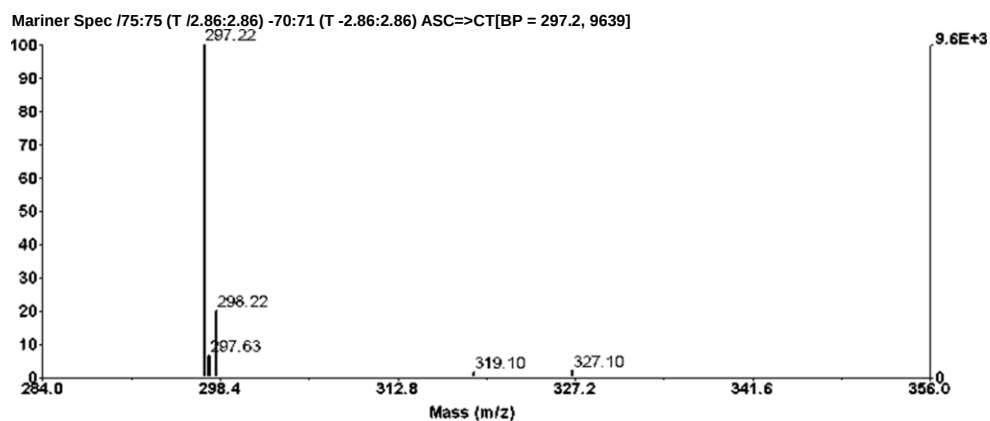
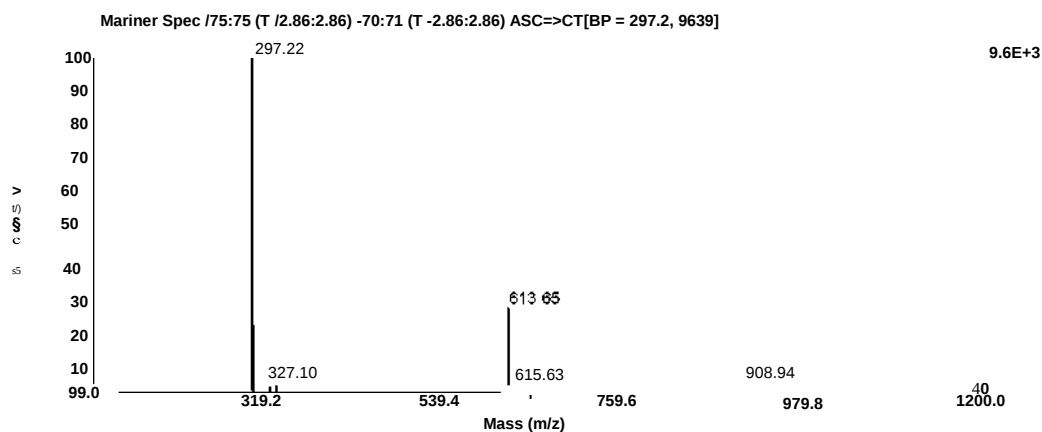
Hasil pemisahan LC fraksi Ef 1.2 menunjukkan adanya 5 puncak pada waktu retensi 1,8; 2,5; 2,9; 6,0 dan 8,49 menit. Puncak utama ditunjukkan pada waktu retensi 2,9 menit, seperti ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Kromatogram LC fraksi Ef 1.2

Berdasarkan peruntutan senyawa utama dari fraksi Ef 1.2 maka puncak ini dianalisis menggunakan metode ESI-MS untuk mengetahui berat molekulnya. Spektrum MS puncak utama pada

chromatogram hasil LC dapat dilihat pada gambar 5



Gambar 5. Spektrum MS puncak dominan pada waktu retensi 2,9 menit dari fraksi Ef 1.2

Ion molekul terprotonasi oleh ion H^+ memiliki rumus $(M + H)^+$ atau $(M + 1)^+$ dalam bentuk ionisasi positif dan ion molekul terprotonasi dengan rumus $(M - H)^+$ dalam bentuk ionisasi negative.

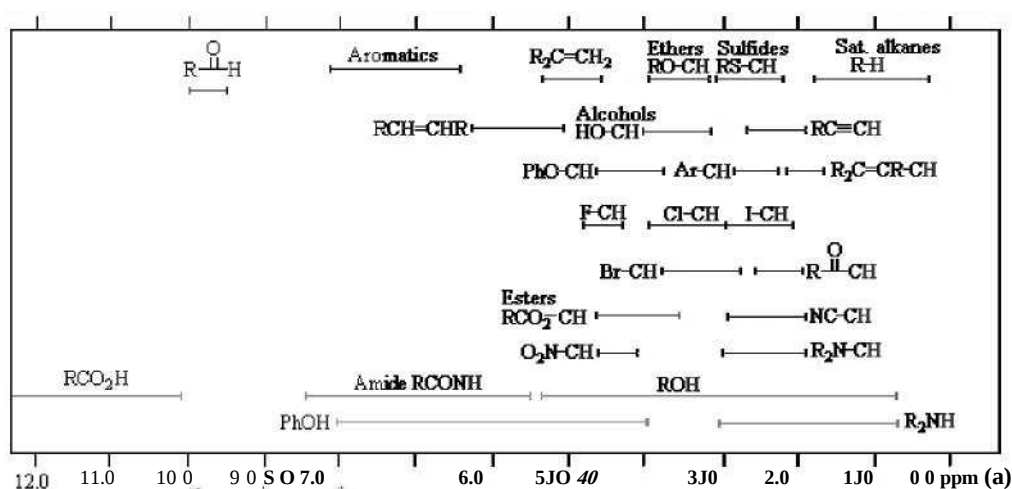
Spektrum m/z dari puncak dominan yang muncul pada waktu retensi 2,9 menit fraksi Ef 1.2 menunjukkan ion dominan (base puncak) pada m/z 297,22. Di mana nilai ini sesuai dengan ion

molekul terprotonasi yang diharapkan ($M + H$)⁺. Hal ini disebabkan karena proses ionisasi dilakukan di bawah kondisi positif.

Ion molekul terprotonasi pada m/z 297,22 Da tersebut bermuatan tunggal sehingga dapat diasumsikan sebagai berat molekul (BM) dimana nilai z (jumlah muatan) adalah 1. Berdasarkan hal tersebut, senyawa utama fraksi Ef 1.2 memiliki BM 296,22 Da dimana nilai ini merupakan nilai teoritis. Hasil analisis H-NMR menunjukkan keberadaan puncak-puncak dengan pergeseran kimia dan konstanta kopling yang khas, seperti ditunjukkan pada tabel 5.

Tabel 5

δ (ppm)	Jumlah puncak	Perkiraan Konstanta Kopling (J)
<i>Upfield</i>		
3,7992	Singlet	-
2,4449	Singlet	-
2,2347	Singlet	-
0,7777	Doublet	22 Hz
0,9440	Triplet	
<i>Downfield</i> (<i>unshielded</i>)		
7,5821	Double doublet	
Puncak-puncak	singlet pad	pergeseran

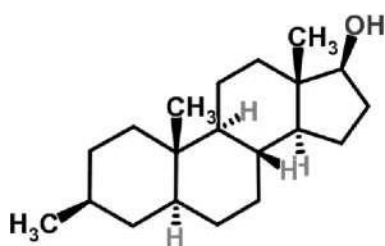


Gambar 6. Daerah pergeseran kimia proton pada analisis H-NMR

Gugus alkil menunjukkan kisaran pergeseran kimia yang lebar tergantung pada gugus fungsi yang diikat. Gugus fungsional tersebut akan menyebabkan pergeseran kimia posisi resonansi dari proton pada gugus alkil, dimana efek ini dinamakan efek *shielding* (Daley and Daley, 2005). Semakin besar efek *shielding* maka posisi resonansi proton akan semakin

mengarah ke pergeseran kimia yang lebih kecil konsentrasinya. Hasil analisis spektroskopi LC-MS menunjukkan berat molekul senyawa utama tersebut adalah 296 Da(m/z) dengan perkiraan rumus empiris adalah $C_{20}H_{34}O$.

Berdasarkan data tersebut maka dilakukan pencarian kemungkinan golongan dan struktur molekul dasar dari senyawa utama dengan menggunakan instrumen search engine. www.chemspider.com. Kemungkinan struktur molekul yang mendekati adalah turunan phenantrena golongan terpenoid dengan nama sistematis **(3S,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-3,10,13-trimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-ol** seperti ditunjukkan gambar 7.



Gambar 7. Kemungkinan struktur molekul

Kemungkinan struktur molekul hasil **penelusuran melalui <http://chemspider.com>** didukung oleh data spektrum C^{13} -NMR. Sinyal pergeseran kimia pada 48,75; 48,92; 49,09; 49,27 dan 49,44 ppm merupakan sinyal dari pelarut CDCK. Senyawa utama dari fraksi Ef 1.2 yang dirunut muncul pada sinyal pergeseran kimia 17,23; 18,50; 57,40; 62,27 ppm. Hal ini menunjukkan

bahwa terdapat 3 tipe atom karbon pada senyawa yang dirunut. Masing-masing sinyal pergeseran kimia mewakili kerangka satu atom karbon (C) atau 2 atau lebih atom karbon (C). Sinyal pergeseran kimia pada 10-40ppm (*downfield* — *shielded*) menunjukkan tipe kerangka karbon alkana yang terikat pada atom C.

Elektron-elektron pada alkana melindungi nukleus atom C sehingga mengurangi efek medan magnet dan membutuhkan frekuensi yang lebih rendah untuk beresonansi. Sinyal pergeseran kimia pada 57,40 ppm menunjukkan adanya kerangka atom karbon yang terikat pada suatu atom yang bersifat elektronegatif. Atom elektronegatif menarik elektron atom C sehingga nukleus atom C tidak terlindungi (*desielded*). Hal ini menyebabkan nukleus atom C memiliki efek medan magnet yang lebih besar sehingga membutuhkan frekuensi yang lebih tinggi untuk beresonansi. Tipe kerangka atom karbon dan pergeseran kimianya dapat dilihat pada Tabel 6 Tipe kerangka atom karbon (C) dan pergeseran kimia pada spektrum C^{13} - NMR

Tipe Atom C	Pergeseran Kimia (5 -ppm)
— CH ₃ (metil)	10 - 40
— CH ₂ — (metilen)	20 - 65
C - OH	40 - 80

Daftar Pustaka

- Chuang, MT., Lin, Y.S., and Hou, W.C., 2007, **Ancordin, The Major Rhizome Protein of Madeira-vine, with Trypsin Inhibitory and Stimulatory Activities in Nitric Oxide Productions, *J.Peptides* (Elsevier) 28, p. 1311 – 1316**
- Harborne, J.B., 2007, **Metode Fitokimia**, ITB, Bandung
- Jadulco, R.C., 2002, **Isolation and Structure Elucidation of Bioactive Secondary Metabolites from Marine Sponges and Sponge-derived Fungi, *Dissertation*, Naturwissenschaftlichen Doktorgrades, Bayerischen Julius-Maximilians-Universitat Wurzburg, Wurzburg**
- Lenny, S., 2006, **Senyawa Terpenoida dan Steroida, *Karya Ilmiah*, Jurusan Kimia, FMIPA-USU, Medan**
- Muller, H., Brackhagen, O., Henkel, T., and Reichel, F., 2001, **Natural Products in Drug Discovery**, Ernst Schering Research Foundation Workshop 32: *The Role of Natural Product in Drug Discovery*, p. 205 — 216, Springer-Verlag Germany
- Supriadi, dkk., 2011, **Tumbuhan Obat Indonesia: Penggunaan dan Khasiatnya**, Yayasan Obor Indonesia: xi-xxvii, Jakarta
- Tshikalange, T.E., 2007, **In vitro anti-HIV-1 Properties of Ethnobotanically elected South African Plants used in the Treatment of Sexually Transmitted Diseases**, University of Pretoria, 2: 21-5
- Uchida, S., 2003, **Production of a Digital Map of the hazardeous Condition of Soil Erosion for the Sloping Lands of West Java. Indonesia using Geographic Information System (GIS)**, JIRCAS

